

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Electrónica, Robótica y
Mecatrónica.

Estudio de viabilidad del uso de espectrometría de
absorbancia y fluorescencia para la detección de
resultados de ensayos QPCR y QLAMP realizados
en dispositivos lab-on-chip.

Autor: Andrés Delgado Domínguez

Tutores: José Manuel Quero Reboul,
Francisco Antonio Perdigones Sánchez

Departamento de Electrónica
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2025



Trabajo Final de Grado
Grado en Ingeniería Electrónica, Robótica y Mecatrónica

Estudio de viabilidad del uso de espectrometría de
absorbancia y fluorescencia para la detección de
resultados de ensayos QPCR y QLAMP realizados en
dispositivos lab-on-chip.

Autor:

Andrés Delgado Domínguez

Tutor:

José Manuel Quero Reboul

Francisco Antonio Perdigones Sánchez

Profesores titulares de Universidad de Sevilla

Departamento de Ingeniería Electrónica

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2025

Trabajo Final de Grado: Estudio de viabilidad del uso de espectrometría de absorbancia y fluorescencia para la detección de resultados de ensayos QPCR y QLAMP realizados en dispositivos lab-on-chip.

Autor: Andrés Delgado Domínguez

Tutor: José Manuel Quero Reboul,
Francisco Antonio Perdigones Sánchez

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

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de

Sevilla, 2025

El secretario del Tribunal

A mi familia

A mis maestros

*A mis compañeros y tutores de
Biodevices Technologies*

Agradecimientos

Mi interés por el conocimiento de la electrónica nace de la buena calidad de enseñanza proporcionada por los profesores de este departamento. A través de asignaturas como Electrónica General, Electrónica Digital, Fundamentos de Electrónica, Sistemas Electrónicos y Sistemas Electrónicos para la Automatización entre otras he podido desarrollar mi vocación por esta rama de la ingeniería. Me gustaría agradecer a mis tutores José Manuel Quero Reboul, Francisco Antonio Perdigones Sánchez y al profesor Juan de la Cruz García Ortega la confianza el apoyo mostrado en todo momento para realizar este proyecto que vincula la electrónica con la ingeniería de la salud, campo en el que desde el inicio de la carrera he tenido claro que también quería desarrollarme.

Gracias a los profesores que se interesan genuinamente por los estudiantes y profesan verdadera vocación por transmitir conocimientos, sin ellos muchos habríamos perdido la motivación y desistido en el intento de alcanzar una meta tan alta como es ser graduado en ingeniería. Son ellos los que consiguen compensar otros tipos de docencia que en poca o ninguna estima tienen a quienes se les imparten las materias.

Por último, y no por ello menos importante, si no más personal, gracias a mi familia, a mis antiguos compañeros de Virtualmech y a mis allegados por animarme, ayudarme y hasta aguantarme en mi travesía por la Universidad de Sevilla, en la cual a pesar de sus altibajos ya se vislumbra la meta.

Andrés Delgado Domínguez

Sevilla, enero de 2025

Resumen

Con la finalidad principal de crear un sistema de detección de resultados para la amplificación de ADN mediante metodologías PCR y LAMP realizadas con la tecnología lab-on-chip, en este documento se estudia la posibilidad de utilizar la espectrometría de fluorescencia y así mismo la espectrometría de absorción como método de detección de pruebas.

Para ello se procederá a la evaluación de un espectrómetro comercial con la finalidad de familiarizarse con esta tecnología y realizar diferentes ensayos y comprobar si los resultados son adecuados además de proponer soluciones alternativas para la detección si estas resultasen ser más viables.

Abstract

With the main purpose of creating an accurate results detection system for DNA amplification using PCR and LAMP methods made on lab on chip technology, this document studies the possibility of using absorption and florescent spectrometry as a test detection method.

In this order, a commercial spectrometer will be evaluated to firstly become familiar with its technology and check if the measurements of the results of different tests are adequate.

Also. if the results require it, more suitable alternative solutions for detection will be proposed.

Índice

Agradecimientos	16
Resumen	17
Abstract	17
Índice	18
Índice de Tablas	19
Índice de Figuras	20
1 Introducción	22
1.1 Espectrometría y Espectrómetro	22
1.2 Espectrometría de Absorción. Conceptos de absorbancia y transmitancia; ley de Lambert-Beer	23
1.3 Espectrometría de emisión. Fenómenos luminiscentes, Diagrama de Jablonski	24
1.4 Funcionamiento del espectrómetro Hamamatsu	26
1.5 Técnicas de amplificación de ADN mediante PCR y LAMP. Cuantificación de resultados.	26
1.5.1 PCR	27
1.6 LAMP	28
1.6.1 QPCR y QLAMP, métodos de detección de la amplificación de ADN.	30
1.7 Tecnología LOC	30
2 Evaluación del espectrómetro	31
2.1 Caracterización de los ensayos.	31
2.2 Medición del espectro de emisión de diferentes LEDs	33
2.3 Medición de espectro de emisión de una lámpara fluorescente	35
2.4 Elaboración de un entorno adecuado para la toma de mediciones.	36
2.5 Medición de la absorbancia del medio de cultivo DMEM con Phenol RED	37
3 Medidas de espectrometría de fluorescencia en muestras de PCR.	39
4 Medidas de espectrometría de absorción en muestras de LAMP.	41
4.1. Medición de muestras con luz incandescente como fuente lumínica	41
4.1 Medición de muestras con LED de 430nm como fuente lumínica	43
4.2 Medición de muestras con LED de 560nm como fuente lumínica	44
5 Propuesta de solución. Detección mediante fototransistor.	46
5.1 Disposición del equipo y entorno para la toma de mediciones.	46
5.2 Medición de muestras con LED 430nm y 560nm con fototransistor	47
5.3 Software de lectura del fototransistor.	49
5.4 Medición de Ensayo LAMP en tiempo real.	50
6 Circuito de lectura de ensayos LAMP.	52
6.1 Circuito de fototransistores.	53
6.2 Circuito de excitación de LEDs.	54
6.3 Diseño del circuito en PCB	54
7 Lectura de fotodiodo acondicionado	56
8 Conclusiones	57
Referencias	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Materiales utilizados para el ensayo de PCR	28
Tabla 4-1. Medidas de Absorbancia en puntos críticos. Luz incandescente	42
Tabla 4-2. Medidas de Absorbancia en puntos críticos. LED 430nm	44
Tabla 4-3. Medidas de absorbancia en puntos críticos. LED 569nm	45
Tabla 5-1. Tabla de estadísticos para medidas de fototransistor. LED 430nm.	47
Tabla 5-2. Tabla de estadísticos para medidas de fototransistor. LED 560nm.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Imagen explicativa de los espectros de emisión y absorción [3].	22
Figura 1-2. Absorbancia a través de un bote de ensayo para I_i intensidad de radiación EM entrante, I_o Intensidad de radiación EM que atraviesa el tubo, b espesor de la cubeta y c concentración molar.	23
Figura 1-3. Diagrama de estado fundamental, estado singlete excitado y estado triplete excitado [6].	24
Figura 1-4. Diagrama de Jablonski	25
Figura 1-5. Neuronas del hipocampo primario murino marcadas con fluoróforos.	25
Figura 1-6. Esquema del funcionamiento del espectrómetro Hamamatsu C12880MA. [11]	26
Figura 1-7. Diagrama del proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	27
Figura 1-8. Diagrama de la amplificación de ADN mediante el método LAMP. Parte 1	28
Figura 1-9. Diagrama de la amplificación de ADN mediante el método LAMP. Parte 2	29
Figura 1-10. Diagrama de la amplificación de ADN mediante el método LAMP. Parte 3	29
Figura 1-11. Detector colorimétrico de del de agarosa usando RT-LAMP. [16].	30
Figura 1-12. Lab-on-chip para diagnóstico de leucemia infantil [14].	31
Figura 2-1. Software de evaluación del espectrómetro en proceso de tomar muestras.	32
Figura 2-2. Vistas de las partes 1, 2 y 3 del encapsulado.	32
Figura 2-3. Imagen de la parte 3 del encapsulado con el espectrómetro conectado	33
Figura 2-4. Muestra de ruido residual con filtro de espectro visible	33
Figura 2-5. Espectro de LEDs azul y verde recogidos por el espectrómetro Hamamatsu	34
Figura 2-6. Espectro de LED blanco recogido por el espectrómetro Hamamatsu	34
Figura 2-7. Intensidad luminosa relativa teórica de LEDs azul y verde (izquierda) y blanco (derecha)	34
Figura 2-8. Espectro de iluminación fluorescente recogido por el espectrómetro Hamamatsu	35
Figura 2-9. Gráfico tomado de Tapia, A. Sánchez de Miguel & J. Zamorano (2015) "LICA-UCM sobre lámpara fluorescente de 3952K. [21]	35
Figura 2-10. Vistas de la placa de metacrilato modificada. Figura 2-11. Imagen de pieza de metacrilato fresada.	36
Figura 2-12. Procedimiento para realizar un ensayo.	36
Figura 2-13. Absorbancia espectral de DMEM para diferentes niveles de pH	37
Figura 2-14. Gráfico de transmitancia correspondiente a la muestra de DMEM	37
Figura 2-15. Gráfico de absorbancia correspondiente a la muestra de DMEM	38
Figura 3-2. Espectro del ensayo de PCR	39
Figura 3-1. Absorbancia del ensayo de PCR	39
Figura 3-3. Espectro del ensayo de PCR hiper dopado	40
Figura 4-1. Espectro del ensayo de LAMP.	41
Figura 4-2. Absorbancia de muestras de LAMP para luz incandescente.	42

Figura 4-3. Medición de muestras de LAMP mediante espectrómetro para LED 430nm	43
Figura 4-4. Absorbancia de muestras de LAMP para LED de 430nm.	43
Figura 4-5. Medición de muestras de LAMP mediante espectrómetro para LED 560nm	44
Figura 4-6. Absorbancia de muestras de LAMP para LED de 560nm.	45
Figura 5-1. Encapsulado para medición de muestras de LAMP con Fototransistor.	46
Figura 5-2. Histograma de datos recopilados sobre muestras LAMP. LED 430nm.	47
Figura 5-3. Histograma de datos recopilados sobre muestras LAMP. LED 560nm	48
Figura 5-4. Mediciones del fototransistor para un ensayo de LAMP en tiempo real con muestra control.	51
Figura 5-5. Mediciones del fototransistor para un ensayo de LAMP en tiempo real con muestra positiva.	51
Figura 6-1. Disposición del circuito de LEDs (1), la-on-chip (2) y circuito de fototransistores (3)	52
Figura 6-2. Circuito de filtrado y amplificación del fototransistor	53
Figura 6-3. Circuito de excitación de LEDs	54
Figura 6-4. Diseño de Circuito de excitación de LEDs y conexionado en PCB	54
Figura 6-5. Diseño de circuito de lectura de fototransistores	55
Figura 6-6. Conexionado de circuito de lectura de fototransistores en PCB	55
Figura 7-1. Lectura del ensayo LAMP en tiempo real con circuito de amplificación y filtrado.	56
Figura 7-2. Valores negativos del Ensayo de LAMP con circuito de amplificación y filtrado.	57

1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo introductorio se verán todas las partes teóricas que son necesarias comprender para la realización de este proyecto fin de grado.

1.1 Espectrometría y Espectrómetro

Hablar de espectrometría es hablar de una técnica espectroscópica para medir la concentración o cantidad de especie o especies determinadas en un medio, aprovechando las propiedades de átomos, moléculas y materiales para absorber cierta parte del espectro electromagnético en mayor o menor medida e incluso a veces de emitir radiación electromagnética. Normalmente este proceso de tasación se realiza mediante un instrumento de medida llamado espectrómetro [1].

Un espectrómetro utiliza esta técnica descrita previamente para realizar una descomposición espectral de frecuencias de una raza incidente, además de medir la intensidad lumínica que tiene cada componente espectral. Se puede asemejar este proceso a una “discretización” de la radiación electromagnética en cada una de sus diferentes longitudes de onda. [2]

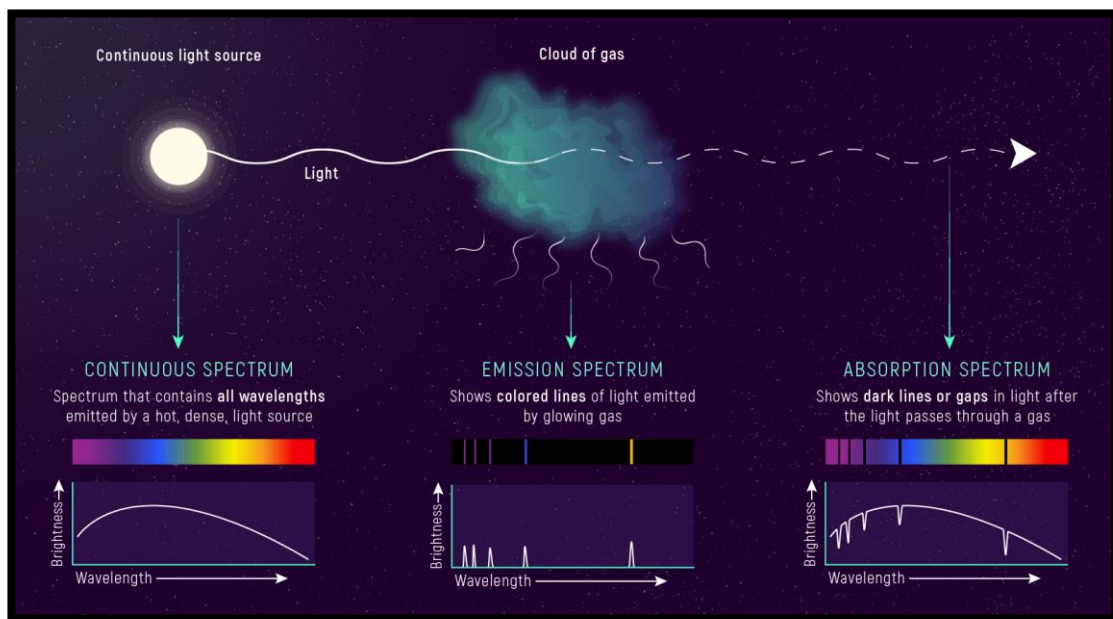


Figura 1-1. Imagen explicativa de los espectros de emisión y absorción [3].

Como es apreciable en la Figura 1-1 se pueden distinguir dos tipos principales de espectrometría; la de absorción y de emisión. La espectrometría de emisión se dedica a analizar el espectro que arroja cualquier fuente que emita radiación electromagnética, este es el caso de la espectrometría de fluorescencia. Por el contrario, la espectrometría de absorción se centra en el estudio de las propiedades únicas de cada material, molécula o átomo de absorber determinadas franjas del espectro electromagnético.

1.2 Espectrometría de Absorción. Conceptos de absorbancia y transmitancia; ley de Lambert-Beer

Asociados a la espectrometría de absorción se encuentran los conceptos de Absorbancia y Transmitancia. La absorbancia es por definición “la medida de la atenuación de una radiación al atravesar una sustancia, que se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y la entrante”. A esta relación entre la intensidad saliente (I) y entrante (I_0) se le denomina Transmitancia [4], expresada la Ecuación 1-1 por unidad y en porcentaje.

$$T = \frac{I}{I_0}; T(\%) = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad (1-1)$$

$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right); \quad \forall A \in [0,2] \quad (1-2) \quad [4]$$

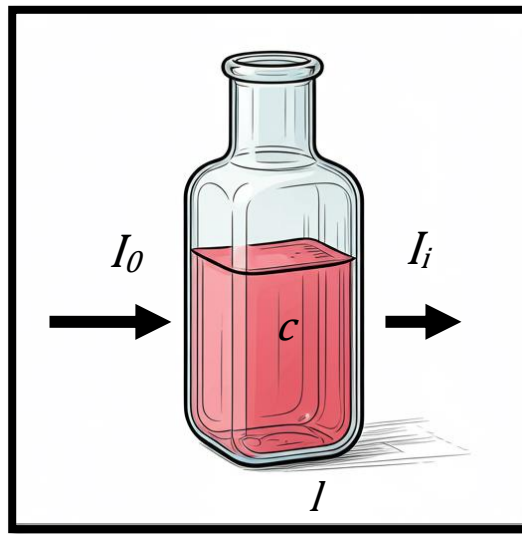


Figura 1-2. Absorbancia a través de un bote de ensayo para I_i intensidad de radiación EM entrante, I_0 Intensidad de radiación EM que atraviesa el tubo, b espesor de la cubeta y c concentración molar.

Otro método existente para determinar la absorbancia de una muestra es La ley de Lambert-Beer, la cual establece que una radiación electromagnética puede verse atenuada al atravesar un medio debido diversos factores numerados en la siguiente ecuación [5]:

$$I = I_0 e^{-alc} \quad (1-3)$$

Dónde:

I_0 : Intensidad de luz incidente en el medio.

I : Intensidad de luz transmitida o que atraviesa el medio.

a : Coeficiente de absorción también llamado absorptividad o coeficiente molar de extinción.

l : Espesor de la columna del medio absorbente.

c : la concentración de la sustancia con propiedades absorbentes de radiación electromagnética en el medio o concentración molar.

Operando y teniendo en cuenta que el coeficiente de intensidades I/I_0 representa la Transmitancia como se aclaró previamente, se obtiene la siguiente relación:

$$-\log(T) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = a \cdot l \cdot c = A \quad (1-4) \quad [5]$$

Resultando de esta fórmula una relación entre la absorbancia, la transmitancia y las propiedades del medio atravesado por la radiación electromagnética.

1.3 Espectrometría de emisión. Fenómenos luminiscentes, Diagrama de Jablonski

El fenómeno de luminiscencia se fundamenta en las reacciones fotónicas en moléculas cuando son excitadas con luz de una frecuencia correspondiente a la diferencia de energía entre el estado fundamental S_0 y los excitados S_1 , S_2 , S_3 , etc. La excitación ocurre en el orden de 10^{-15} segundos y en el proceso de relajación la molécula vuelve a su estado fundamental liberando en el proceso el exceso de energía la cual puede manifestarse de manera radiante o no [6].

Se denomina fenómeno de luminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) al caso concreto en el que la energía excedente de la especie excitada es emitida en forma de fotón; si el electrón que migra mantiene su spin en el proceso de excitación, la relajación transcurrirá en un plazo inferior a 10^{-9} segundos y se llamará fluorescencia, si por el contrario la excitación conlleva un cambio de spin la relajación ocurrirá en un plazo del orden de milisegundos a minutos y pasará a llamarse fosforescencia. Se diferencia así entre excitación con cambio de spin o estado de triplete excitado y la excitación sin cambio de spin o estado singlete (Figura 1-3) [6].

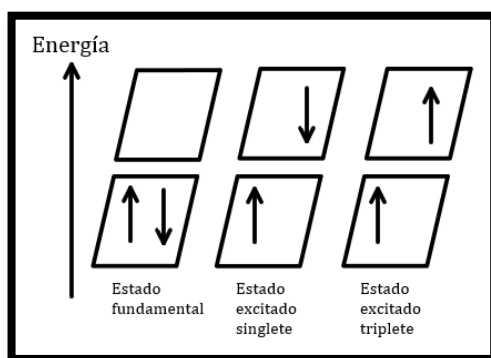


Figura 1-3. Diagrama de estado fundamental, estado singlete excitado y estado triplete excitado [6].

Para representar el proceso de luminiscencia de manera gráfica, utilizaremos el diagrama de Jablonski, expresado en la Figura 1-4:

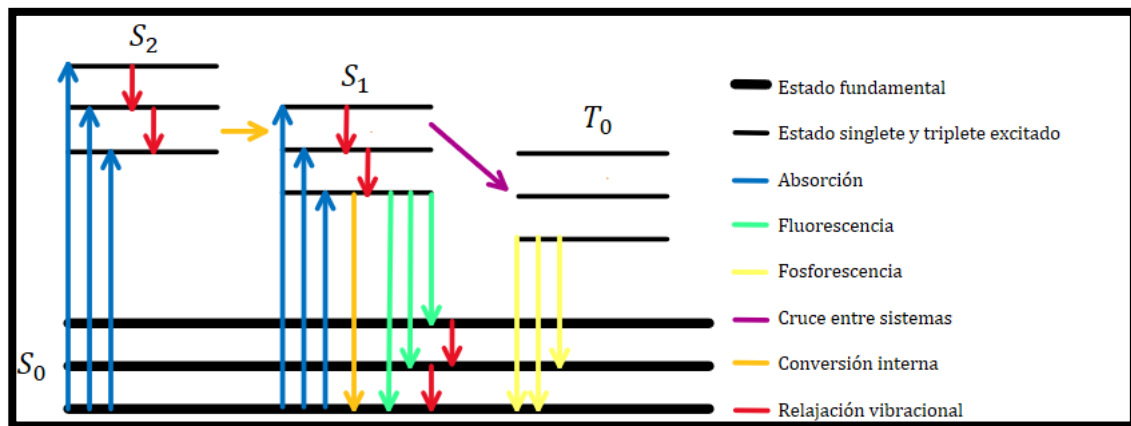


Figura 1-4. Diagrama de Jablonski

Como se puede apreciar en la figura anterior, las formas que tiene la molécula para volver a su estado son la relajación vibracional, la conversión interna o los procesos radiantes de fluorescencia y fosforescencia. Para la mayoría de los casos, la energía de la emisión fluorescente será menor o igual a la de la radiación de excitación (o lo que es lo mismo la longitud de onda de emisión es mayor que la de excitación). “Al espacio (medido en nanómetros) que existe entre el punto de máxima absorción y el punto máximo de fluorescencia se conoce como corrimiento de Stokes” [7].

A aquellas especies químicas que incluyen los procesos radiantes entre sus formas de relajación tras ser excitadas con luz se las denomina fluoróforo [8]. Cada fluoróforo tiene un rendimiento cuántico propio (fotones emitidos entre fotones absorbidos) [9] y la longitud de onda de emisión podrá variar dependiendo del medio en el que se encuentre y del tipo de fluoróforo. Estos se pueden dividir en dos grandes grupos: los intrínsecos o naturales son aquellos que se dan naturalmente debido a la estructura molecular de la propia especie química como son la clorofila o el triptófano, los extrínsecos son aquellos que se añaden a una muestra para transmitirle propiedades específicas, así es el caso de BrEt o DAPI que se agregan a los ácidos nucleicos [10].

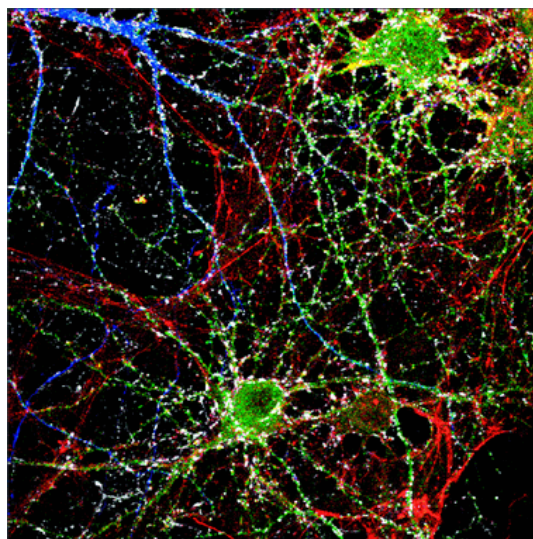


Figura 1-5. Neuronas del hipocampo primario murino marcadas con fluoróforos.

1.4 Funcionamiento del espectrómetro Hamamatsu

Con la finalidad de entender el funcionamiento del espectrómetro seleccionado, se estudiarán sus diferentes partes y el proceso al cual se somete la luz al atravesar cada parte, aplicado al espectrómetro que se usará. Este espectrómetro requiere de una serie de partes principales para su correcto funcionamiento; las cuales son la rendija, la Red de difracción, y el fotorreceptor. Para la disección de las partes de este instrumento nos valdremos de la Figura 1-6.

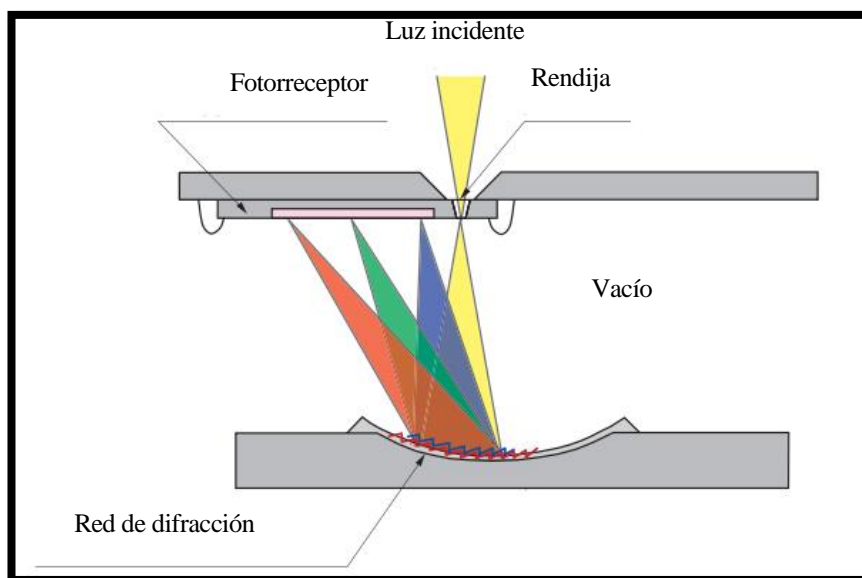


Figura 1-6. Esquema del funcionamiento del espectrómetro Hamamatsu C12880MA. [11]

- **Luz incidente:** El rango de luces incidentes a analizar por el instrumento de medida es dependiente del rango de medida de este, también llamado rango de respuesta espectral [12]. El espectrómetro del que se dispone para realizar mediciones es un C12880MA con adaptador para conexión a ordenador C13985 de la empresa Hamamatsu, un mini espectrómetro de alta sensibilidad que tiene un rango de respuesta espectral de longitudes de onda desde 340 a 850nm [11].
- **Rendija:** Para asegurar que la raza sea lo más puntual posible se introduce este elemento, que no es ni más ni menos que una pequeña apertura en una superficie [12].
- **Red de difracción:** La red de difracción es el elemento del espectrómetro que descompone la luz incidente en las diferentes longitudes de onda [13].
- **Fotorreceptor:** La luz descompuesta en las diferentes longitudes de onda incidirán en un punto dónde se coloca un fotorreceptor para que mida el nivel de intensidad lumínica que llega a recibir [13].

1.5 Técnicas de amplificación de ADN mediante PCR y LAMP. Cuantificación de resultados.

Aunque el conocimiento del proceso a través del cual se amplifica el ADN no es estrictamente necesario para la realización de este proyecto, puesto que se centra sólo en el análisis de los resultados, se considera recomendable una explicación simple para entrar en materia sobre qué se va a analizar mediante espectrometría. En particular nos centraremos en dos métodos de amplificación de ADN sobre los cuales analizaremos resultados, los cuales son PCR y LAMP.

1.5.1 PCR

La técnica conocida como PCR (polymerase chain reaction) se realiza con el fin de detectar si en una muestra biológica se encuentran o no ciertas secuencias de ADN con precisión. Para este fin se simulan las condiciones idóneas que hacen posible la replicación de ADN de manera natural, para lo cual se necesita una muestra que contenga el ADN polimerasa, primers, nucleótidos sueltos y una plantilla de ADN. Por otra parte, el proceso de esta técnica se puede dividir en desnaturalización, anillamiento y elongación [14].

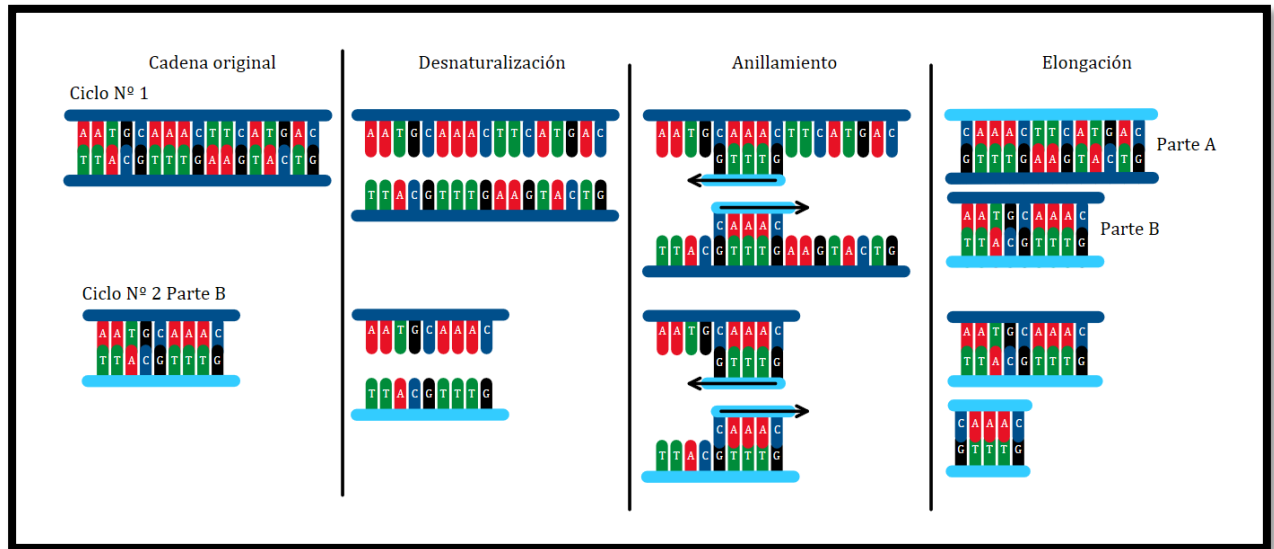


Figura 1-7. Diagrama del proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1. Desnaturalización: La muestra alcanza una temperatura que ronda los 95-90°C para separar la doble cadena de la muestra de ADN en dos partes [14].
2. Anillamiento: En este momento entran en acción los Primers y para ello se enfría la muestra a una temperatura que dependiendo del tipo de Primer rondará entre los 40-65°C. Los Primers son unas cadenas de nucleótidos usualmente cortas que se diseñan específicamente para anillarse a la cadena de ADN objetivo a amplificar. Además, los Primers sirven de punto de inicio para el ADN polimerasa. En la tercera etapa de la Figura 1-7 se representa a los Primers como cadenas con el esqueleto de Azúcar-Fosfato de color turquesa y una flecha negra [14].
3. Elongación: Una vez completado el anillamiento es necesario que el ADN polimerasa llegue a su máxima tasa de activación y para esto la muestra se calienta a 72°C. Una vez activa el ADN polimerasa utilizará los nucleótidos libres del entorno que se introdujeron al inicio para reconstruir la doble hélice de ADN tomando como punto de inicio la secuencia de los Primers [14].

Esta secuencia de pasos se realiza iterativamente en lo que se conoce como ciclos. Conforme a más ciclos más material genético de interés se obtiene y más fácil es su identificación. En la Figura 1-7 se puede apreciar cómo son los dos primeros ciclos de una PCR y como con cada iteración más dobles cadenas cuya longitud es exactamente la que se busca se crean (Las dobles cadenas con el esqueleto de Azúcar-Fosfato superior e inferior de color turquesa) [14]. A continuación, se detallan los materiales utilizados para el proyecto de amplificación de ADN en LOC (Lab On Chip) en este proyecto en particular:

Tabla 1-1. Materiales utilizados para el ensayo de PCR

Material	Referencia
Kit de PCR “MyTaq Red DNA Polymerase”	BIO21109 Bioline
DNA “Jurkat Genomic DNA”	BIO21109 Bioline
Primers “Primer PCR ASSay GAPDH	10025636 BIORAD
Agente intercalante de DNA fluorescente “SYBR Safe DNA gel Stain”	S33102 Invitrogen

1.6 LAMP

Otro de los métodos utilizados para la amplificación de ADN en el proyecto es el Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Este método consigue amplificar cadenas específicas de ADN a una temperatura constante de 65°C, lo que supone una ventaja al simplificar significativamente el proceso, y además amplifica las cadenas de ADN objetivo en menor tiempo [15].

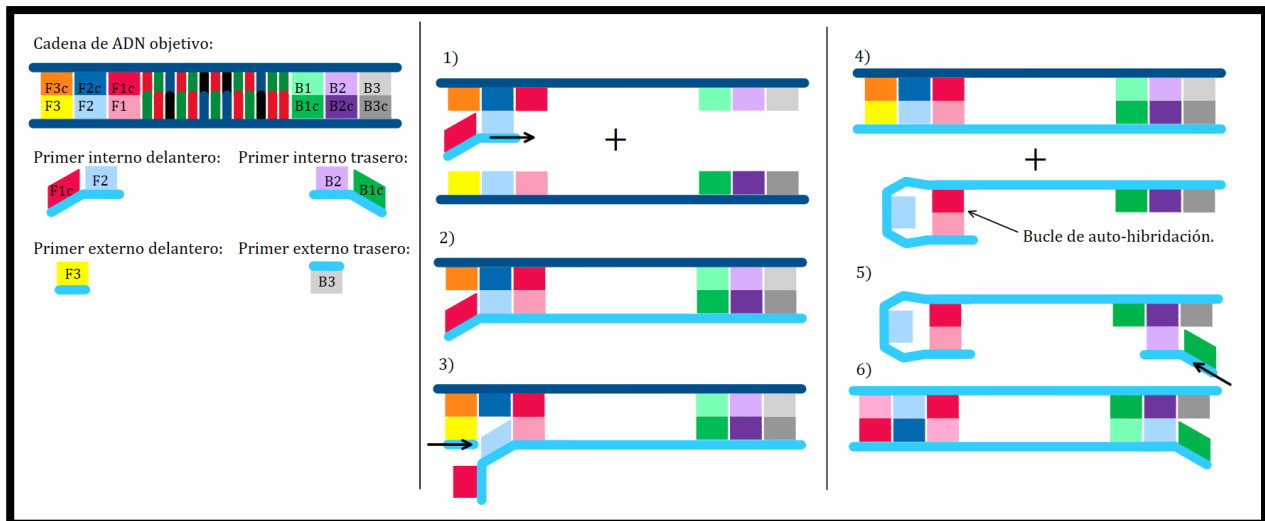


Figura 1-8. Diagrama de la amplificación de ADN mediante el método LAMP. Parte 1

Para este método de amplificación auto cíclica es necesario utilizar cuatro tipos de Primers diferentes, que actuarán una vez identificada la cadena de ADN objetivo. Se pueden dividir estos cuatro Primers en dos categorías las cuales son interno y externo. Los Primers internos delantero y trasero (que entre sus dos secuencias principales tienen un separador TTTT) se centran en encontrar las secuencias de nucleótidos F2c y B2c respectivamente e hibridarse a ellas. Los Primers externos delantero y trasero buscan la cadena de nucleótidos F3c y B3c respectivamente, ubicadas en los extremos de la cadena de ADN objetivo [15].

El proceso comienza cuando a la muestra de ADN y los Primers enfriados en hielo se le añade el ADN polimerasa y se calienta todo en conjunto a 65°C. La secuencia de pasos acontece de la siguiente manera [15]:

(Fig. 1-8. 1) el Primer interno delantero hibrida, dando paso al ADN polimerasa para reconstruir la secuencia complementaria con nucleótidos libres en el medio tomando como punto de partida las cadenas de nucleótidos F2-F2c [15].

(Fig. 1-8. 2). Tras esto entra en acción el Primer externo delantero, que hibrida con F3c [15].

(Fig. 1-8. 3) El paso anterior deja el camino libre para que el ADN polimerasa reconstruya a partir de la Hibridación F3c-F3, desplazando la doble cadena que se había formado por la labor del Primer delantero interno y separándola, obteniéndose la secuencia F1c-F2-F1- -B1c-B2c-B3c [15].

(Fig. 1-8. 4). En este punto, aunque en la doble cadena de la cuarta etapa ocurrirán otras hibridaciones y ampliaciones de ADN el ejemplo se centra en la cadena simple antes mencionada, en la que ocurre un proceso llamado buble de auto hibridación al hibridar las secuencias F1c-F1 [15].

(Fig. 1-8. 5) Entra en acción en este momento el Primer interno trasero el cual hibrida en B2c permitiendo así que el ADN polimerasa reconstruya la doble hélice [15].

(Fig. 1-8. 6). Análogamente a como ocurrió en la etapa 3 y 4 [15].

(Fig. 1-9. 7) El Primer externo trasero hibrida en B3c provocando con la acción del ADN polimerasa unas nuevas doble y simple cadena de ADN [15].

(Fig. 1-9. 8). Este es un punto clave del proceso, pues sobre la cadena simple F1-F2c-F1c- -B1-B2-B1c (a la cual por su forma se le apoda como estructura de mancuerna) comienzan una serie de hibridaciones, reconstrucciones y ampliaciones de cadenas de ADN (Fig. 1-9. 9-13 y Fig. 1-10. 14-16) con las que se obtendrán dobles cadenas de ADN replicadas cíclicamente (Fig. 1-10. 17). Cabe resaltar que a partir de la etapa 8 se inicia la llamada fase de Amplificación, en la que sólo intervienen primers internos en la generación de nuevo material genético [15].

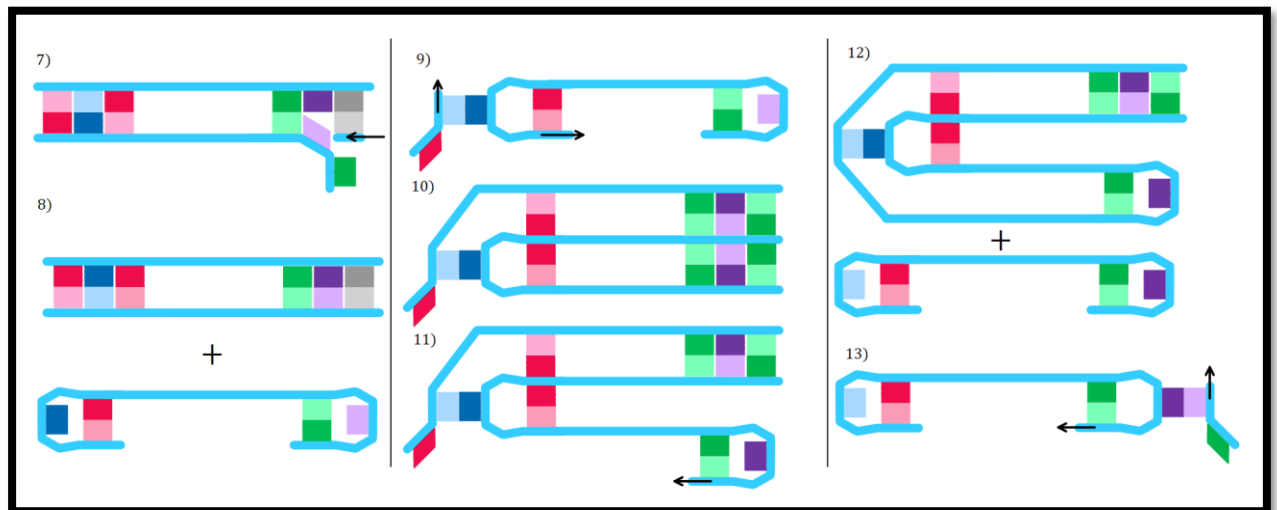


Figura 1-9. Diagrama de la amplificación de ADN mediante el método LAMP. Parte 2

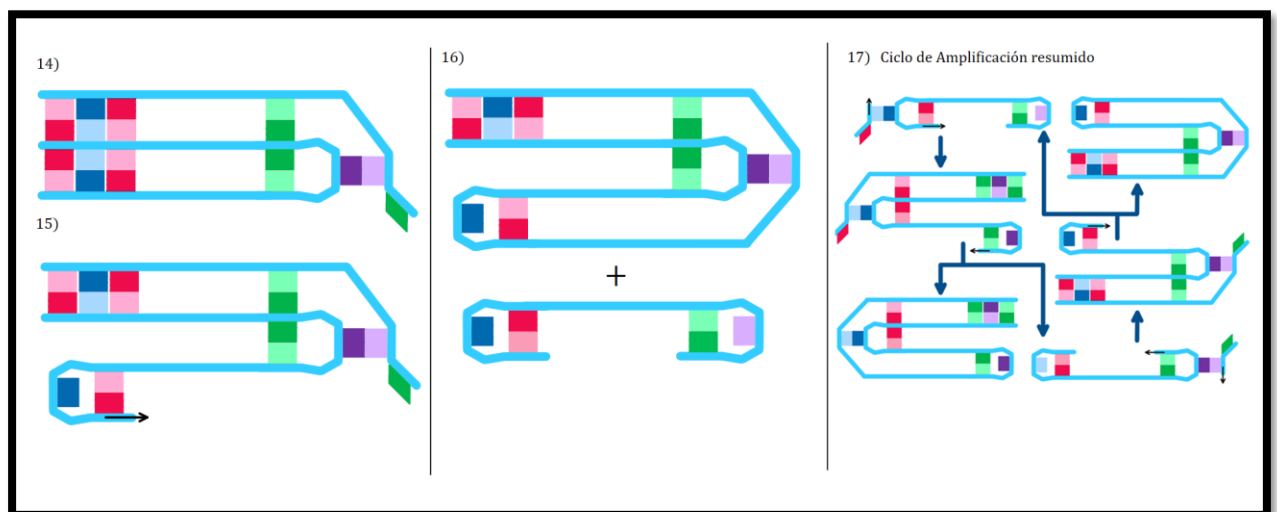


Figura 1-10. Diagrama de la amplificación de ADN mediante el método LAMP. Parte 3

Por último, se muestran los componentes específicos utilizados para la realización de los ensayos que serán objeto de estudio en este proyecto:

Material	Referencia
Kit de LAMP "SARS-CoV-2 Rapid Colorimetric LAMP Assay Kit"	E2019S New England Biolabs
DNA control interno "Jurkat Genomic DNA"	SD1111 Thermo Scientific
Primers "Primer PCR ASSay GAPDH"	10025636 BIORAD
DNA "SARS-CoV-2 Positive Control (N Gene)"	N2117S New England Biolabs

1.6.1 QPCR y QLAMP, métodos de detección de la amplificación de ADN.

Aunque los métodos de PCR y LAMP son bastante fiables, es conveniente introducir una manera de poder detectar si la amplificación se ha realizado con éxito más rápida que una comprobación del contenido de la muestra al microscopio. Las formas de detección descritas a continuación permiten incluso realizar un seguimiento de la amplificación en tiempo real, llevando a un nuevo nivel a estos métodos de amplificación. Estos métodos disciernen entre cuantificación absoluta, en la que se cuantifican las moléculas objetivo-amplificadas, y la cuantificación relativa, dónde los resultados de una muestra se clasifican en contraste a otros resultados. Para distinguirlos de los métodos convencionales se les apoda como QPCR y QLAMP (quantificación) [14].

Una de las formas más usadas para la cuantificación de resultados de PCRs es la utilización de fluoróforos explicados en el capítulo anterior. En concreto, se utiliza una variedad de fluoróforo como el de SYRB-Green, que al adherirse a las dobles cadenas de ADN hace posible el fenómeno de fluorescencia, de manera que la intensidad de la luminiscencia está correlacionada con el número de dobles cadenas de ADN presentes en la muestra [14]. Es importante resaltar que estos fluoróforos se adhieren a cualquier doble cadena, no sólo aquella que el método PCR amplifica, por lo que es de vital importancia evitar la contaminación de agentes como pueden ser los dímeros de los primer [14].

Con respecto al ensayo de LAMP y para nuestro caso particular se realiza un ensayo colorimétrico, el cual al inicio de la prueba tiene un color rosa que en caso de resultar positivo se tornará amarillo, tal y como se aprecia en la Figura 1-11

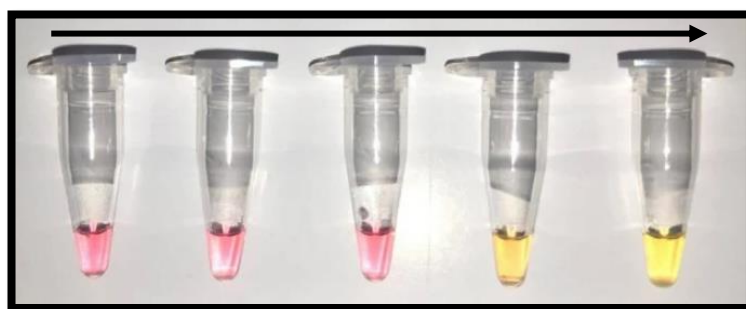


Figura 1-11. Detector colorimétrico de del de agarosa usando RT-LAMP. [16].

1.7 Tecnología LOC

La tecnología Lab on chip, también conocida como "micro-total analysis system" (μ TAS) nace de la necesidad por parte de ramas de la ciencia como la microfluídica y microelectrónica de establecer un espacio de trabajo común y a una escala lo suficientemente reducida; a veces tan reducida que se pueden llegar a realizar ensayos de la escala de laboratorios enteros en el espacio que ocupa la palma de la mano, de ahí el nombre con el que se conoce este tipo de dispositivos.

Las ventajas que presenta esta revolucionaria tecnología son inmensas, no sólo la ventaja en espacio si no también mayor facilidad para la industrialización, bajo coste en comparación a las metodologías tradicionales, mejores transferencias térmicas y posibilidad de realizar múltiples funciones con el mismo dispositivo entre otras [17].

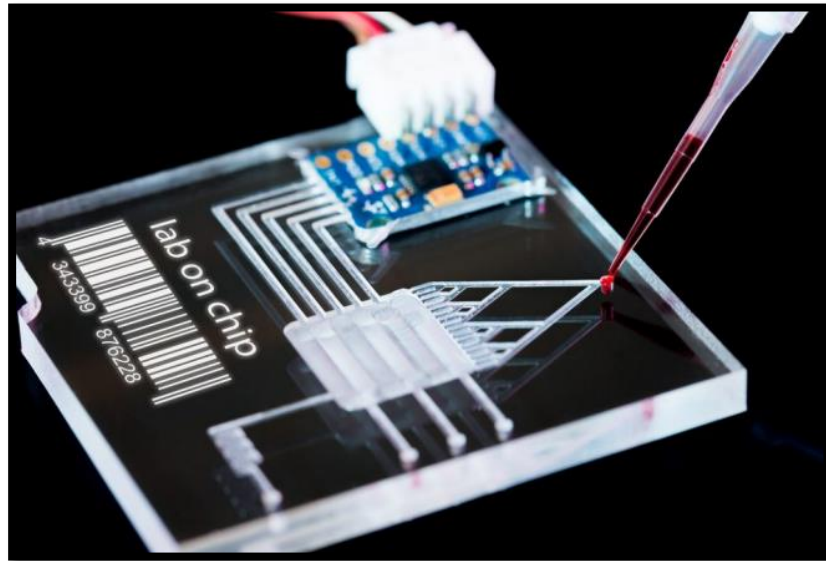


Figura 1-12. Lab-on-chip para diagnóstico de leucemia infantil [14].

Para el caso particular de la realización PCR's mediante tecnología LOC sobre el cual se estudia la viabilidad de implementar técnicas de espectrometría con el fin de analizar los resultados de los ensayos, surge la necesidad de utilizar materiales con alta transparencia óptica, sin que dejen de ser biocompatibles ni provoquen dificultades en lo referente a la transmisión de calor. Como detalla Cabello Valverde [17], el estudio de materiales que cumplan estos requisitos es extenso, entre los cuales se encuentran tres grandes grupos: el cristal, el silicio y diferentes polímeros, de los que destacaremos los polímeros termoplásticos por tener ventajas en el proceso de fabricación.

De entre la gran gama de termoplásticos existentes en este proyecto se utilizará el PMMA (Polimetilmetacrilato) como material para la construcción de LOCs.

2 EVALUACIÓN DEL ESPECTRÓMETRO

Una vez establecidos los fundamentos teóricos necesarios para la comprensión del trabajo realizado, se pasa al punto práctico en el cual se especificarán los diversos ensayos realizados para evaluar el funcionamiento del espectrómetro en un entorno adecuado y sus resultados.

2.1 Caracterización de los ensayos.

Las medidas tomadas se recolectan mediante un software de evaluación (Minispectrometer_H-micro edition, versión 1.01.0003) proporcionado por la empresa Hamamatsu, en el rango de respuesta espectral del espectrómetro C12880MA con adaptador para conexión a ordenador C13985, que va de 340 a 850nm [11]. El espectrómetro toma medidas de la intensidad lumínica detectada en cada longitud de onda, en un rango de 0 a 4000 [11]. La medida de la intensidad lumínica se escalará a un rango comprendido entre 0 y 1.

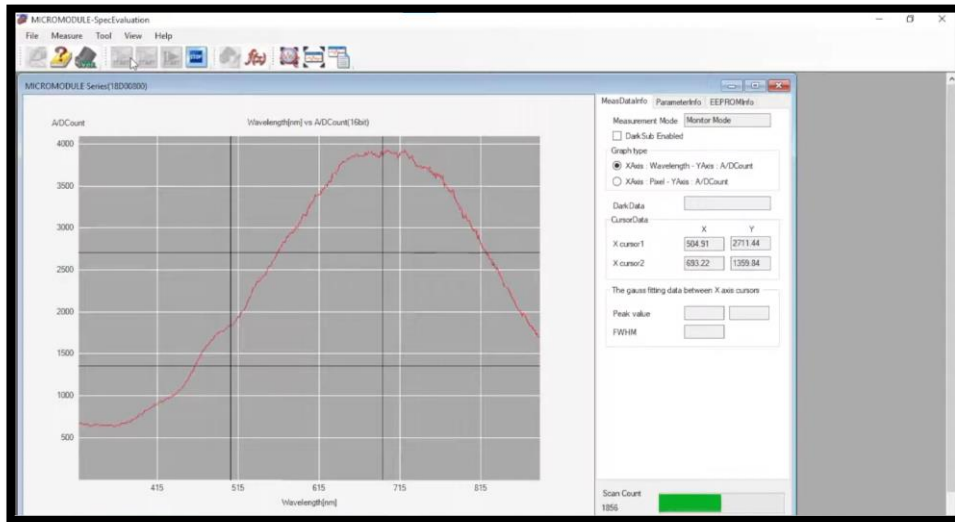


Figura 2-1. Software de evaluación del espectrómetro en proceso de tomar muestras.

Para poder realizar las pruebas con un entorno adecuado en el que no exista contaminación lumínica por otras fuentes ajenas a las implicadas en cada ensayo, se pone de manifiesto la necesidad de fabricar un encapsulado utilizando herramientas de modelado y una impresora 3D. El encapsulado debe cumplir las siguientes premisas: Ser totalmente opaco, proporcionar una apertura para permitir el paso de la luz (Figura 2-2, parte 1), poder introducir un porta muestras con la muestra del ensayo alineado entre la apertura de la fuente de iluminación y la ubicación del espectrómetro (Figura 2-2, parte 2) y tener la capacidad de contener al espectrómetro fijo en el fondo del encapsulado (Figura 2-2, parte 3).

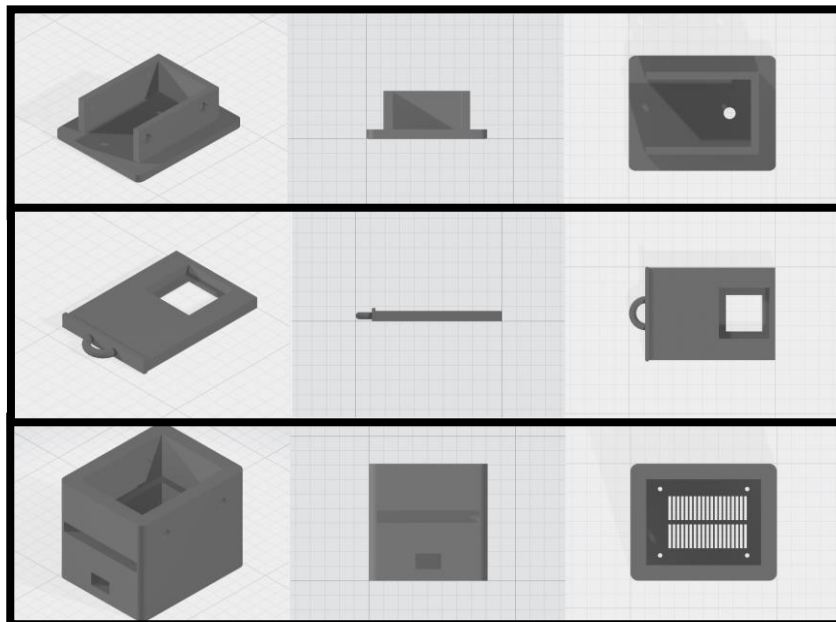


Figura 2-2. Vistas de las partes 1, 2 y 3 del encapsulado.

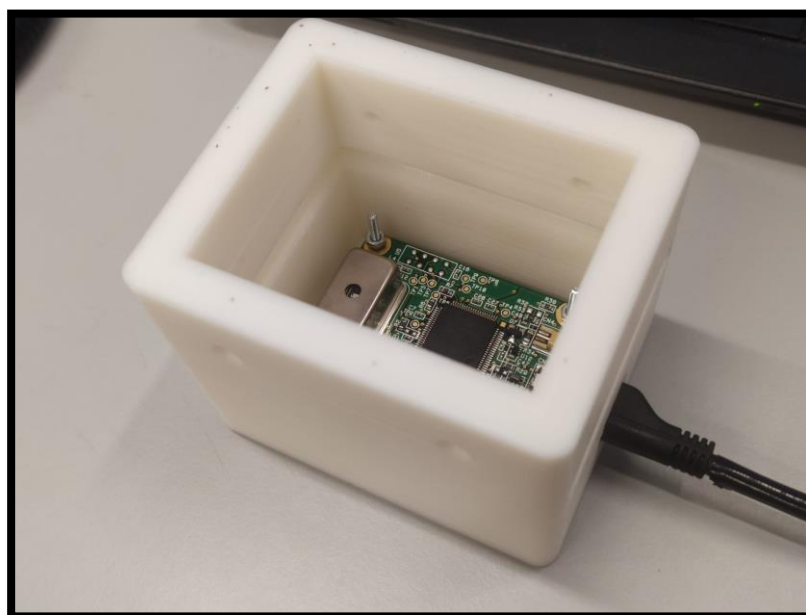


Figura 2-3. Imagen de la parte 3 del encapsulado con el espectrómetro conectado

Una vez se le ha proferido un entorno adecuado al espectrómetro para realizar los ensayos, lo primero en lo que se incurre es en realizar ensayos de absorbancia de diferentes fuentes lumínicas y elementos. Para ello, realizaremos siempre dos medidas: la muestra en ausencia total de luz y la muestra con la fuente de luz activadas y procederemos a sustraer la una a la otra, contrarrestando el ruido residual que pueda haber al tomar medidas.

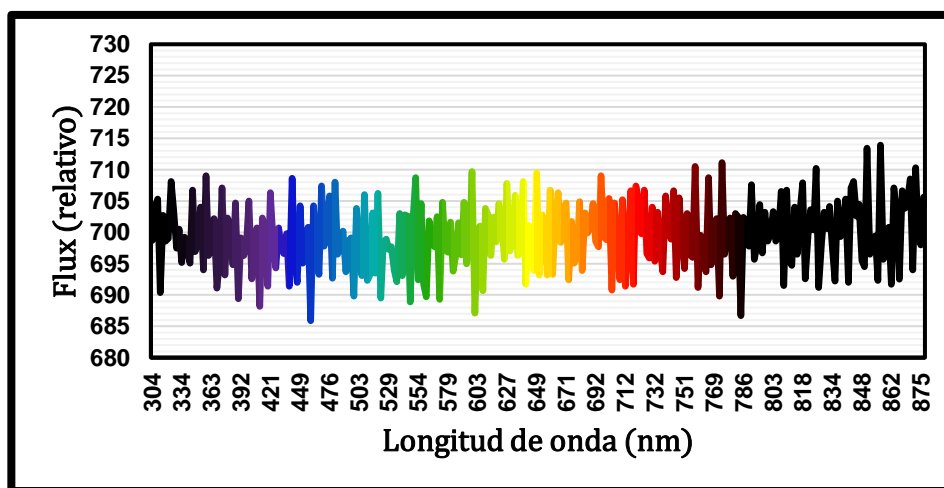


Figura 2-4. Muestra de ruido residual con filtro de espectro visible

2.2 Medición del espectro de emisión de diferentes LEDs

Con el fin de familiarizarnos con el espectrómetro así como verificar su correcto funcionamiento se seleccionan tres tipos de LEDs: azul, verde del modelo C503B-BCS/BCN/GCS/GCN [19] y blanco del modelo C512A-WNS/WNN [19]. Tras obtener los espectros de cada LED se comparan con sus respectivas hojas de datos.

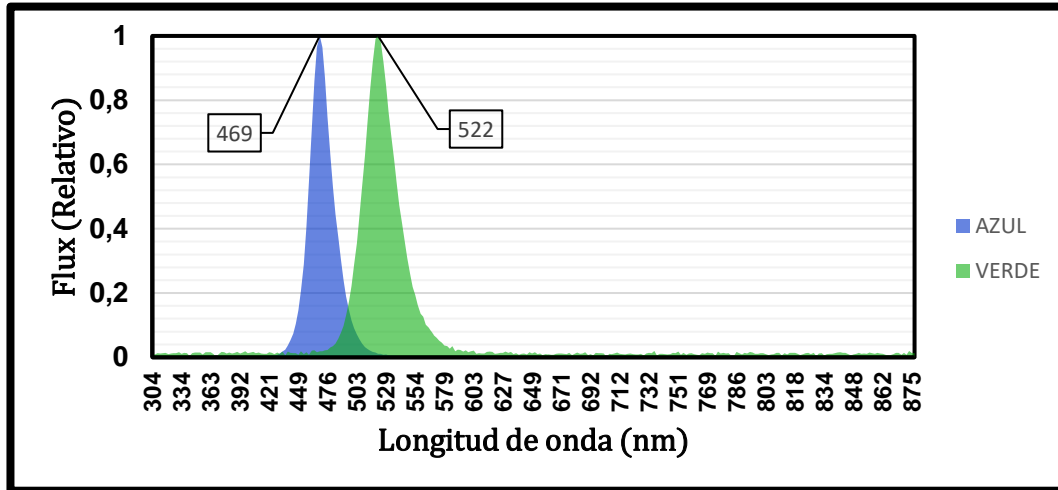


Figura 2-5. Espectro de LEDs azul y verde recogidos por el espectrómetro Hamamatsu

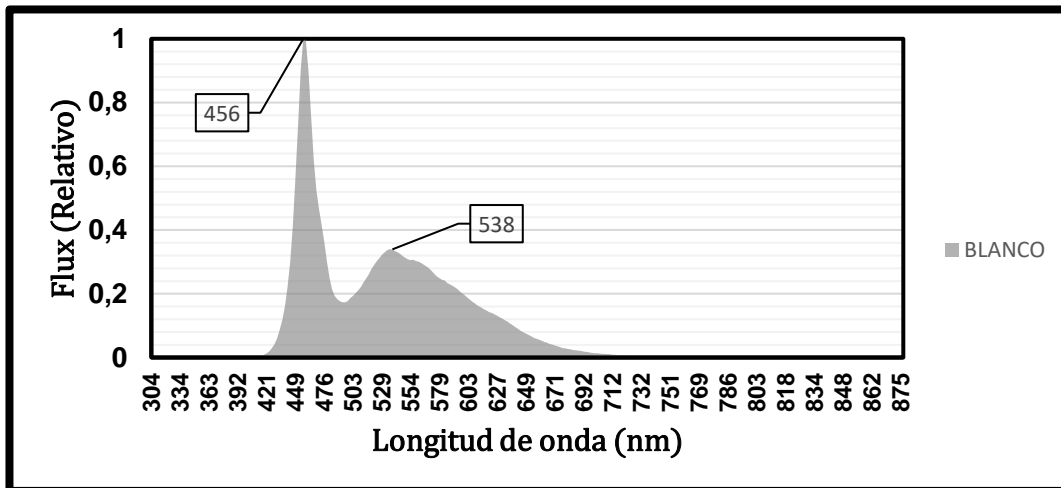


Figura 2-6. Espectro de LED blanco recogido por el espectrómetro Hamamatsu

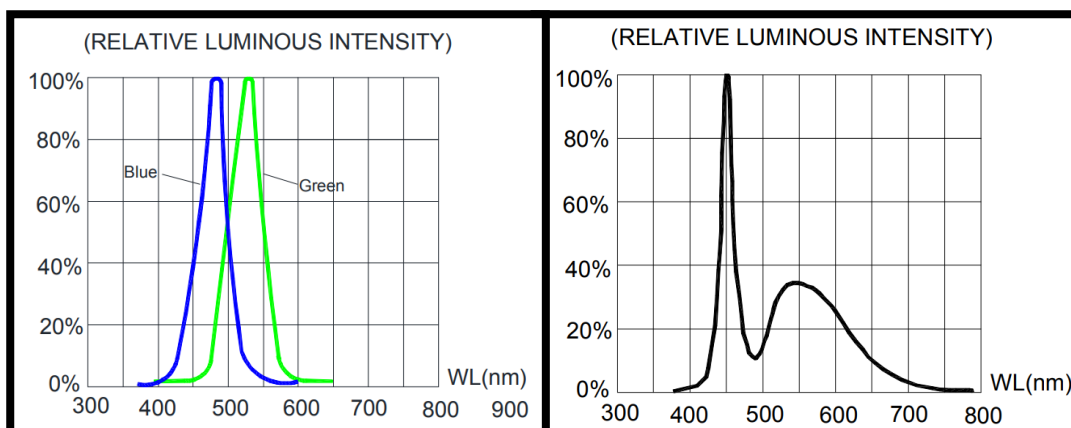


Figura 2-7. Intensidad luminosa relativa teórica de LEDs azul y verde (izquierda) y blanco (derecha)

Al revisar primero la Figura 2-5 y compararla con la Figura 2-7 se aprecia una similitud cualitativa. Por otra parte, en la hoja de datos de estos LEDs modelo C503B-BCS/BCN/GCS/GCN se incluyen referencias sobre el punto máximo de intensidad lumínica, el cual para el modelo azul oscila entre los 475 a 480nm y para el modelo verde se encuentra en rangos de 530 a 535nm según el modelo, por lo que se puede concluir que hay

coincidencias más que suficientes, sabiendo que la mínima resolución del espectrómetro es de 15nm.

En cuanto al LED blanco modelo C512A-WNS/WNN también se aprecian similitudes cualitativas a pesar de que en la hoja de datos no incluye explícitamente referencias sobre los puntos máximos de intensidad lumínica.

2.3 Medición de espectro de emisión de una lámpara fluorescente

Para este caso concreto se realiza una medición del espectrómetro aproximando a él una lámpara fluorescente del laboratorio, sin ningún elemento interponiéndose entre el espectrómetro y la fuente de luz, dando como resultado el gráfico de la Figura 2-9 notablemente similar al espectro de la Figura 2-9 proporcionado por C. Tapia, A. Sánchez de Miguel & J. [21]

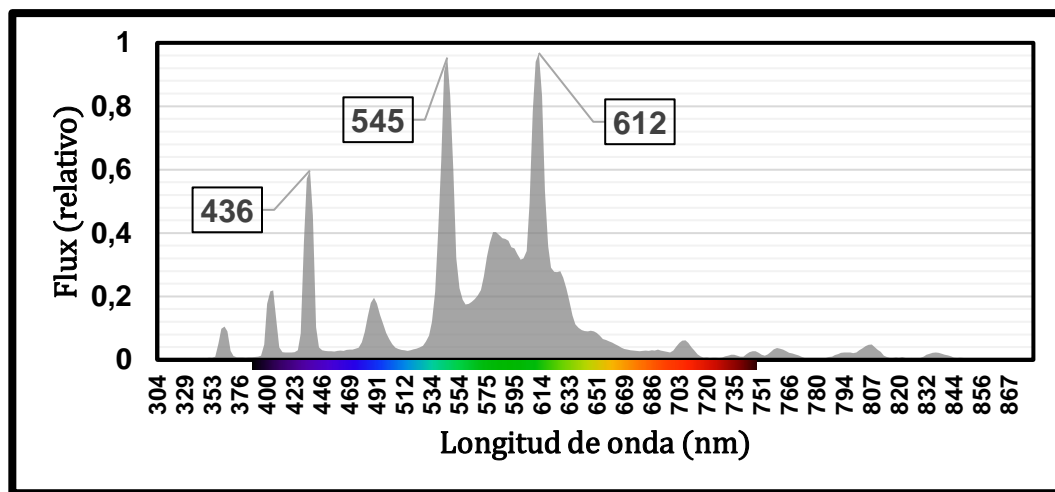


Figura 2-8. Espectro de iluminación fluorescente recogido por el espectrómetro Hamamatsu

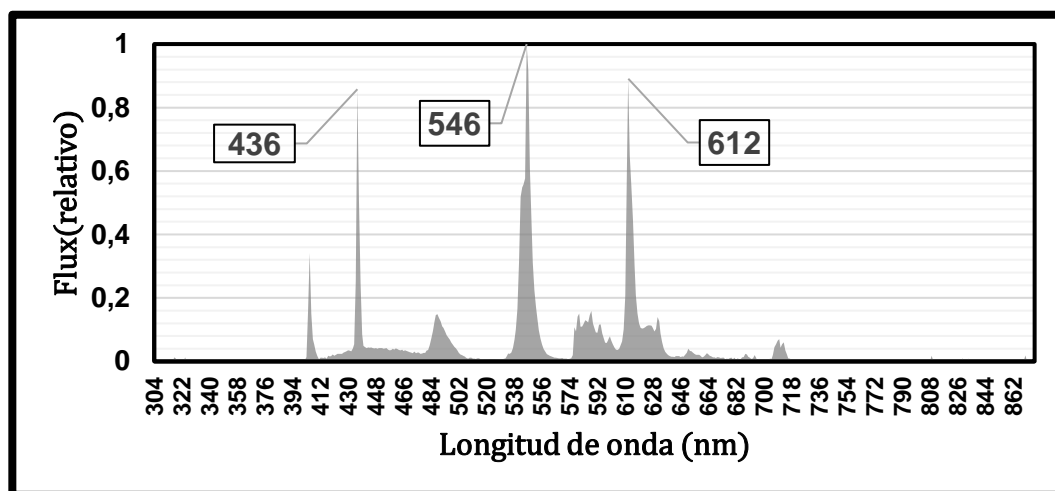


Figura 2-9. Gráfico tomado de Tapia, A. Sánchez de Miguel & J. Zamorano (2015) "LICA-UCM sobre lámpara fluorescente de 3952K. [21]

A título cuantitativo podemos decir que los principales máximos de emisión recogidos por el espectrómetro (Figura 2-8) se ubican en las mismas longitudes de ondas que la proporcionada en la Figura 2-9.

2.4 Elaboración de un entorno adecuado para la toma de mediciones.

Uno de los objetivos principales de este proyecto es determinar la viabilidad del espectrómetro como método de detección de resultados de PCR y LAMP a escala lab-on-chip. Se plantea pues la necesidad de crear un sistema de encapsulado que permita realizar la inspección de muestras adecuadamente con el uso del espectrómetro en un entorno lo más fiel posible al utilizado en los ensayos de PCR y LAMP a escala lab-on-chip, el cual se realiza en metacrilato fresado. Se utilizarán pues láminas de metacrilato fresadas con precisión mediante el uso de programas de cálculo numérico. Esta pieza se colocará sobre la parte 2 del encapsulado.

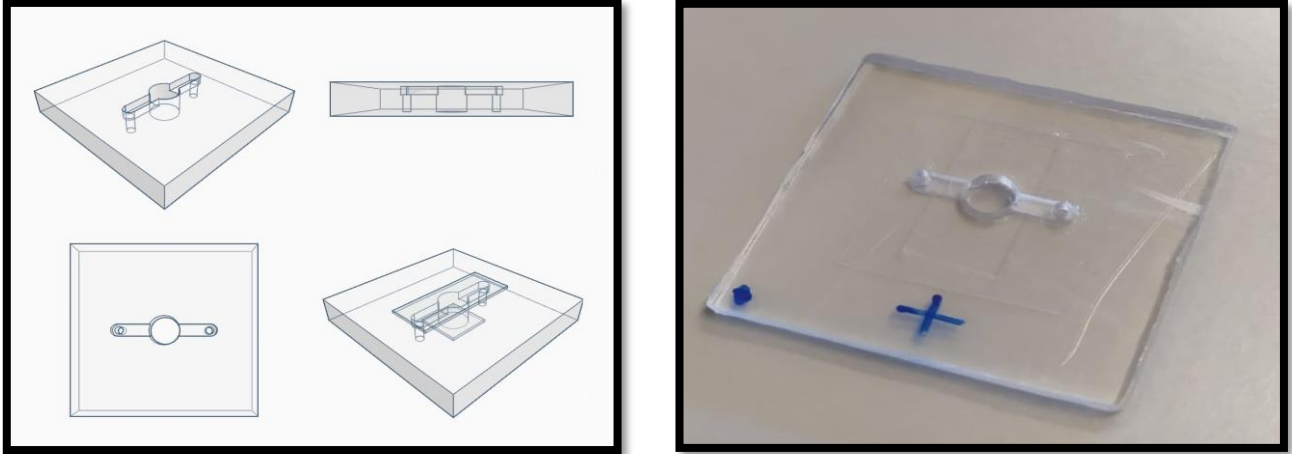


Figura 2-10. Vistas de la placa de metacrilato modificada. Figura 2-11. Imagen de pieza de metacrilato fresada.

Una vez diseñada y construida la pieza de metacrilato, colocamos unas láminas adhesivas transparentes especializadas en no impedir el paso de la luz (Figura 2-14) para que no se escapen los fluidos a analizar. La aportación de la muestra a la pieza de metacrilato se realiza mediante el uso de pipeta graduada, que introduce en las perforaciones de los extremos una cierta cantidad de líquido.

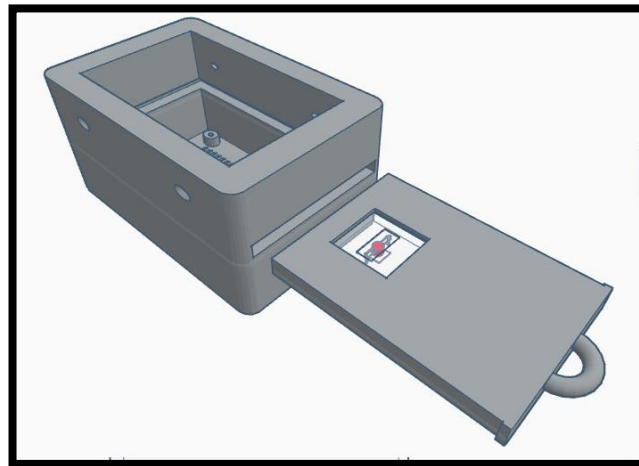


Figura 2-12. Procedimiento para realizar un ensayo.

2.5 Medición de la absorbancia del medio de cultivo DMEM con Phenol RED

El DMEN es un agente utilizado en los medios de cultivo para proporcionar un entorno adecuado para ensayos de microbiología. Este medio de cultivo se combina con el Phenol RED para indicar cambios de pH mediante un cambio colorimétrico. Al tener unas características adecuadas para la espectrometría y ser un elemento utilizado con regularidad en ensayos del laboratorio, se procederá a realizar una prueba de absorbancia con múltiples muestras de DMEN las cuales tienen agregadas diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. Este agregado se realiza para aumentar el nivel de pH y forzar un cambio colorimétrico apreciable en el DMEM, sabiendo que el DMEM tiene sus picos máximos de absorbancia en 415 y 560nm [22].

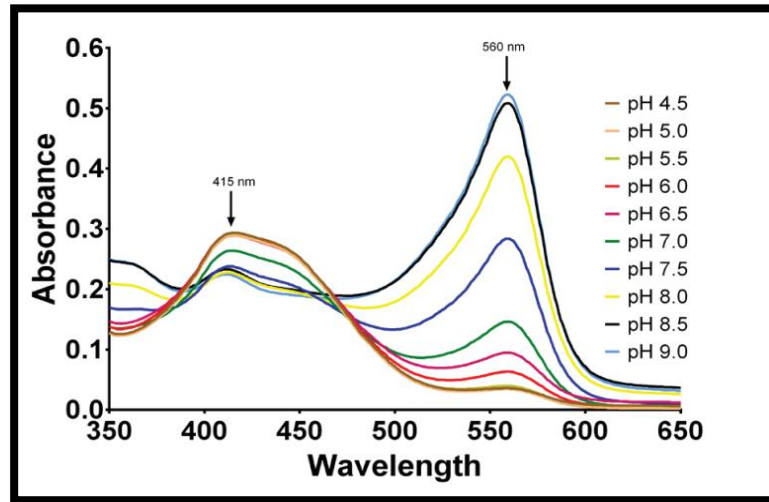


Figura 2-13. Absorbancia espectral de DMEM para diferentes niveles de pH

Para esto se coloca el espectrómetro en el encapsulado, se enfrenta al espectrómetro un LED blanco Frío a una distancia de 90mm de la caja de protección del espectrómetro. Entre el espectrómetro y el LED se colocan las cuatro soluciones con la misma cantidad de medio de cultivo DMEM en una cubeta a las que se les ha diluido 0, 0.05 y 0.1 ml de lejía, dando como resultado las muestras de Control, DMEM50 y DMEM100.

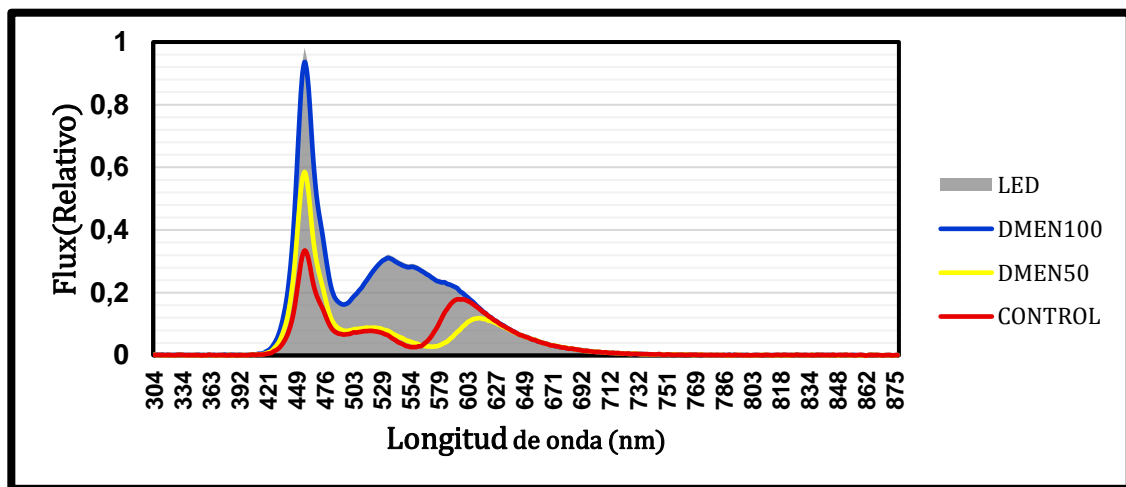


Figura 2-14. Gráfico de transmitancia correspondiente a la muestra de DMEM

Los resultados mostrados en la Figura 2-14 señalan una clara depleción en los valores cercanos a 560nm

cuanto más concentrada es la muestra en comparación a los niveles de intensidad lumínica captados sin interponer muestras de DMEM (área gris), pero para asegurarnos utilizaremos la ley de Lambert-Beer para pasar de transmitancia a absorbancia. Cabe destacar que al no elegir una luz que contenga una intensidad adecuada en torno a 415nm se descartan los resultados que puedan dar este ensayo con respecto a esa zona.

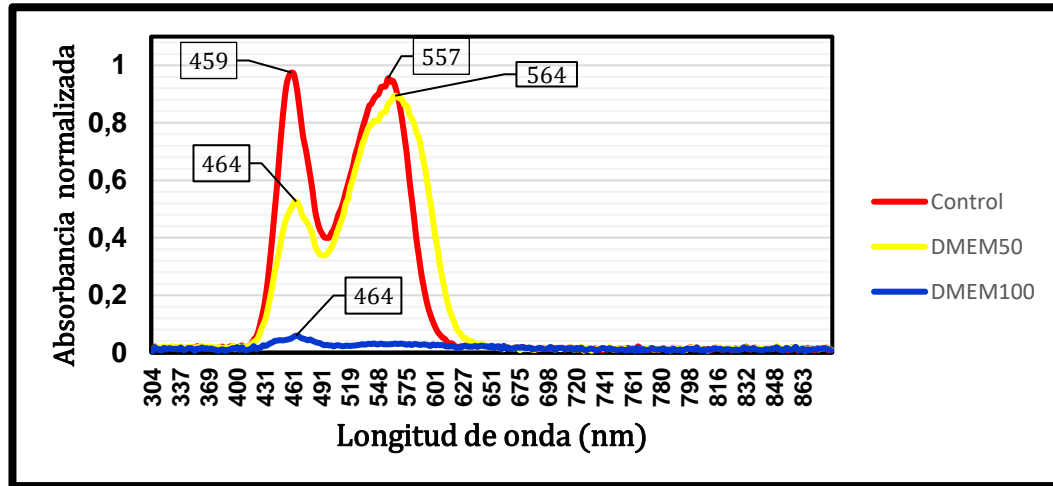


Figura 2-15. Gráfico de absorbancia correspondiente a la muestra de DMEM

Al transformar los datos adquiridos de transmitancia a absorbancia se aprecia mejor entorno a qué longitud de onda está concentrada la capacidad de absorción. Para nuestro caso coincide con uno de los máximos de la Figura 2-15. Pese a que los resultados no son los óptimos, al apreciarse una coincidencia teórica y práctica en torno al máximo de absorbancia de 560nm, se da por satisfecho el ensayo.

3 MEDIDAS DE ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA EN MUESTRAS DE PCR.

En este punto del proyecto queda más que aprobada la evaluación de las medidas tomadas por el espectrómetro, por lo que el siguiente paso resulta en realizar medidas sobre un kit de PCR en el que se pueden modificar las cantidades de los diferentes componentes, simulando los realizados en el laboratorio mediante técnicas lab-on-chip. A diferencia de los ensayos previos, al ser este un ensayo de fluorescencia se busca detectar que la propia muestra irradie luz en un entorno cercano a los 530nm al ser excitada. La muestra tiene un pico máximo de absorción alrededor de los 502nm por lo tanto utilizaremos como fuente emisora de luz un LED centrado en 470nm que bajo la intensidad adecuada llegará a excitar a la muestra en rangos de hasta 530nm [23].

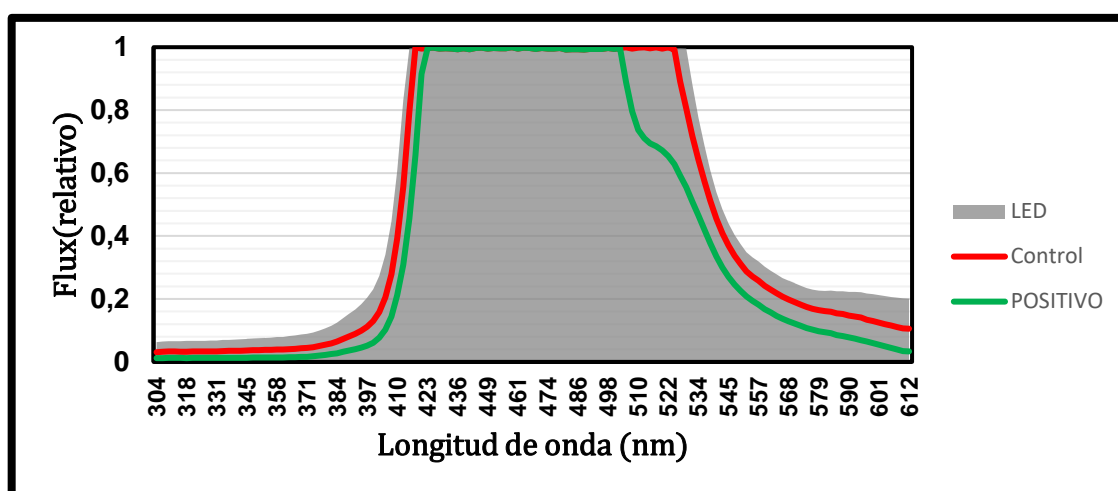


Figura 3-2. Espectro del ensayo de PCR

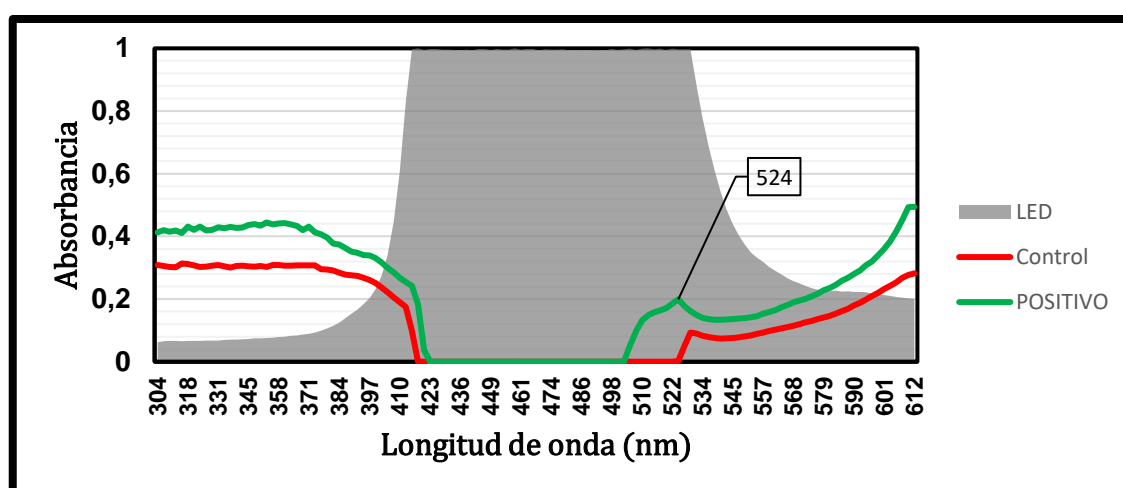


Figura 3-1. Absorbancia del ensayo de PCR

En las primeras medidas realizadas sobre ensayos de PCR realizados se aprecian valores muy parecidos a los de la Figura 3-2, dónde hay una ausencia de fluorescencia aparente. Sin embargo, al hacer una representación de la absorbancia de las medidas realizadas en todas se aprecia cómo en la Figura 3-1 que en la zona de 524nm hay un máximo local de absorbancia, posiblemente acción de los fluoróforos.

En este punto se puede hipotetizar que o bien la muestra no está lo suficientemente dopada de fluoróforos cómo para que sea apreciable por el espectrómetro o bien la luz que es arrojada sobre la muestra carece de intensidad lumínica suficiente como para excitar los fluoróforos hasta el punto en el que estos empiecen a emitir luz, cosa que podría ocurrir si no hubiera la suficiente amplificación de ADN. Dado la potencia del LED y que este satura el espectrómetro en las medidas se apuesta más por la primera explicación, conduciendo esto a hacer una nueva medición ahora con una muestra que tenga cuatro veces la cantidad de fluoróforos.

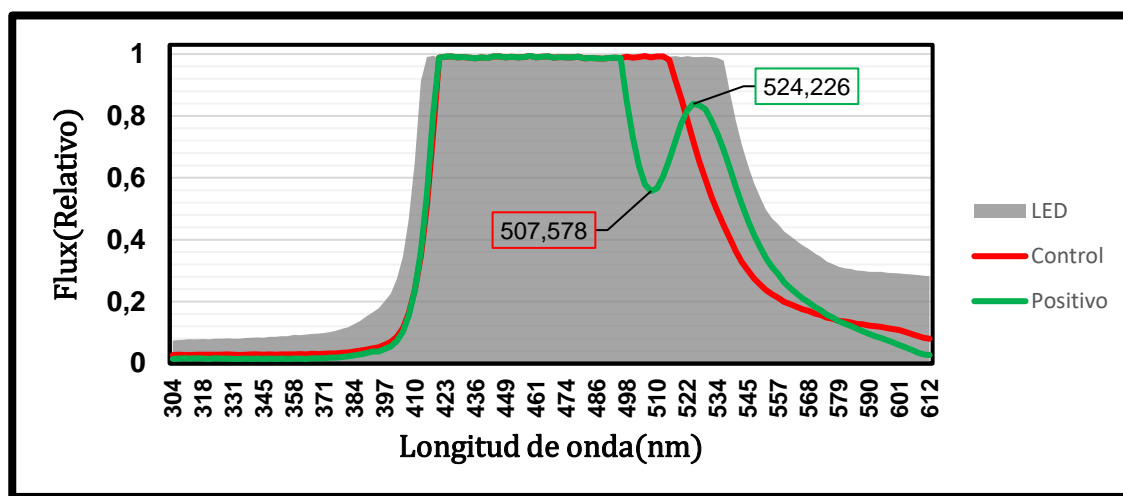


Figura 3-3. Espectro del ensayo de PCR hiper dopado

Tras realizar esta última medida se muestra una clara zona de absorción por parte de la muestra positiva con máximos en 507nm y una notable zona de emisión de fluorescencia con el punto máximo ubicado en 524nm. Esto nos confirma que los fluoróforos funcionan y por lo tanto el espectrómetro con el cual se está realizando el proyecto es válido cómo método de detección de PCRs en Lab on chips.

El problema principal en este punto del proyecto es que para realizar una detección efectiva la muestra debe tener un nivel de fluoróforos inalcanzable en los ensayos realizados hasta la fecha, esta y otras dificultades hacen que se decida explorar las posibilidades de ampliación de ADN por el método LAMP.

4 MEDIDAS DE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN EN MUESTRAS DE LAMP.

De tal manera, se busca determinar la viabilidad de usar un espectrómetro para la detección de resultados de pruebas de LAMP. En este método de amplificación de ADN cuyos resultados son comprobables por colorimetría las muestras pasarán de un color rosa a un color amarillo en caso de dar positivo. Si la muestra se mantiene en el color inicial resultará negativo (de aquí en adelante llamada muestra control) y si la muestra no transita totalmente al color amarillo quedándose de color anaranjado se considerará defectuosa.

4.1. Medición de muestras con luz incandescente como fuente lumínica

Se procede pues a hacer una prueba de espectrometría para tres muestras, una de control, otra positiva y otra intermedia de color anaranjado. Para el ensayo las tres muestras se colocarán bajo la aplicación de una luz incandescente que arrojará resultados más amplios en términos de detección que una fuente lumínica centrada en ciertas longitudes de onda.

Al tratarse de un método colorimétrico de realizar ensayos LAMP, se prestará especial atención a los picos de absorbancia de las muestras positivas y negativas, las cuales se encuentran en 434 y 560nm respectivamente [16]. Esta parte del proyecto pretende pues determinar qué longitud de onda es más fiable para analizar los diferentes resultados posibles es el objetivo de esta parte del proyecto y si las muestras positivas, negativas e intermedias pueden ser identificadas por el espectrómetro.

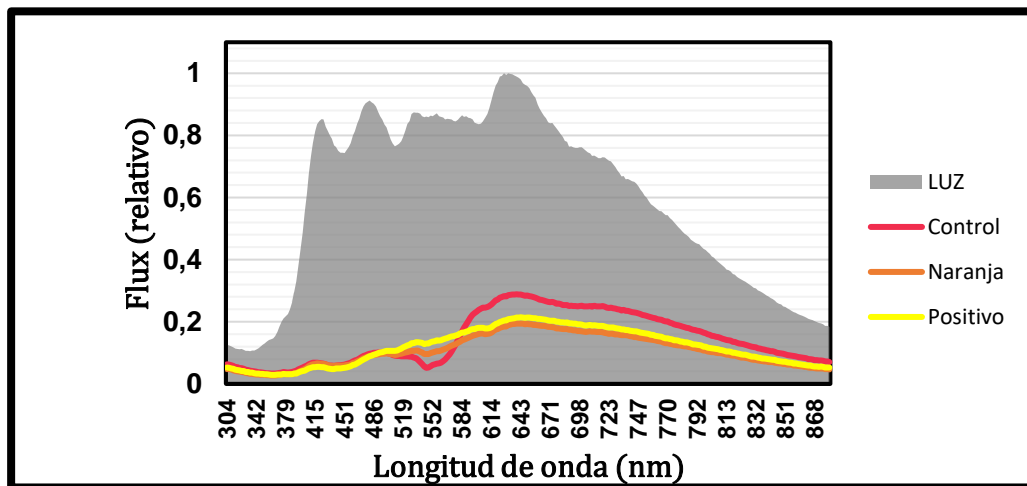


Figura 4-1. Espectro del ensayo de LAMP.

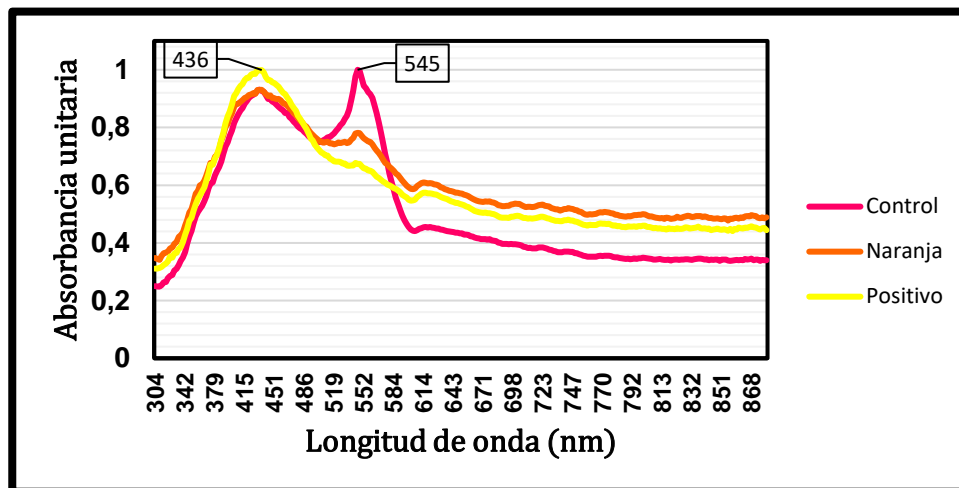


Figura 4-2. Absorbancia de muestras de LAMP para luz incandescente.

A la vista de los resultados de la Figura 4-2, y teniendo en cuenta por la Figura 4-1 que los niveles de intensidad lumínica aportados por la fuente de luz no son los mismos para todo el espectro, se puede notar que el punto de absorbancia máxima ubicado en torno a 560nm parece mucho más prometedor que el de 430nm, puesto que para muestras indeterminadas (naranja) la distancia en absorbancia entre estas y el control en 430nm es demasiado escasa.

Tabla 4-1. Medidas de Absorbancia en puntos críticos. Luz incandescente

Longitud de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
433,395	1,1346	1,1329	1,2156091
435,936	1,1293	1,134	1,2175581
558,987	1,1159	0,9145	0,79307756
561,259	1,0999	0,9042	0,78777628
Promedio			
Longitud de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
434,6655	1,132	1,1334	1,2165836
560,123	1,1079	0,9093	0,79042692

Como se aprecia en la Tabla 4-1, entre los dos puntos de máxima absorbancia, el que tiene mayor separación entre posibles resultados es el ubicado en 560nm.

No obstante, se harán medidas de absorbancia para un LED centrado en 430nm modelo CMD264-UBD [24] y un LED centrado en 560nm modelo HLMP-K600 [25], para ratificar que las diferencias de absorbancia entre muestras son relevantes también utilizando una fuente de luz que tenga como punto de máxima luminosidad cercano a 434nm y 560nm, los puntos de absorbancia máxima de las muestras positiva y negativa.

4.1 Medición de muestras con LED de 430nm como fuente lumínica

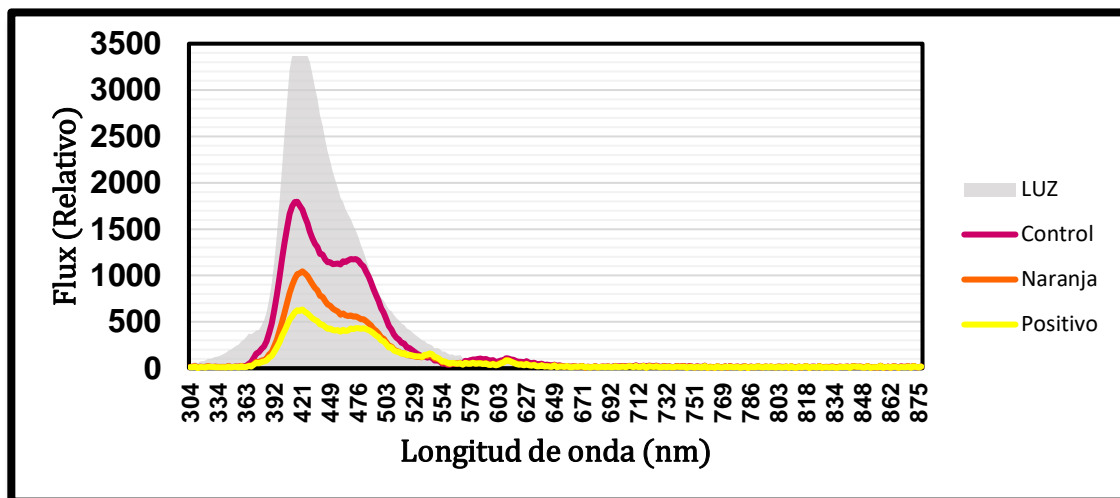


Figura 4-3. Medición de muestras de LAMP mediante espectrómetro para LED 430nm

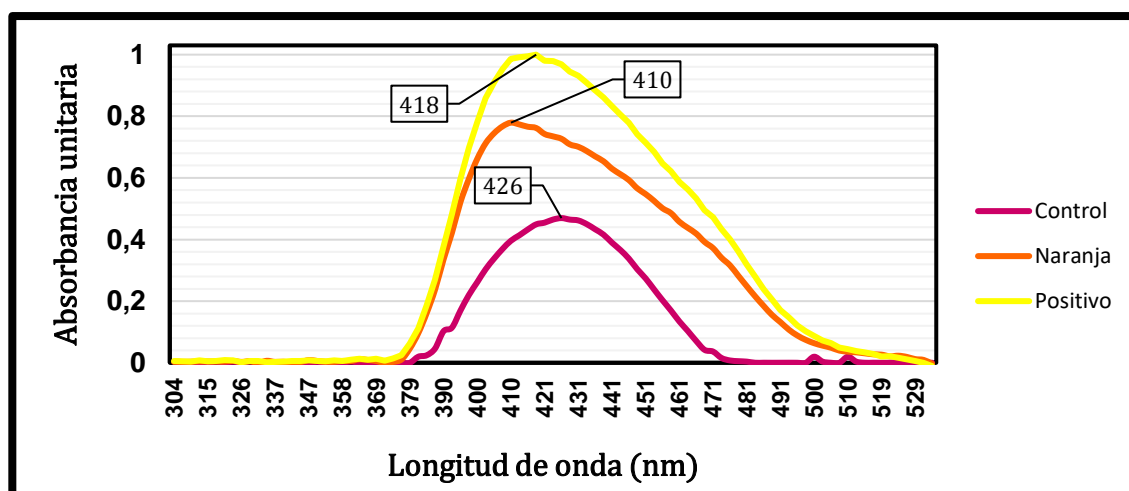


Figura 4-4. Absorbancia de muestras de LAMP para LED de 430nm.

Los resultados que se muestran en la Figura 4-4 son apreciablemente mejores que los obtenidos irradiando las muestras con luz incandescente para las mismas longitudes de onda. De manera anecdótica se puede mencionar que los máximos de absorbancia obtenidos no coinciden con los teóricos tanto como cabría esperar, esto es algo que no afectará al sistema de detección siempre que las medidas de absorbancia de las muestras estén lo suficientemente separadas entre sí.

Tabla 4-2. Medidas de Absorbancia en puntos críticos. LED 430nm

Longitud de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
410,325	0,19433853	0,3823691	0,48425201
412,905	0,20300682	0,37955352	0,48643553
415,481	0,21223189	0,37591832	0,48805397
418,053	0,22046229	0,37387479	0,49070783
420,621	0,22319754	0,36435261	0,48118026
423,184	0,2281108	0,36055058	0,4802986
433,395	0,22081787	0,33714107	0,44566768
435,936	0,21262353	0,32871932	0,43408813
Promedio			
Longitud de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
416,7615	0,21355798	0,37276982	0,4851547
434,6655	0,2167207	0,33293019	0,4398779

Debido a que estos máximos de absorbancia no se encuentran tan próximos a los teóricos, se hace esta vez un cálculo promediado de las diferencias de absorbancia entre muestras para longitudes de onda cercanas a los máximos de absorbancia tanto prácticos como teóricos, resultando así la Tabla 4-2. Ambos resultados son incluso más favorables que los de la Tabla 4-1.

4.2 Medición de muestras con LED de 560nm como fuente lumínica

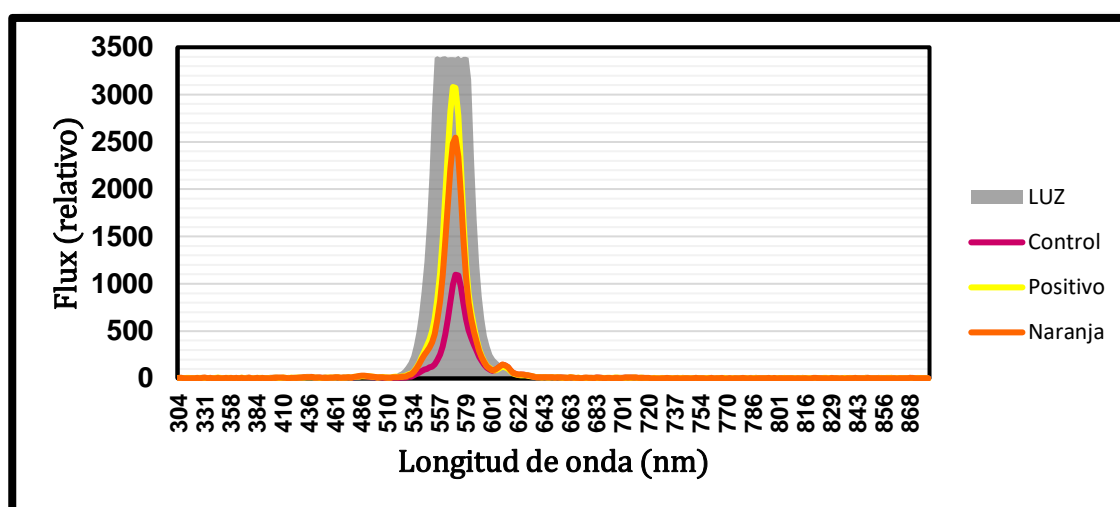


Figura 4-5. Medición de muestras de LAMP mediante espectrómetro para LED 560nm

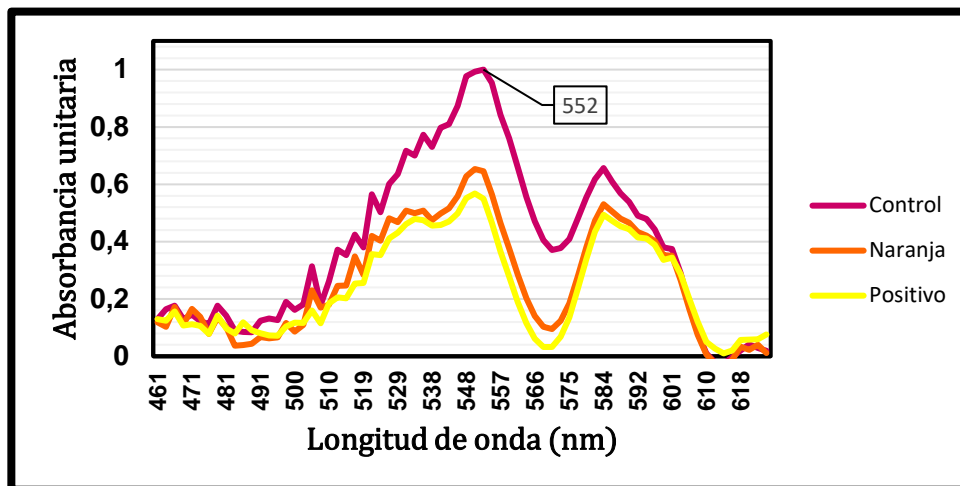


Figura 4-6. Absorbancia de muestras de LAMP para LED de 560nm.

Para el caso en el que se utiliza el LED verde como fuente lumínica, se aprecia en la Figura 4-6 las medidas de absorbancia entre positivo y control parecen estar más distanciadas lo cual es una ventaja, habrá que ver los promediados para asegurarnos que la distancia entre las medidas de absorbancia de control y naranja no es inferior a la de los casos anteriores.

Tabla 4-3. Medidas de absorbancia en puntos críticos. LED 569nm

Longitud de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
549,842	0,99294114	0,65321078	0,56789162
552,137	1	0,64540994	0,54930557
554,426	0,95327821	0,56549485	0,46548466
558,987	0,75999726	0,37633948	0,27765106
561,259	0,65902148	0,28446349	0,18913675
Promedio			
Longitud de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
552,135	0,98207312	0,62137186	0,52756062
560,123	0,70950937	0,33040148	0,23339391

La Tabla 4-3 muestra el resultado más favorable de todas las medidas de absorbancia que se han realizado con las diferentes fuentes lumínicas, en concreto para una longitud de onda cercana a los 560nm. Esto consolida este modelo de LED como el más favorecedor a la hora de proponer el sistema de detección

5 PROPUESTA DE SOLUCIÓN. DETECCIÓN MEDIANTE FOTOTRANSISTOR.

Las mediciones realizadas por el espectrómetro sobre los ensayos LAMP revelan que efectivamente es posible detectar y diferenciar las muestras: positiva, negativa o control e intermedia. Pero debido a que todo el análisis que se realiza para discernir entre tipos de muestras se hace en torno a un punto específico del espectro electromagnético visible y por tanto no hay necesidad de analizar el espectro completo, resolver la tarea de detección con un espectrómetro es sobredimensionar el problema. Además, las medidas del espectrómetro se ven un tanto desproporcionadas para la escala de tamaño a la que se trabaja en lo que a lab-on-chip se refiere.

Esclarecido a esto se llega al punto más troncal de este proyecto: proponer una solución para la detección de resultados de ensayos LAMP realizados mediante microfluídica en estructuras lab-on-chip en tiempo real. Se decide proponer como sistema de detección un fototransistor que sea incidido por un LED con suficiente intensidad lumínica de tal manera que al interponer las muestras de ensayos LAMP entre el LED y el fototransistor este último detecte las variaciones de absorbancia de las muestras, llegando a hacerlo incluso en tiempo real.

5.1 Disposición del equipo y entorno para la toma de mediciones.

Para esta parte del proyecto se utilizará un fototransistor modelo SFH 3310 con una resolución espectral de [350, 970]nm y una sensibilidad máxima en 570nm [26]. Al tratarse de un instrumento de medida nuevo primero probaremos de nuevo con los LEDs CMD264-UBD (430nm) y HLMP-K600 (560nm) con la intención de seleccionar uno de los dos.

Cómo una primera toma de contacto se configurará el fototransistor en emisor común con una resistencia de 300K Ω calibrada de forma manual. El fototransistor se conectará a un microcontrolador Arduino Mega que le proporcionará alimentación y a la vez servirá como lector analógico de medidas. Las medidas tomadas por el microcontrolador se vuelcan en tiempo real en un documento de texto mediante el software Realterm, lo que nos da la posibilidad de visualizar los resultados en tiempo real utilizando dicho documento de texto como fuente de datos de un Excel.

Con el propósito de que las medidas se tomen en un entorno lo más estandarizado posible se crea otro encapsulado 3D en el que se pueda ubicar el LED pertinente en la parte superior, el fototransistor en la inferior y dejando un espacio entre ambos para que se puedan ubicar las placas de metacrilato fresadas ex proceso para la ocasión.

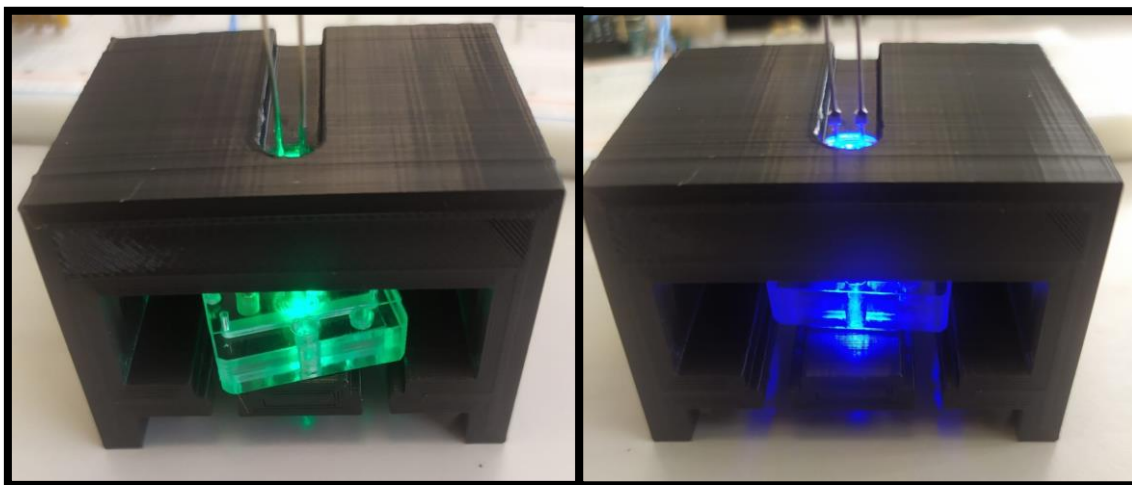


Figura 5-1. Encapsulado para medición de muestras de LAMP con Fototransistor.

5.2 Medición de muestras con LED 430nm y 560nm con fototransistor

El siguiente paso que se realiza es determinar cuáles son las medidas que son tomadas con el fototransistor. Para ello tomamos 74 medidas de muestras tanto de control cómo de positivo para la aplicación de LEDS tanto de 430nm cómo de 560nm, y obtenemos los siguientes indicadores estadísticos:

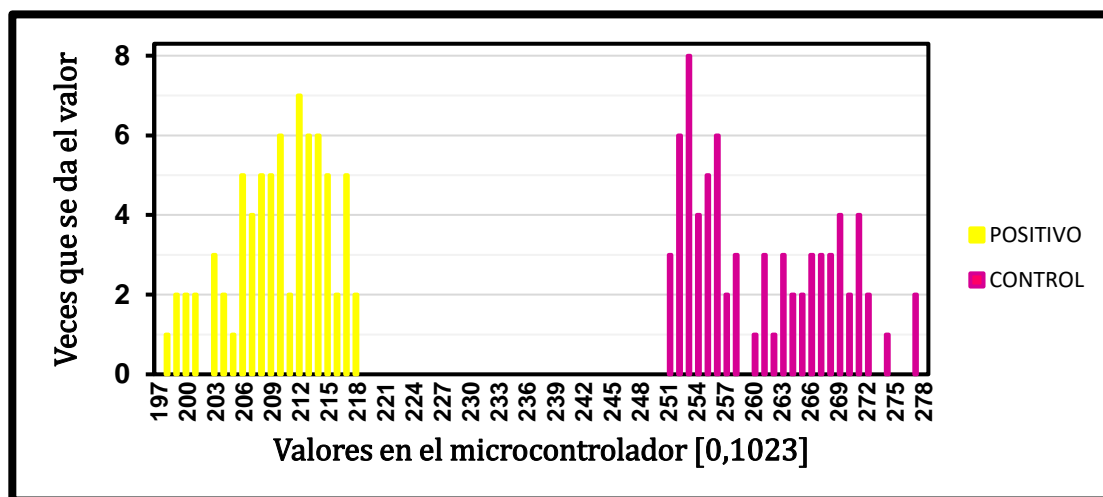


Figura 5-2. Histograma de datos recopilados sobre muestras LAMP. LED 430nm.

Tabla 5-1. Tabla de estadísticos para medidas de fototransistor. LED 430nm.

Estadísticos	Control	Positivo
Media	260,70	209,85
Mediana	258	210
Moda	253	212
Rango	26	20
Varianza	55,33	26,
Desviación estándar	7,15	5,02
Coeficiente de variación	2,74	2,39

A diferencia de los anteriores capítulos en los cuales se discernía sobre la capacidad o no del espectrómetro como medio para detectar resultados de PCR y LAMP, en este punto del proyecto se necesita saber una estimación más certera sobre la viabilidad del fototransistor como medio de detección. Esto hace necesario la repetición de toma de muestras hasta tener una mínima cantidad con la que hacer unos indicadores estadísticos medianamente fiables. A la hora de tomar muestras se ha de ser consciente de que, al estar hechas mediante los convertidores analógico digitales de un microcontrolador, las medidas realizadas variarán entre 0 y 1024.

En lo que respecta al primer caso, punto en el cual se toman las medidas cuando la fuente lumínica es el LED de 430nm, se puede afirmar que en una primera instancia son positivas. Sabiendo que el promedio de medidas con el LED incidiendo directamente sobre el fototransistor es de 776,68, el histograma resultante (Figura 5-2) muestra uno de los indicadores más importantes de fiabilidad, pues no hay solapamiento de resultados entre los diferentes tipos de muestras. Analizando los datos de la Tabla 5-1 se obtiene lo siguiente:

- El fototransistor puede distinguir entre muestras de control y positivo: La diferencia de medias, medianas y modas es lo suficientemente significativa como para que el instrumento no pueda confundir entre un tipo de muestra y otro.
- La precisión de las medidas realizadas es lo suficientemente alta: Los bajos valores de desviación estándar y coeficiente de variación sugieren que las medidas tienen consistencia y precisión.
- La variabilidad de los datos es baja: Para los grupos control y positivo las varianzas y los rangos son bajos, lo que deja a entender que en condiciones experimentales no habría solapamiento entre grupos.
- Como apunte añadido, asumiendo distribución normal en los resultados, se realiza la prueba de la T de Student, la cual es un indicador estadístico para saber si dos conjuntos de muestras están lo suficientemente separados como para ser fiable su distinción. El resultado de $2,70E-83$, un valor tan bajo que resulta a favor de la hipótesis nula. Esto se traduce en que un resultado tan cercano a cero constituye que hay una diferencia estadísticamente significativa entre grupos y además que hay una alta confianza, indicando que el resultado no ha sido fruto de medidas al azar.

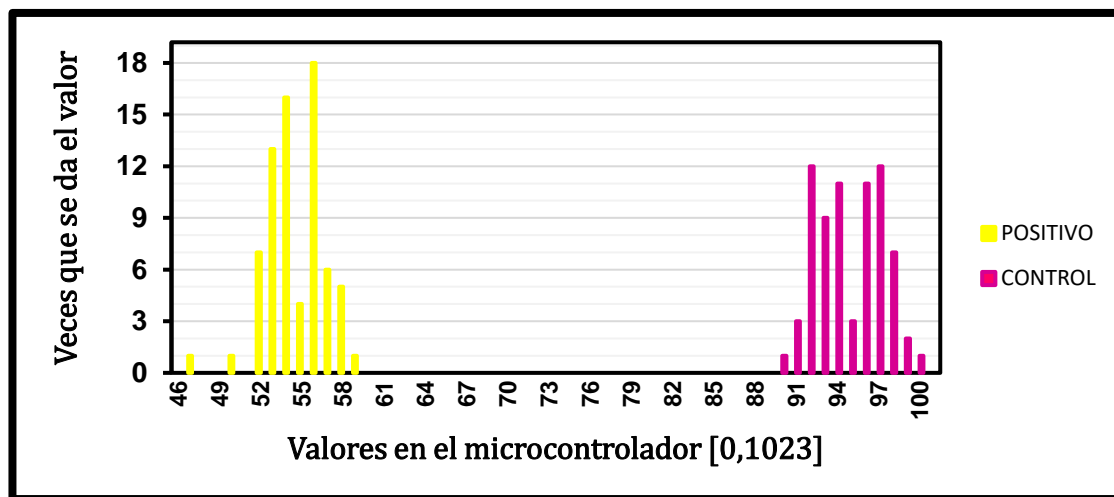


Figura 5-3. Histograma de datos recopilados sobre muestras LAMP. LED 560nm

Tabla 5-2. Tabla de estadísticos para medidas de fototransistor. LED 560nm.

Estadísticos	Control	POSITIVO
Media	94,82	54,63
Mediana	94,5	54
Moda	92	56
Rango	10	12
Varianza	5,70	4,41
Desviación estándar	2,39	2,10
Coeficiente de variación	2,52	3,84

Los resultados obtenidos aplicando el LED de 560nm muestran que la separación entre grupos positivo y negativo es incluso más amplia que con la aplicación de un LED de 430nm como fuente lumínica. Para este caso el promedio de medidas con el LED incidiendo directamente sobre el fototransistor es de 364,63.

Comparativamente, la Tabla 5-2 arroja datos más prometedores que la Tabla 5-1. En concreto, las medias se acercan más en valor a las medianas para el mismo número de muestras tomadas y a su vez la varianza y el rango en las muestras positivas y negativas son mucho menores, lo que implica que los resultados están mucho más concentrados en torno a un punto. Este último punto se ve reflejado en el valor del indicador estadístico T de Student, el cual resulta 1,86E-130, notablemente menor que el resultado del ensayo anterior, siendo esto más favorable y significando que los conjuntos de mediciones tomados por el fototransistor de muestras de LAMP positivas y negativas están lo suficientemente separadas para que no se puedan confundir entre una y otra en futuros ensayos. Por estos motivos citados, se concluye que el uso de un LED de 560nm como fuente lumínica es mucho más efectivo para distinguir entre muestras positiva y negativa.

Antes de pasar al siguiente capítulo hay que aclarar que el resultado de las muestras tomadas que se aprecian en la Figura 5-3 por el fototransistor con un LED de 560nm como fuente lumínica son resultados invertidos, ya que como se aprecia en la Figura 4-1 y la Figura 4-5 del capítulo anterior, al inspeccionar las muestras positivas, naranja y control en unas longitudes de onda cercanas a 560nm la muestra de control deja pasar menos cantidad de luz que la que deja pasar la muestra positiva. Lo cual significa que la muestra control absorbe más cantidad de radiación electromagnética que la muestra positiva. Sin embargo, en la Figura 5-3 se manifiesta de manera inversa; los valores de señal electrónica que ofrece el fototransistor cuando la muestra control está entre este y el LED de 560nm es mayor que cuando lo hace la muestra positiva, dando así la conclusión errónea de que la muestra positiva debe absorber más radiación electromagnética de 560nm que la muestra de control.

Esto ocurre porque (cómo se verá en el siguiente capítulo) para este punto de la lectura y poder comparar las mediciones del fototransistor con ambos LEDs y que el positivo estuviera valores bajos y el negativo o control en valores altos, se invirtió la lectura en el software a la hora de medir los valores con el LED de 560nm y por continuidad permaneció así.

5.3 Software de lectura del fototransistor.

Para realizar la lectura del fototransistor se ha utilizado un microcontrolador modelo Arduino UNO mediante el cual se regulará la potencia de los LEDs y se recopilarn las medidas del fototransistor. El código en cuestión utilizado es el siguiente:

```
const int phototransistor = A0;  
const int LEDOUT = 9;  
float time = 0.0;  
int bright = 137;  
int v = 0;
```

1

//-----//

```
void setup() {  
  
    pinMode(LEDOUT, OUTPUT);  
    Serial.begin(9600);  
    Serial.println("Phototransistor Lecture:");  
}
```

2

```
//-----//
void loop() {
  analogWrite(LEDOUT, bright);
  //Care: analog Read inverted//
  v = 1023 - analogRead(phototransistor);
  Serial.print(v);
  Serial.print(",");
  Serial.println(time);
  delay(500); //Delay (0.5s)
  time= time + 0.5;
}
```

3

Este código se puede subdividir en tres partes ya acotadas:

1. Declaración de variables entre las cuales usaremos:
 - a. phototransistor para asignar el pin de entrada analógica.
 - b. LEDOUT para asignar el pin de salida mediante el cual controlaremos el brillo del LED.
 - c. time como la variable que guardará el momento actual en segundos.
 - d. bright para programar la intensidad del PWM.
 - e. v para almacenar el valor de las lecturas del fototransistor.
2. Setup del programa en el que se inicializa el puerto serie y enviamos un mensaje inicial.
3. Bucle infinito en el que se envía por puerto serie el valor del fototransistor invertido y el tiempo actual.

Para hacer guardar las lecturas del microcontrolador se utilizará Realterm que es un programa que puede leer por los puertos serie del ordenador. La configuración será 9600 baudios y de tal manera que al capturar al mismo tiempo guarde los valores interceptados en un archivo de texto. Tras esto y en paralelo configuraremos un archivo de Excel para que tome los valores del archivo de texto dónde escribe el programa Realterm y graficarlos al instante, permitiendo hacer ensayos de LAMP en tiempo real.

5.4 Medición de Ensayo LAMP en tiempo real.

Únicamente con el fototransistor conectado en emisor común con una resistencia se hace una primera medición del ensayo LAMP en tiempo real. A pesar de no esperarse ningún resultado en concreto, el fototransistor es alimentado por el microcontrolador y los datos que el microcontrolador obtiene del fototransistor son almacenados. En este aspecto se hacen varios ensayos con dos tipos principales de muestras, una muestra control y otra positiva.

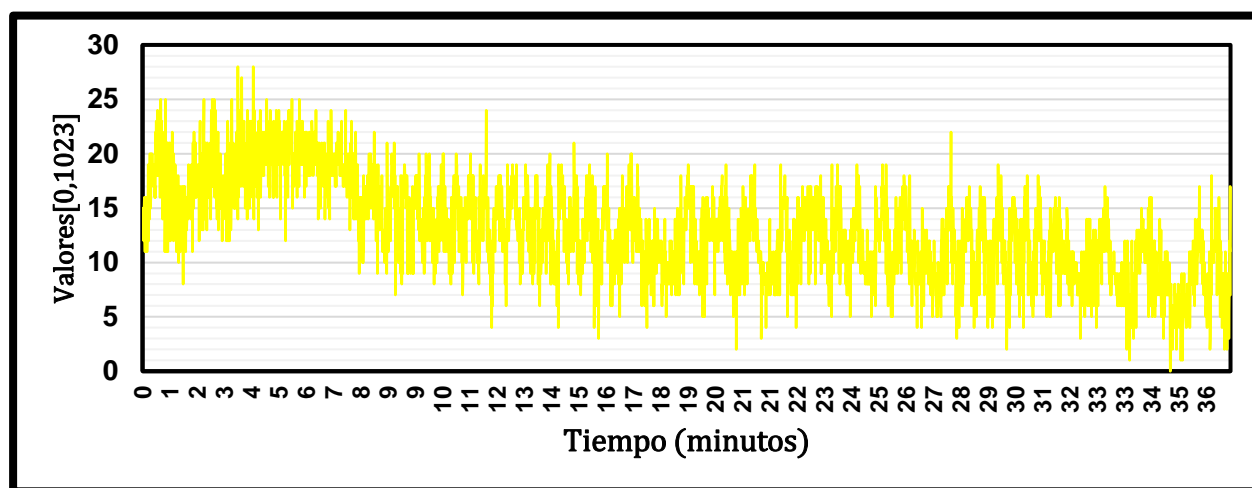


Figura 5-4. Mediciones del fototransistor para un ensayo de LAMP en tiempo real con muestra control.

En la Figura 5-4 se representan las mediciones de una muestra positiva que es colocada en el lab-on-chip, para posteriormente calentar la muestra durante 37 minutos para comprobar que no hay variaciones significativas en las medidas.

En este ensayo, la muestra llega a los 65°C en el minuto 8, tras lo cual se produce una progresiva bajada en los valores a lo largo del ensayo. Los valores promedio de cada minuto van decrementándose desde 17,5 a 7,97. Esto puede deberse a diversos motivos, cómo por ejemplo que el calor puede estar interfiriendo en el circuito de medida o bien las propiedades ópticas de los materiales que se interponen entre la fuente de luz y el fototransistor cambian con el cambio de temperatura.

Las medidas tomadas expresan un nivel de ruido relevante, que será medido mediante el SNR (Signal Noise Response) calculado en este caso como diez veces el logaritmo de la relación entre la media de las muestras y su desviación estándar. El resultado de esta operación es 4,86dB, dato que se rescatará en futuros capítulos para ser comparado, aunque a priori se puede decir que es bajo significando que el ruido tiene bastante impacto en la toma de medidas.

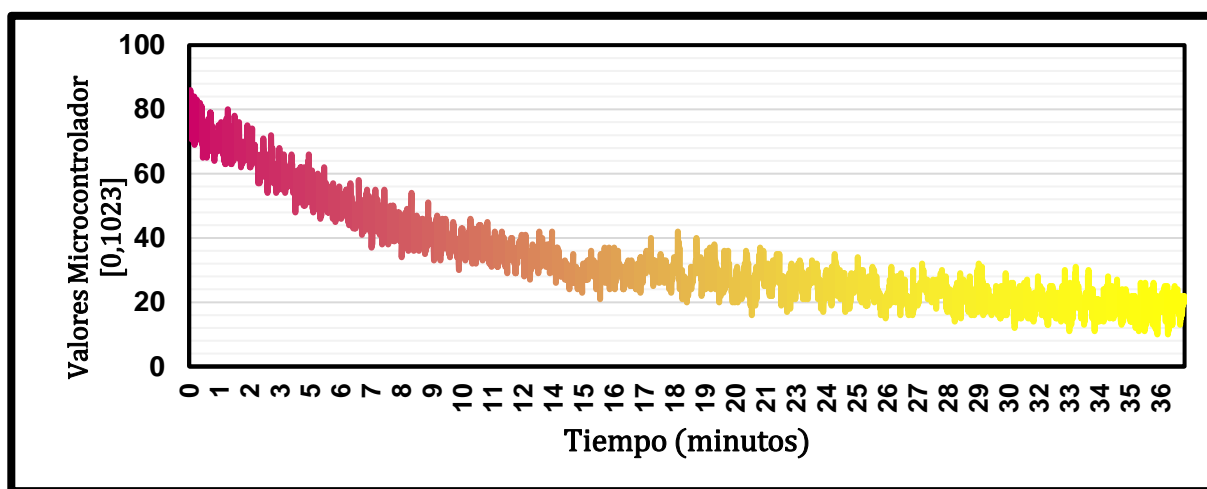


Figura 5-5. Mediciones del fototransistor para un ensayo de LAMP en tiempo real con muestra positiva.

Se muestra en la Figura 5-5 las mediciones de realizar un ensayo con una muestra de la que se sabe un certero resultado positivo en el momento en el que la muestra realiza la transición de negativo a positivo, habiendo alcanzado previamente los 65°C. Los valores de absorbancia cambian de un promedio por minuto de 73,14 a 18,45 junto con el color de la muestra.

6 CIRCUITO DE LECTURA DE ENSAYOS LAMP.

El excesivo ruido que se presenta a la hora de la toma de mediciones proviene de que la propia alimentación del fototransistor. No es de una buena calidad como pudiera ser una fuente de alimentación si no que se realiza directamente desde el microcontrolador. Para paliar el ruido y mejorar la precisión de la medida, se ve necesario el diseño y creación de un circuito anexo de acondicionamiento y amplificación de la señal.

Se busca pues la realización de dos circuitos: Un primer circuito que tenga una etapa de filtrado y amplificación para el fototransistor, del cual se sacarán las medidas mediante un Arduino Mega A través de sus puertos de entradas analógicas. El otro circuito se configurará para la excitación de los LEDs, los cuales serán controlados por PWM mediante salidas digitales del Arduino Mega. Estos circuitos permitirán eliminar sustancialmente el ruido en la lectura de ensayos de LAMP a tiempo real y al mismo tiempo permitirá la modulación de la intensidad lumínica que reciben los fototransistores y de la resistencia de colector del fototransistor para una mayor calibración en la medida.

Los ensayos de LAMP se realizan por triplicado en una placa de metacrilato fresada para crear circuitos de microfluídica. Esta placa de metacrilato está cubierta en las zonas superior e inferior por dos láminas metálicas con capacidad de ser buen conductor térmico, pues se necesita alcanzar los 65°C para que suceda la amplificación de ADN.

Por lo tanto, el circuito que se encargue de la alimentación y modulación de los LEDs se ubicará en la parte superior del montaje anteriormente mencionado, colocándose el circuito asociado al fototransistor en la parte inferior. La intención de que el circuito sea por triplicado es para poner en el centro un ensayo sin resultado conocido (la muestra a analizar), en la izquierda uno que se sepa que resultará positivo y en la derecha uno negativo.

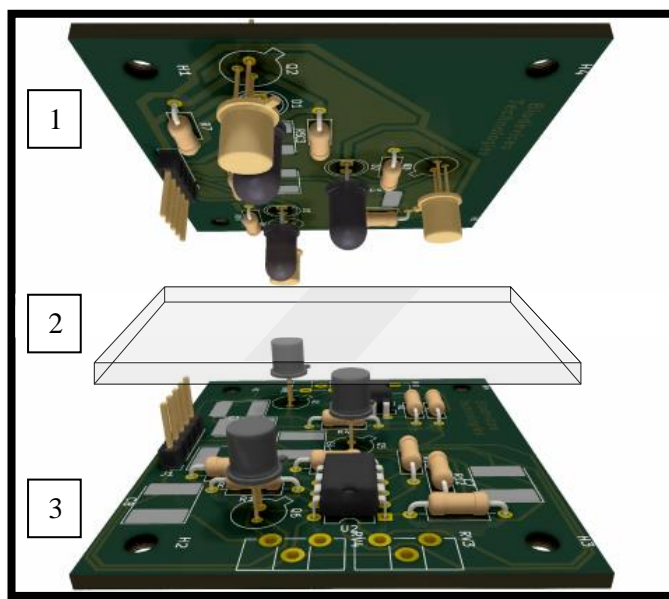


Figura 6-1. Disposición del circuito de LEDs (1), la-on-chip (2) y circuito de fototransistores (3)

6.1 Circuito de fototransistores.

La lectura del fototransistor pasa por una etapa de filtrado de ruido procedente de la alimentación del microcontrolador y una etapa de amplificación mediante un amplificador restador no inversor. El circuito será alimentado por un microcontrolador con 5V, y su diseño se realiza en Microcap 12.2.0.4. Para emular los fototransistores se han utilizado transistores BJT a los que se les aplica una tensión de colector que hace las veces de luz incidente. El diseño de este circuito graficado en la Figura 6-2 se compone de tres partes:

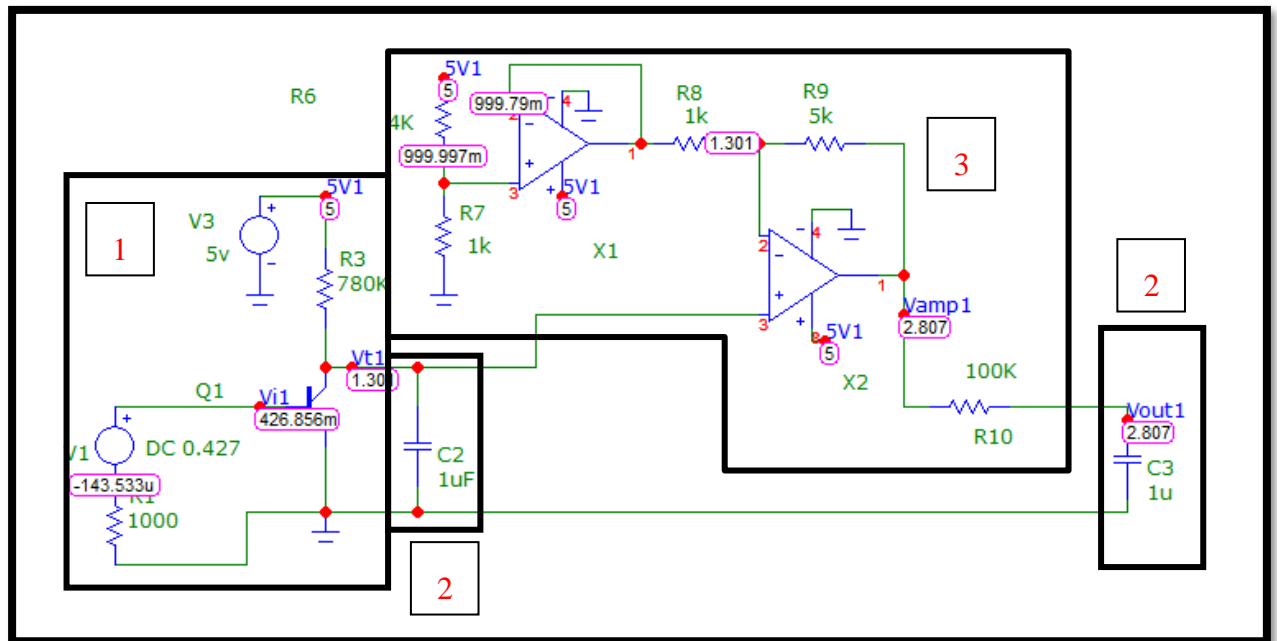


Figura 6-2. Circuito de filtrado y amplificación del fototransistor

1. La primera parte del circuito consta del fototransistor conectado en configuración emisor común con una resistencia de polarización R3 variable. El punto de lectura del microcontrolador se situará entre el emisor del fototransistor y tierra.
2. La segunda parte del circuito corresponde al sistema de filtrado, compuesto por dos condensadores en paralelo a tierra, con el fin de absorber el ruido de alterna que pueda tener la alimentación antes y después de la amplificación.
3. La tercera parte corresponde a la etapa de amplificación, en esta etapa se configura con un amplificador restador no inversor al que se le resta una tensión proporcionada por un seguidor de tensión conectado a una resistencia variable (en la imagen un divisor de tensión). Las resistencias R6 y R7 corresponden con un potenciómetro.

6.2 Circuito de excitación de LEDs.

En este circuito de la Figura 6-3 mostrada a continuación, V2 es una señal cuadrada de voltaje que se controla en frecuencia mediante un microcontrolador. El condensador C1 y R4 sirven como filtros de alterna para que la base se excite con voltaje de continua. A medida que la frecuencia de excitación sube, el transistor dejará pasar cada vez más corriente y por consiguiente el LED tendrá más voltaje, lo que corresponde a una mayor luminosidad.

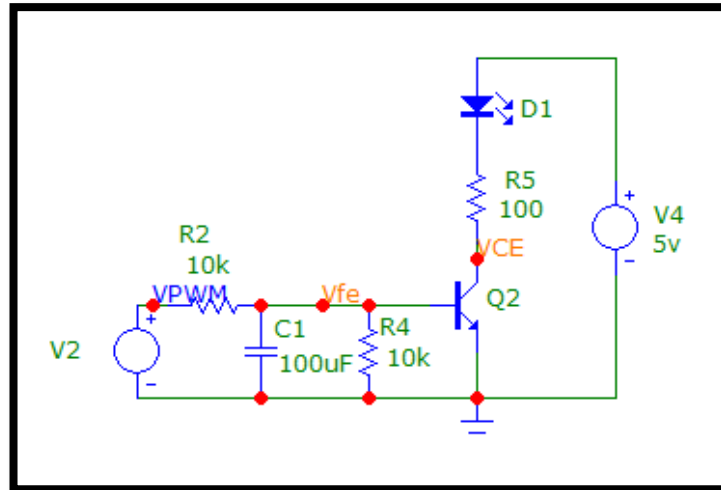


Figura 6-3. Circuito de excitación de LEDs

6.3 Diseño del circuito en PCB

El paso siguiente es realizar el diseño por triplicado, plasmar los componentes en una aplicación de diseño de PCB (en este caso Kicad) e interconectar cada componente. A continuación, se muestran algunas imágenes que complementan a la documentación de este proceso.

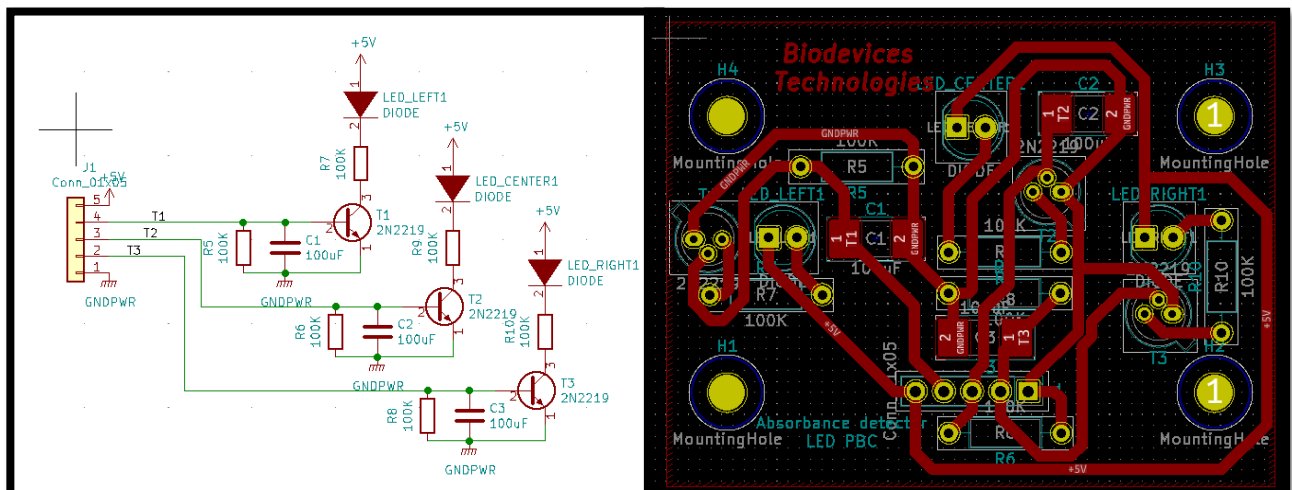


Figura 6-4. Diseño de Circuito de excitación de LEDs y conexionado en PCB

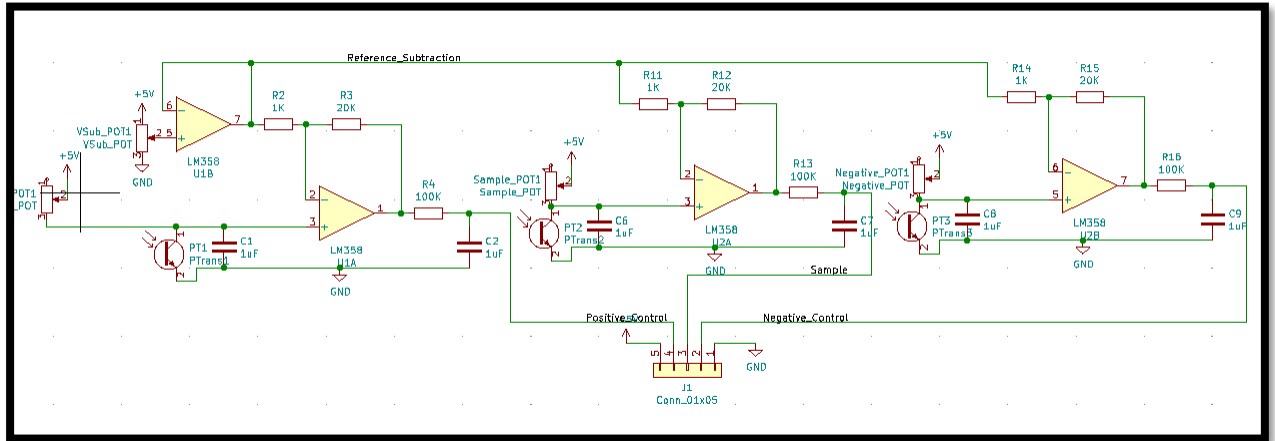


Figura 6-5. Diseño de circuito de lectura de fototransistores

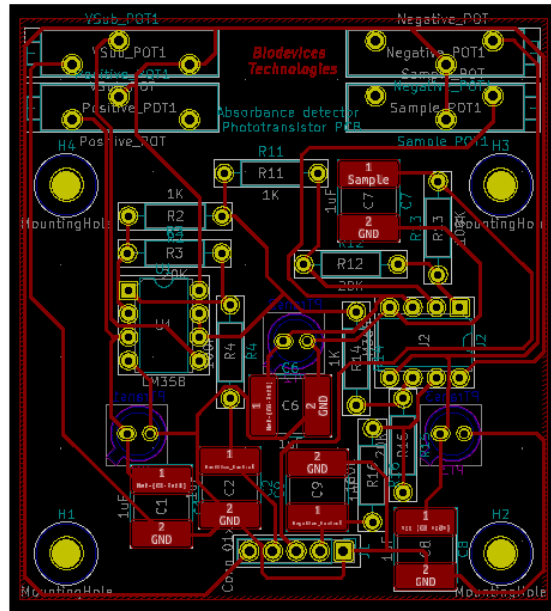


Figura 6-6. Conexionado de circuito de lectura de fototransistores en PCB

7 LECTURA DE FOTODIODO ACONDICIONADO

Tras realizar el circuito se decide comprobar su correcto funcionamiento haciendo un ensayo de LAMP en tiempo real con el LED verde de 560nm como fuente lumínica. La distribución cronológica de los acontecimientos es la siguiente:

- Minuto 0: Valores promedio 530. Se enciende el LED y se empiezan a tomar medidas para determinar la potencia del LED
- Minuto 1: Valores promedio 237. Se introduce la placa de metacrilato con la muestra en estado negativo.
- Minuto 4: Valores promedio 237. Se enciende el termociclador, que empezará a calentar la muestra hasta llegar a los 65°C.
- Minuto 8: Valores promedio 200. Se llega a la temperatura de 65°C.
- Minuto 33: Valores descienden de 200 a 100. Comienzan a bajar los valores de las medidas tomadas.
- Minuto 38: Valores promedio 100. Las medidas han bajado lo suficiente como para ser considerada una muestra positiva. Se deja el ensayo activo más tiempo para ver si los valores descienden más.
- Minuto 60: Valores promedio 87. Tras parecer estabilizarse la muestra se decide retirar la placa de metacrilato.
- Minuto 61: Valores promedio 530. Se espera un minuto para captar medidas de la intensidad actual del LED y se da por finalizado el ensayo.

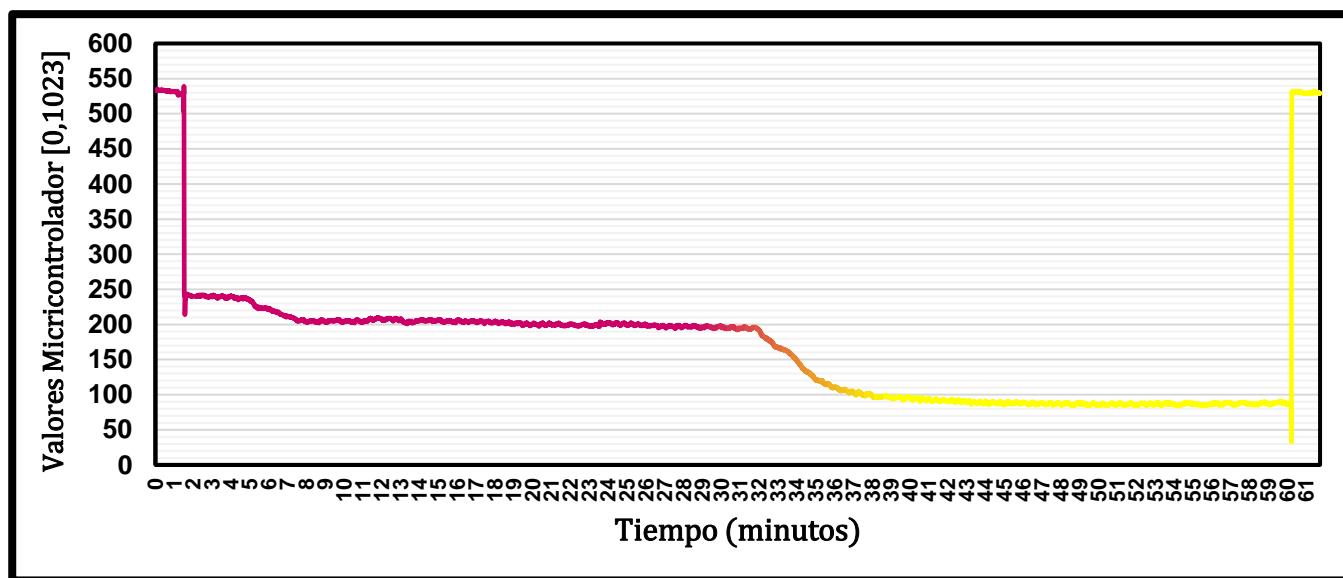


Figura 7-1. Lectura del ensayo LAMP en tiempo real con circuito de amplificación y filtrado.

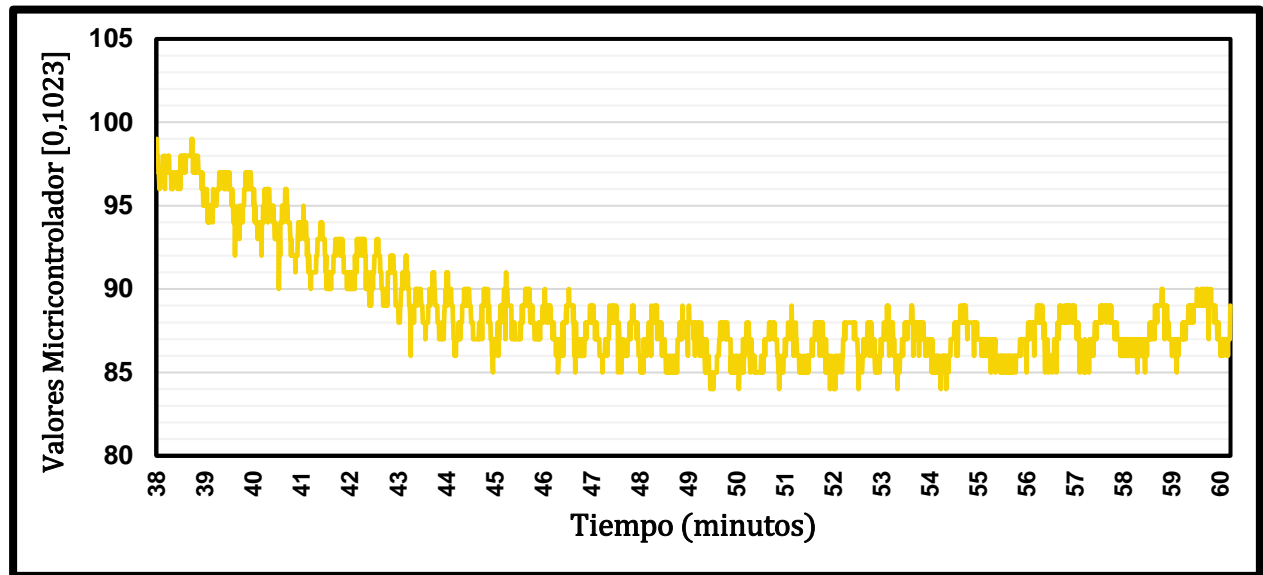


Figura 7-2. Valores negativos del Ensayo de LAMP con circuito de amplificación y filtrado.

Con este ensayo y basándonos en la Figura 7-1, se pueden sacar las siguientes conclusiones comparando los datos con los de la Figura 5-3, la Figura 5-4 y la Figura 5-5:

- Los valores de las medidas de la Figura 7-1 son notablemente superiores a los realizados en el ensayo sin etapa de amplificación, ratificando la efectividad de la amplificación.
- La diferencia de valores cuando la muestra es negativa y positiva ha incrementado también debido a la amplificación, lo cual hace más fácil discernir entre tipos de muestras.
- En la Figura 7-2 se hace notar la atenuación del ruido gracias a la etapa de filtrado. Se realiza una estimación del SNR comparando la media de los valores cuando la muestra es negativa con la desviación estándar de estos valores, resultando un SNR de 14,33dB. En el capítulo 5 el SNR resultante para medidas en muestras negativas era de 4,86 por lo que se puede afirmar que se ha aumentado la relevancia de la señal sobre el ruido casi tres veces, demostrando que la etapa de filtrado ha conseguido limitar la acción del ruido de alimentación proporcionado por el microcontrolador.

8 CONCLUSIONES

En este último capítulo se discutirá el trabajo realizado, los resultados obtenidos del proyecto con respecto a los objetivos previos a su realización y futuras vías. El objetivo principal del proyecto era delimitar si para ensayos de PCR y LAMP en un entorno específico cómo es el de la microfluídica era posible utilizar métodos ópticos cómo la espectrometría para detectar los resultados. Según el trabajo realizado en los capítulos tres y cuatro, se concluye que:

Con respecto a la detección de fluorescencia para ensayos de PCR realizados en las condiciones de laboratorio, los resultados del capítulo 3 muestran que en efecto el instrumental escogido para analizar muestras de PCR es capaz de detectar la fluorescencia que emiten los fluoróforos al ser irradiados con una iluminación centrada en 502nm, lo cual fue una de las primeras inquietudes de este proyecto. El problema de esta detección es que la detección únicamente se hace viable para muestras que están hiper dopadas en lo que a fluoróforos se refiere, pues los ensayos de PCR normalizados que se realizaron en el laboratorio no llegaban a alcanzar un nivel de amplificación de ADN suficiente como para que el espectrómetro lo detectase. Este motivo y otros hizo que el proyecto del cual dependía este Trabajo Final de Grado apostase por una amplificación de ADN con método LAMP.

Por otra parte, con respecto a los ensayos de amplificación de ADN utilizando metodología LAMP, se puede concluir del capítulo 4 que el espectrómetro es capaz de detectar el cambio colorimétrico de las muestras al pasar de negativo a positivo. Debido a que la detección se realiza cualitativamente y no cuantitativamente, sobre unas longitudes de onda muy concretas, utilizar un espectrómetro sería proporcionar una solución sobredimensionada en presupuesto y recursos. Así pues, se propone el uso de un fototransistor cómo instrumento de detección de resultados de ensayos en LAMP.

Del capítulo 5 se concluye que el fototransistor responde adecuadamente, identificando de manera clara la diferencia entre muestras negativas o de control y positivas tanto para el pico de absorbancia situado en 430nm cómo para el de 560nm. Se escoge una iluminación de 560nm tras un análisis estadístico de múltiples medidas. La detección se demuestra pues viable incluso en tiempo real, pero también se hace notable una posible mejora, por lo que se decide implementar un circuito de acondicionamiento con una etapa de filtrado y una etapa de amplificación.

Tras diseñar y realizar el prototipo mediante el habitual proceso de transferencia, revelado y grabado, este se prueba resultando así el capítulo 7. De la prueba se concluye que el circuito de acondicionamiento ha actuado conforme a lo que se esperaba de él, reduciendo el nivel de ruido y amplificando la calidad de la detección. Esta detección que en primera instancia estaba pensada hacerse a posteriori ha resultado ser viable en tiempo real, algo que podrá reducir el tiempo de obtención de resultados

Antes de dar por finalizado este capítulo y con él el proyecto es propio marcar unos nuevos horizontes de futuras mejoras: En primer lugar, con respecto al circuito, sería recomendable implementar una mejora de tal manera que la intensidad del LED pudiera ser cambiada mediante otra forma que no sea cambiando el código. Esto se podría implementar con un potenciómetro en un divisor de tensión que sea medido por el Arduino de tal manera que al variar el potenciómetro varíe la lectura del microcontrolador y este cambie consecuentemente el nivel de intensidad del LED. Esto añadiría un nivel de seguridad extra al eliminar la necesidad de modificar recurrentemente el código. Otra de las posibles mejoras a plantear es la calibración adecuada del circuito, ya que la alimentación no es la mejor que podría ser y cambiarla beneficiaría tanto la potencia de las medidas cómo la supresión del ruido. Completando lo dicho anteriormente se deberían establecer unos parámetros fijos adecuados de los valores de las resistencias de amplificación y del condensador de la etapa de filtrado. También se debe apuntar a un posible análisis de la visibilidad de los materiales utilizados para contener las muestras, cómo es el PMMA, ya que al fresarse pierden transparencia. Para continuar las medidas tomadas en el capítulo 7 son escasas y sería aconsejable tomar más medidas para consolidar los resultados obtenidos. Sólo quedaría recomendar realizar un estudio del efecto del calor en las medidas, motivo por el cual se presupone que pasado un tiempo a 65°C, las muestras bajan ligeramente de valor.

REFERENCIAS

- [1] G. P. Pérez, «Espectrometría.com,» [En línea]. Available: <https://www.espectrometria.com/>. [Último acceso: 5 12 2024].
- [2] G. P. Pérez, «espectrometria.com,» [En línea]. Available: <https://www.espectrometria.com/espectrmetros>. [Último acceso: 5 12 2024].
- [3] NASA, ESA, Leah Hustak (STScI), «Webb space telescope,» [En línea]. Available: <https://webbtelescope.org/contents/media/images/01F8GF8DK2PRY4FP9DA2XPQC8S>. [Último acceso: 5 12 2024].
- [4] J. A. B. R. E. F. R. e. a. Nieves Abril Díaz, «Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas,» Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Córdoba, 2006.
- [5] W. P. O. A. Victor Leandro López Toctaguano, *Diseño e implementación de un glucómetro no invasivo basado en la ley de Lambert-Beer y longitud de onda cercana al infrarrojo(NIR), con interfaz de comunicación bluetooth a dispositivos con sistema operativo Android*, Tesis, Quito: Luis Germán Oñate Cadena, 2014.
- [6] G. S. Andrea , Determinaión de rendimientos cuánticos de fluorescencia por métodos indirectos, TFM, Oviedo: Departamento de Química Física y Analítica Facultad de Química Universidad de Oviedo, Alfonso Fernández González, 2015, pp. 4-5.
- [7] B. Valeur, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, 2001, p. 38.
- [8] B. K. Udo Reischl, Protocols, Quantifative PCR, 1999, p. 245.
- [9] B. Valeur, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, 2001, p. 46.
- [10] B. Valeur, Molecular Fluorescence: Principles and Applications., 2001, p. 11.
- [11] Hamamatsu, «Mini-spectrometer Micro series C12880MA Datasheet».
- [12] H.-H. Perkampus, UV-VIS Spectroscopy and its Applications, 1992.
- [13] Richardson Grating Laboratory, «Transmission gratings. Technical Note».
- [14] J. Z. M. J. Mehdi Jalali, The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR, Universidad de Liverpool, Liverpool, 2017.
- [15] e. a. Tsugonori Notomi, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Japón, 2000.
- [16] e. a. Mateus NóbregaAoki, «Colorimetric RT-LAMP SARS-CoV-2 diagnostic sensitivity relies on color interpretation and viral load,» *Nature*, p. 3, 2021.

- [17] M. C. Valverde, *MEMS-based Lab-on-chip platform with integrated 3D and planar microelectrodes for organotypic and cell cultures*, Departamento de electrónica, Universidad de Sevilla, Sevilla: José Manuel Quero Reboul, Carmen Aracil Fernández, 2020.
- [18] M. d. D. C. O. I. G.-P. G. O. N. A. A. S. K. Mayoral-Peña, «Chip para diagnóstico de la leucemia infantil,» *TecScience*, 2022.
- [19] Cree, «Cree® 5-mm Blue and Green Round LED C503B-BCS/BCN/GCS/GCN Datasheet».
- [20] Cree LED, «C512A-WNS/WNN: 5-mm Round White LED data sheet».
- [21] A. S. d. M. J. Z. C. Tapia, «Espectros de lámparas,» [En línea]. Available: <https://www.carlostapia.es/lamparas/lamps.html>. [Último acceso: 5 12 2024].
- [22] P. Paul Held, «Using Phenol Red to Assess pH in Tissue Culture Media, Application note,» BioTek, 2018.
- [23] Thermofisher Scientific, Invitrogen, «User Guide: SYBR Safe DNA Gel Stain,» 2016.
- [24] CML, «T-1 and T-1 3/4 Blue LED Lamps Description and Features, CMD264-UBD Datasheet».
- [25] BROADCOM, «T-1 (3-mm) Diffused LED Lamps, HLMP-K600 Datasheet».
- [26] OSRAM, «Radial T1 Ambient Light Sensor, SFH 3310 Datasheet».