



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

Grado en Ingeniería Electrónica Industrial i Automática

**VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE LABORATORIO PARA
LA DETECCIÓN DE BACTERIAS EN EL AGUA.
IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE LABORATORIO
EN UN AUTÓMATA**



Memoria

Autor: Guillem Torras Turmo
Director: Beatriz F. Giraldo Giraldo
Co-Director: Oscar Castillo Fernández
Ponente:
Convocatoria: junio 2017



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

Palabras clave

Anticuerpo, Bomba de agua, Concentración de muestra, Comunicación serie, Detección de patógenos, Enzima, Escherichia coli, HRP, Legionella pneumophila, Membrana de microfiltrado, Membrana de policarbonato, Peróxido de hidrógeno, Potenciostato, TMB, Unión inespecífica, USB,.



Resum

Aquest projecte presenta tots els treballs d'aproximació i d'estudis dels requeriments necessaris, per tal d'implementar un protocol de laboratori dissenyat al Centre Nacional de Microelectrònica (CNM) en un autòmat. Aquesta investigació s'inicia per l'interès per part de l'empresa Waterologies, S.L. amb la patent del CSIC, per trobar els requeriments específics de disseny d'una màquina. La tasca d'aquest treball és poder traslladar aquest protocol de laboratori en un protocol que pugui fer servir l'empresa per tal de dissenyar un sistema de control bacterià en aigua d'ús industrial que sigui completament autònom.

Aquest protocol està pensat per la detecció de la bactèria de *Escherichia coli* i *Legionella pneumophila* en l'aigua. Per tal d'automatitzar aquest protocol s'han hagut de modificar parts, i comprovar-ne d'altres.

S'ha hagut de comprovar el comportament fluídic de la càmera de reacció a l'hora de implementar els diferents passos de moviment de reactius, tanmateix, també s'ha hagut de comparar la detecció òptica utilitzada en el laboratori per una detecció electroquímica més fàcil d'implementar en un sistema compacte.

Resumen

Este proyecto presenta todos los trabajos de aproximación y de estudios de los requerimientos necesarios, a fin de implementar un protocolo de laboratorio diseñado en el Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) en un autómata. Esta investigación se inicia por el interés por parte de la empresa Waterologies, S.L. con la patente del CSIC, para encontrar los requerimientos específicos de diseño de una máquina. La tarea de este trabajo es poder trasladar este protocolo de laboratorio en un protocolo que pueda utilizar la empresa para diseñar un sistema de control bacteriano en agua de uso industrial que sea completamente autónomo.

Este protocolo está pensado para la detección de la bacteria de *Escherichia coli* y *Legionella pneumophila* en el agua. Con el fin de automatizar este protocolo se han tenido que modificar partes, y comprobar otras.

Se ha tenido que comprobar el comportamiento fluido de la cámara de reacción a la hora de implementar los diferentes pasos de movimiento de reactivos, sin embargo, también se ha tenido que comparar la detección óptica utilizada en el laboratorio para una detección electroquímica más fácil de implementar en un sistema compacto.

Abstract

This project presents all approach works and studies of the requirements necessary to implement a protocol designed laboratory at the National Center for Microelectronics (CNM) in an automaton. This investigation started by the interest of the company Waterologies, S.L. patent with the CSIC, to find the specific design requirements of a machine. The task of this work is to transfer this protocol in a laboratory protocol that can be used by the company to design a control system bacterial water for industrial use that is completely autonomous.

This protocol is designed to detect the bacterium *Escherichia coli* and *Legionella pneumophila* in water. To automate this protocol parts have been modified and others have been checked.

We had to check the behavior of the fluidic reaction chamber when implementing the different steps moving reagents, however, has also been used to compare the optical detection laboratory for electrochemical detection easier to implement in a compact system.

Agradecimientos

Al finalizar un trabajo arduo y lleno de dificultades es inevitable que te asalte un muy humano egocentrismo que te lleva a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que uno ha hecho. Sin embargo, tengo muy claro que no hubiese podido terminar el grado si no hubiese contado con el apoyo, cariño, energía y tiempo de muchas personas. Por ello, es un orgullo usar este espacio para ser justo y consecuente con esas personas que me han ido acompañando, expresándoles mis agradecimientos.

Ante todo, a mi familia y amigos incondicionales por la ayuda desinteresada brindada en cada obstáculo que se ha ido presentando a lo largo del Grado, gracias a ellos he conseguido alcanzar esta meta.

Agradecer también al “Centre Nacional de Microelectònica” (CNM) por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones, la ayuda inestimable de mi incansable tutor en la empresa Òscar Castillo, así como la ayuda prestada por mis compañeros del centro, en especial a Naroa Uria y Josune Jiménez. Por otro lado, agradecer también a la “Universitat Politècnica de Catalunya” (UPC) por la formación indispensable para realizar este trabajo con éxito y por la ayuda brindada por parte de mi tutora en la Universidad Beatriz Giraldo.

Glosario

A

Autoclavar

Las autoclaves son ampliamente utilizadas en laboratorios, como una medida elemental de esterilización de material. Aunque cabe notar que, debido a que el proceso involucra vapor de agua a alta temperatura, ciertos materiales no pueden ser esterilizados en autoclave, como el papel y muchos plásticos. La presión elevada permite que el agua alcance temperaturas superiores a los 100 °C. La acción conjunta de la temperatura y el vapor produce la coagulación de las proteínas de los microorganismos, entre ellas las esenciales para la vida y la reproducción de éstos, hecho que lleva a su destrucción., 44

B

bloqueo

Proceso que mediante una dilución de Tween-20 reduce la unión inespecífica entre el anticuerpo y el filtro., 41

E

E. Coli

Es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por E. coli se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda., 41

ELISA

Ensayo de inmunoabsorción enzimática. Se trata de una prueba que usa anticuerpos y cambio de color para identificar una sustancia., 46

Enzima

es una molécula de naturaleza proteica que cataliza las reacciones proteicas, iii

Error inespecífico

Es un tipo de error debido a la unión inespecífica del anticuerpo con la membrana., 41

F

Ferricianuro

Es una especie diamagnética ya que presenta un bajo espín. Y a diferencia muchas sales de cianuro, no es tóxica. Su reacción más estudiada es su oxidación a ferricianuro en el cual se libera un solo electrón y es una reacción muy estable., 77

L

Lavado

proceso de limpieza del filtro en el que se pretende eliminar el exceso de anticuerpos atrapado en él y que no se han unido a una bacteria., 41

P

Phosphate-buffered saline (PBS)

El tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline) es una solución tampón o buffer empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. El uso de esta solución es muy común para lavar células a través de centrifugación. El PBS puede emplearse como diluyente para métodos de desecación de

biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en el PBS se adhieren alrededor de la biomolécula y permiten inmovilizarla a una superficie sólida., 44

Portafiltros

contenedor en el que entre las entradas y salidas de fluidos se colocará un filtro de unas dimensiones específicas para atrapar partículas en él., 46

T

TMB

TMB, tetrametilbencidina o "Tetramethylbenzidine", Es un sustrato cromogénico utilizado en procedimientos de tinción en inmunohistoquímica, así como un reactivo de visualización utilizado en ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA). TMB es un polvo de cristal blanco que forma un

líquido azul-verde pálido en solución con acetato de etilo., iii

Tween 20

El polisorbato 20 o monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano, conocido comercialmente como Tween 20, es un tensoactivo tipo polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas, alimentarias, industriales y farmacológicas., 41

U

Unión inespecífica

Se trata de la unión de los anticuerpos con la membrana de microfiltrado que no se puede establecer., 41

Índice de abreviaturas

- Ab: Anticuerpos
- CNM: Centro Nacional de Microelectrónica
- E. Coli: Escherichia coli
- ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción
- IMB: Instituto de Microelectrónica de Barcelona
- Legionella: Legionella pneumophila
- PBS: Tampón Fosfato Salino
- TMB: Tetrametilbencidina
- Tw-20: Tween - 20

Índice

| | |
|------------------------------------|-------------|
| PALABRAS CLAVE | III |
| RESUM | V |
| RESUMEN | VII |
| ABSTRACT | IX |
| AGRADECIMIENTOS | XI |
| GLOSARIO | XIII |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | XV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XXI |
| ÍNDICE DE TABLAS | XXV |
| 1. PREFACIO | 27 |
| 1.1. Origen del trabajo | 27 |
| 1.2. Motivación | 27 |
| 1.1. Objetivos | 27 |
| 1.1.1. Objetivo principal | 27 |
| 1.1.2. Objetivos específicos | 28 |
| 1.2. Requisitos previos | 28 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 29 |
| 2.1. Justificación | 29 |
| 2.1. Alcance del trabajo | 29 |
| 2.2. Estado del arte | 29 |
| 2.2.1. Alere..... | 29 |

| | |
|--|--------------------------------------|
| 2.2.2. Biotica..... | 29 |
| 3. ANÁLISIS DEL PROYECTO _____ | 31 |
| 3.1. Descripción del proyecto..... | 31 |
| 3.1.1. Portafiltros | 31 |
| 3.1.2. Filtro | 32 |
| 3.1.3. Bomba | 32 |
| 3.1.4. Electroodos..... | 33 |
| 3.1.5. ELISA..... | 33 |
| 3.2. Fases del proceso..... | 34 |
| 3.3. Metodología de desarrollo | 35 |
| 3.4. Planificación de tareas..... | 35 |
| 3.4.1. Fases de desarrollo del proyecto | 35 |
| 3.4.2. Planificación de tareas y Diagrama de Gantt | 36 |
| 3.4.3. Dependencias del proyecto | ¡Error! Marcador no definido. |
| 4. DETERMINACIÓN DE LA UNIÓN INESPECÍFICA DE UN FILTRO DE POLICARBONATO CAUSADA POR EL FILTRADO _____ | 41 |
| 4.1. Aspectos teóricos..... | 41 |
| 4.2. Análisis de flujo de la cámara de reacción | 41 |
| 4.2.1. Flujo del fluido..... | 42 |
| 4.2.2. Análisis del comportamiento flúidico | 42 |
| 4.3. Proceso experimental..... | 44 |
| a) Preparación Phosphate-buffered saline (PBS) | 44 |
| b) Preparación del Tw-20 al 1%..... | 44 |
| c) Preparación anticuerpos (1/10)..... | 45 |
| d) Pasos de filtrado..... | 45 |
| 4.4. Resultados..... | 47 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5. | CAMBIO DE UN PROCESO INMUNOLÓGICO A UNO ELECTROQUÍMICO | 49 |
| 5.1. | Análisis electroquímico del TMB | 49 |
| 5.1.1. | Marco teórico | 49 |
| 5.1.2. | Requisitos previos | 50 |
| 5.1.3. | Proceso experimental | 51 |
| a) | Velocidad de reacción | 53 |
| b) | Electrodos | 53 |
| c) | Velocidad de barrido | 56 |
| 5.1.4. | Resultados | 60 |
| a) | Análisis de concentraciones | 60 |
| b) | Análisis de picos | 61 |
| c) | Cronoamperometría | 62 |
| 5.2. | Peróxido de Hidrógeno | 65 |
| 5.2.1. | Marco teórico | 65 |
| 5.2.2. | Requisitos previos | 65 |
| 5.2.3. | Proceso experimental | 65 |
| a) | Problemática con la referencia de plata | 66 |
| b) | Electrodos | 67 |
| c) | Velocidad de barrido | 69 |
| 5.2.4. | Resultados | 71 |
| a) | Cronoamperometrías | 71 |
| b) | Análisis de concentraciones desde las cronoamperometrías | 73 |
| 6. | ESTUDIO DE LOS ELEMENTOS PARA SER GOBERNADOS POR EL AUTÓMATA | 75 |
| 6.1. | Potenciostato | 75 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1.1. Detección del problema..... | 76 |
| 6.1.2. Solución adoptada | 76 |
| 6.1.3. Resultados..... | 77 |
| a) Comprobación con ferrocianuro y una voltametría cíclica | 77 |
| b) Voltametrías con peróxido..... | 78 |
| 6.2. Bomba..... | 79 |
| 6.2.1. Calibración de la bomba | 79 |
| 6.2.2. Resultados..... | 82 |
| CONCLUSIONES | 85 |
| Limitaciones del trabajo | 85 |
| Trabajo futuro..... | 85 |
| ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL | 87 |
| Fase de desarrollo..... | 87 |
| BIBLIOGRAFIA | 91 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 3.1.- Portafiltros usado y sus imágenes en 3D | 31 |
| Figura 3.2.- Filtro de policarbonato | 32 |
| Figura 3.3.- Bomba Gilson Miniplus 3 | 32 |
| Figura 3.4.- Bomba usada en el autómata | 32 |
| Figura 3.5.- Electrodo DropSens 550 (Platino vs Plata) | 33 |
| Figura 3.6.- Multiskan EX de THERMO Electron Corporation | 33 |
| Figura 3.7.- Esquema del protocolo ya existente | 35 |
| Figura 3.8.- Diagrama de Gantt del proyecto | 39 |
| Figura 4.1.- Filtro de policarbonato bloqueado con Tw-20 al 1% bajo microscopio electrónico. (1). | 41 |
| Figura 4.2.- Proceso de filtrado (izquierda). Proceso de Ab, lavado y detección (derecha) | 42 |
| Figura 4.3.- Velocidad del agua en el portafiltros | 43 |
| Figura 4.4.-Vorticidad del agua en el portafiltros | 44 |
| Figura 4.5.-Absorción medida respecto de la velocidad de flujo | 48 |
| Figura 5.1.- Reacción del TMB | 49 |
| Figura 5.2.- Recta de calibración del TMB por el método de absorbancia | 51 |
| Figura 5.3.- Electrodos usados (Platino, Oro, Carbono y Carbono Naroa; respectivamente) | 53 |
| Figura 5.4.- Voltametría cíclica con electrodos DS-C223BT | 54 |
| Figura 5.5.- Voltametría cíclica con electrodos DS-550 | 55 |
| Figura 5.6.- Voltametría cíclica con electrodos DS-110 | 55 |
| Figura 5.7.- Voltametría cíclica con electrodos Naroa | 56 |
| Figura 5.8.- Gráfica de difusión en el electrodo | 57 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.9.- Voltametrías cíclicas a distintas velocidades de barrido con los electrodos de Carbono Naroa _____ | 59 |
| Figura 5.10.-Resumen de las voltametrías cíclicas a distintas concentraciones con los electrodos de Carbono Naroa _____ | 60 |
| Figura 5.11.- Tensiones en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naroa ____ | 61 |
| Figura 5.12.-Corriente en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naroa ____ | 62 |
| Figura 5.13.- Resumen de las Cronoamperometrías en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naroa _____ | 63 |
| Figura 5.14.- Corrientes en función de la concentración en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naroa _____ | 64 |
| Figura 5.15.- Corrientes en función de la concentración en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naroa (medida hecha previo a este proyecto) _____ | 64 |
| Figura 5.16.- Electrodo de referencia oxidado (izquierda) electrodo nuevo (derecha) _____ | 66 |
| Figura 5.17.- Electrodos DS-110 _____ | 68 |
| Figura 5.18.- Electrodos DS-C223BT _____ | 68 |
| Figura 5.19.- Electrodos DS-550 _____ | 69 |
| Figura 5.20.- Voltamogramas a distintas velocidades de barrido con los electrodos DS-550 ____ | 70 |
| Figura 5.21.-Cronoamperometrías a distintas concentraciones con electrodo DS-550. _____ | 72 |
| Figura 5.22.- Análisis de concentraciones del peróxido de hidrógeno _____ | 73 |
| Figura 6.1.- Multipotenciostato CHI 1030B _____ | 75 |
| Figura 6.2.- Potenciostato USB usado _____ | 75 |
| Figura 6.3.- Medida del ferrocianuro con el potenciostato USB _____ | 77 |
| Figura 6.4.- Voltamograma del ferrocianuro con AutoLab _____ | 78 |
| Figura 6.5.- Voltametría Cíclica hecha con el potenciostato USB y electrodo DS-550 _____ | 79 |

Figura 6.6.- Flujo de la bomba en función de la posición del potenciómetro _____ 81

Figura 6.7.- Voltaje de salida del PWM en función de la posición del potenciómetro _____ 82

Figura 6.8.-Absorción medica respecto de la velocidad de flujo _____ 83



Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 3.1.- Lista de los electrodos usados _____ | 33 |
| Tabla 3.2.- Programación de tareas _____ | 37 |
| Tabla 4.1.- Caudales de filtrado usados _____ | 46 |
| Tabla 5.1.- Tabla de volúmenes de anticuerpos usados _____ | 52 |
| Tabla 6.1.- Tabla de calibración de la bomba _____ | 80 |
| Tabla 0.1.- Tabla resumen de los residuos creados por la realización del proyecto _____ | 88 |
| Tabla 0.2.-Análisis los factores ambientales _____ | 89 |

1. Prefacio

El presente trabajo, pretende describir el proceso seguido para desarrollar un proceso de laboratorio en el que se pretende cuantificar las bacterias de *Escherichia coli* (E. Coli) presentes en el agua. Para conseguirlo, es necesario tener bien definido el protocolo de laboratorio y analizar cuáles son las restricciones de este para la implementación del protocolo en un autómata.

1.1. Origen del trabajo

El proyecto, nace de la simbiosis entre la empresa Waterologies y el grupo de investigación BioMEMS. Esta simbiosis nace entre ambos gracias a la licencia de una patente pública en la que se detallan el protocolo de laboratorio para la detección de las bacterias de E. Coli y legionella en el agua. Dicho protocolo debe ser automatizado y para ello, se deben definir los límites de trabajo de este.

1.2. Motivación

El agua es uno de los recursos vitales del planeta, sin embargo, durante los últimos años, ha habido diversos brotes epidémicos asociados a patógenos nacidos en la comida o agua que han sido una causa importante de mortalidad alrededor del planeta. Por ello, la detección de estos patógenos es cada vez más importante ya que causan alrededor del 5.7% de las enfermedades alrededor del mundo y el 4% de las muertes [1–3].

El control y la supervisión del agua es fundamental para reducir el índice de mortalidad causado por las bacterias que pueda transportar.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo principal

El objetivo de este proyecto es estudiar un protocolo de medida realizado por técnicos especializados en el Centro nacional de Microelectrónica (CNM), para detectar los puntos críticos del protocolo a la hora de generar un automatismo, así como los requerimientos para el diseño de un prototipo que los resuelva. Con este fin se ha trabajado para poder realizar el protocolo, entenderlo y hacer un ejercicio de traslación a un sistema automatizado, profundizando en varios puntos del proceso.

1.1.2. Objetivos específicos

Además del objetivo principal anteriormente presentado, existen unos objetivos específicos en este proyecto. Estos no resultan imprescindibles para conseguir los objetivos que se plantean en el trabajo, sin embargo, son objetivos que están implícitos en él.

Los objetivos son la automatización del protocolo, así como consolidar los conocimientos adquiridos en las asignaturas del grado en especial, la de Instrumentación Electrónica.

1.2. Requisitos previos

El proyecto aquí planteado parte de un protocolo de laboratorio patentado y diseñado por el CNM. Este protocolo queda explicado en el apartado 4.3 de esta memoria.

2. Introducción

2.1. Justificación

Este trabajo ha permitido no sólo consolidar y recordar conocimientos adquiridos durante el grado, sino que también ha ampliado muchos conocimientos específicos necesarios al proyecto y que, a pesar de guardar relación con los estudios, no están incluidos en su plan de estudios.

2.1. Alcance del trabajo

El desarrollo de este trabajo, permitirá el diseño óptimo de un autómata, de forma que este respete o mejore la medida realizada por el sistema antes que este se automatice.

2.2. Estado del arte

En el mercado existen muchas soluciones al problema planteado; Sin embargo, existen dos soluciones principales que son las más parecidas al prototipo con el que se trabaja en esta memoria. Estos se detallan a continuación:

2.2.1. Alere

Alere es un test cualitativo que indica la presencia o no de bacterias en el medio. Al ser un tipo de prueba cualitativa, no indicará la concentración de bacterias que existe en el medio, simplemente, indicará mediante la aparición de una línea en un bastón si la presencia de la bacteria que se pretende estudiar tiene una concentración mayor a de un cierto nivel o no.

Este método, aunque útil para determinadas aplicaciones, al no poder extraer de cada ensayo un resultado distinto al binario, resulta poco eficaz en otros ámbitos de aplicación como puede ser el alimentario o diagnóstico clínico.

2.2.2. Biotica

La empresa Biotica, por su parte, ha diseñado un sistema de detección de bacterias de tipo cuantitativo, con un método en el que se usan partículas magnéticas cubiertas de anticuerpos capaces de reconocer a la bacteria que queremos estudiar. Estos anticuerpos se unirán a las bacterias y, por consiguiente, a la partícula magnética. Que en presencia de un campo magnético, se separa del resto de partículas y, así, se ha conseguido separar las bacterias del resto de partículas. Finalmente, usando otros

anticuerpos específicos que también se unen a las bacterias y un colorante, se puede determinar la cantidad de anticuerpos de una forma cuantitativa que hay en un volumen de agua.

Este proceso es muy parecido al protocolo que en el que se basa este trabajo, sin embargo, la automatización de este proceso, se presenta mucho más complejo y caro.

3. Análisis del proyecto

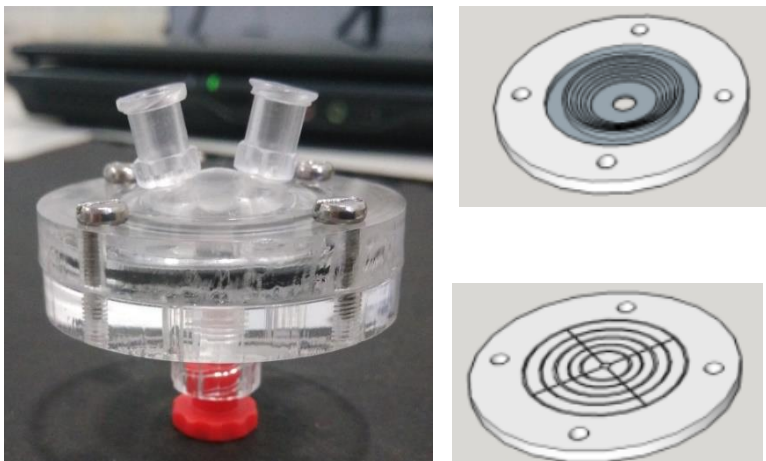
Como paso previo a la concepción del proyecto, es necesario estudiar y analizar los antecedentes para poder alcanzar la solución deseada optimizando el tiempo y los recursos necesarios.

3.1. Descripción del proyecto

Este proyecto se inicia a partir del trabajo previo de investigación y prueba de concepto que define el protocolo de detección y cuantificación de la presencia de bacterias en el agua. Además del protocolo de laboratorio, será necesario también su automatización para su posterior integración en un circuito de agua sanitaria o sistemas de refrigeración completamente autónoma.

3.1.1. Portafiltros

Se trata de un dispositivo diseñado para la sujeción de un filtro de diámetro de 42 mm diámetro exterior y de 20 mm de diámetro en la cámara de filtrado. El dispositivo está fabricado de PMMA mediante técnicas de corte Láser y mecanizado mediante una fresadora de control numérico.



La Figura 3.1, nos muestra el portafiltros utilizado durante el proyecto.

Figura 3.1.- Portafiltros usado y sus imágenes en 3D

En este portafiltros se busca conseguir la integración de todos los pasos del protocolo. Por tanto, se quiere realizar el filtrado, los lavados, los bloqueos, la inserción del Ab, la inserción del sustrato de TMB y la medida en el mismo dispositivo. Para ello, es conveniente realizar un análisis del comportamiento fluídico del dispositivo.

Cabe destacar, que este portafiltros está diseñado para la que el flujo de agua que circule por él se reparta uniformemente por el filtro como se muestra en el apartado 4.2.

3.1.2. Filtro

Con el proceso de filtrado se pretende atrapar a todos los elementos que tengan una dimensión inferior a 300 nm, entre los cuales se incluyen las bacterias. Para lograr así la concentración de las bacterias en la membrana de la muestra.

El filtro que usaremos según el trabajo previo realizado y que se detalla en el artículo 1 de la bibliografía, de policarbonato (Figura 3.2) ya que es el que reduce más la unión inespecífica de los anticuerpos al filtro. Dicho filtro tendrá un diámetro de 25 mm.



Figura 3.2.- Filtro de policarbonato

3.1.3. Bomba

Durante la realización de este trabajo, se usarán dos bombas. La primera es usada en un estadio inicial del proyecto y es la bomba Miniplus3 (Figura 3.3) correspondiente a la marca comercial Gilson. En un inicio, se usa esta como mejor aproximación a la bomba que se usará en la planta ya que se trata de una bomba peristáltica, es decir, que el fluido está contenido en un tubo flexible, que a su vez está contenido en el rotor de la bomba el cual contiene unos rodillos para el desplazamiento del fluido.

La segunda usada (Figura 3.4) se trata de una bomba peristáltica también, pero que cuyo precio es mucho más competitivo que la primera por ello, reducirá los costes de la máquina como se puede ver en el Volumen II en su aparato 1.1 de esta misma memoria.



Figura 3.3.- Bomba Gilson Miniplus 3



Figura 3.4.- Bomba usada en el autómata

3.1.4. Electrodo

El sensor que se pretende usar es un electrodo conectado a un potenciostato. El electrodo determinará mediante una medida electroquímica la concentración de bacterias que existen en un volumen conocido. A modo ilustrativo, se muestra uno de los electrodos usados en este trabajo en la Figura 3.5.

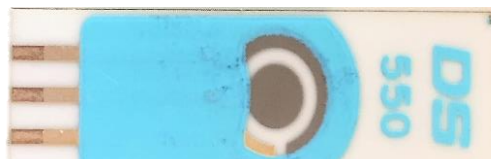


Figura 3.5.- Electrodo DropSens 550 (Platino vs Plata)

La realización de las medidas, se halla en el Capítulo 5 de esta misma memoria. Los electrodos usados se encuentran en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1.- Lista de los electrodos usados

| Modelo | Electrodo de trabajo | Electrodo de referencia |
|-----------|----------------------|-------------------------|
| DS-110 | Carbono | Plata |
| DS-550 | Platino | Plata |
| DS-C223BT | Oro | Plata |
| Naraoa | Carbono | Plata |

3.1.5. ELISA

El Ensayo de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA) es un tipo de ensayo bioquímico que consiste en la detección de una cantidad desconocida de anticuerpos en una muestra. En el caso de este estudio, se usará el Multiscan EX de Thermo Electron representado por la Figura 3.6.



Figura 3.6.- Multiscan EX de THERMO Electron Corporation

Esta detección se lleva a cabo gracias a que el anticuerpo tiene una enzima vinculada y en el paso final, se añade un sustrato que reacciona con dicha enzima.

La enzima provoca una reacción en el sustrato que produce un cambio de color, detectable en forma de una medida colorimétrica.

3.2. Fases del proceso

El proceso desarrollado en el CNM de Barcelona conlleva muchas fases que actualmente son manuales y que en el Capítulo 4 se detalla en profundidad cada parte del proceso. El proceso queda detallado a continuación:

Los elementos descritos en el apartado 3.1 de esta memoria, pretenden integrarse o sustituirse para conseguir la integración de estos en un solo dispositivo. Así como realizar todo el protocolo de forma autónoma.

Tal como se muestra gráficamente en la Figura 3.7, inicialmente la membrana de policarbonato se bloquea para evitar las diferentes interacciones de los anticuerpos con la membrana, que en consecuencia nos generan un error inespecífico que podrían producir al quedarse atrapados en el filtro.

El segundo paso es el de filtrado del agua y, por tanto, el atrapamiento en la membrana de policarbonato de las bacterias y partículas que se encuentren en ese momento en ella. Este proceso se denomina concentración, puesto que su finalidad es concentrar las bacterias que existen en un cierto volumen de agua.

Seguidamente se realizará un segundo bloqueo también para garantizar el bloqueo después del paso de flujos de agua muy elevados que consigan eliminar parcial o totalmente el bloqueo realizado previamente.

Como último paso antes de la detección, se realizan tres lavados consecutivos sobre la membrana con una dilución de Tween-20 en una concentración del 0.5% con la finalidad de eliminar el exceso de anticuerpos y, que por tanto, no se han unido a las bacterias contenidos en el filtro.

Finalmente, se hará un último lavado con PBS para eliminar los restos de Tween-20 que pueda haber en el filtro, para finalmente bañar los filtros en un sustrato de TMB; El cual se dejará incubar durante 16 minutos para su posterior inmunodetección mediante el método óptico ELISA a una longitud de onda de 620nm.

Gracias a esta detección óptica, que está relacionada con la interacción del TMB con los Ab y que estos están relacionados con las bacterias que se encuentran en el filtro. Mediante esta medida triplemente indirecta, se determina cuantitativamente las bacterias que se encuentran en el volumen de agua con el que se ha hecho la concentración de bacterias.

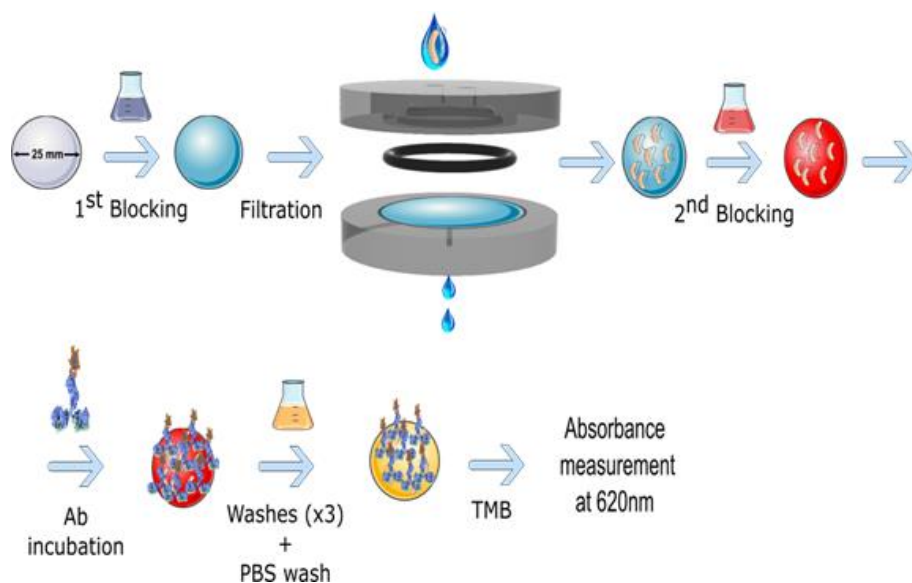


Figura 3.7.- Esquema del protocolo ya existente

3.3. Metodología de desarrollo

La metodología usada es el método científico, con la finalidad de minimizar la influencia de la subjetividad. Durante el desarrollo de este trabajo se ha hecho una hipótesis sobre lo que podría influenciar un cambio en el proceso ya existente y seguidamente se ha comprobado si este cambio lo ha afectado como se esperaba o no.

Finalmente, y aquí es donde se desarrolla el trabajo de ingeniería, si la introducción o modificación de elementos en el antiguo protocolo influía negativamente en el resultado final, lo que se ha pretendido ha sido solucionarlo ajustando los parámetros de ese elemento hasta que se consiga que el impacto de este sea mínimo.

3.4. Planificación de tareas

Este proyecto se inicia a finales de septiembre del 2016 con una duración prevista de 9 meses, por ello, es necesario una buena planificación de las tareas, así como una organización de todos los recursos y datos usados durante el proyecto con la finalidad de maximizar el tiempo empleado durante el proyecto.

3.4.1. Fases de desarrollo del proyecto

El proyecto evolucionará por tres fases las cuales se detallan a continuación:

1. Análisis de viabilidad: en esta primera etapa se valorará la viabilidad que tiene el proyecto tal y como está planteado, además, en esta fase se determinará si se debe seguir adelante con el proyecto estimando su viabilidad a nivel de ejecución.
2. Planificación detallada: en esta fase se detallará el plan de ejecución del proyecto donde se definirán las tareas necesarias para completar correctamente el proyecto y los tiempos de finalización.
3. Proceso de investigación y desarrollo: durante esta etapa se ejecutará el trabajo propiamente dicho. Es decir, que es la fase en la que se consiguen los resultados y conclusiones de la investigación.

3.4.2. Planificación de tareas y Diagrama de Gantt

A continuación, en la Tabla 3.2 se detallará la planificación de tareas programada para el desarrollo del proyecto. Además de la planificación del proyecto, adicionalmente, se incorpora en la Figura 3.8 un diagrama de Gantt que facilita la interpretación de la señalada tabla de programación de tareas.

Tabla 3.2.- Programación de tareas

| Nombre de la Tarea | Duración | Comienzo | Fin |
|--|-----------------|---------------------|---------------------|
| Project1 | 259 días | mar 20/09/16 | lun 05/06/17 |
| Análisis del proyecto | 21 días | mar 20/09/16 | lun 10/10/16 |
| Unión inespecífica de un filtro de nitrocelulosa | 108 días | sáb 15/10/16 | lun 30/01/17 |
| Con bacterias | 7 días | mar 24/01/17 | lun 30/01/17 |
| Blancos | 65 días | sáb 15/10/16 | mié 21/12/16 |
| Potenciostato | 1 día? | mar 20/09/16 | mar 20/09/16 |
| Análisis de reactivos | 90 días | vie 10/02/17 | mié 10/05/17 |
| Peróxido | 48 días | vie 10/02/17 | mié 29/03/17 |
| TMB | 41 días | jue 30/03/17 | mié 10/05/17 |
| Bomba | 4 días | jue 04/05/17 | dom 07/05/17 |
| Calibracion | 4 días | jue 04/05/17 | dom 07/05/17 |

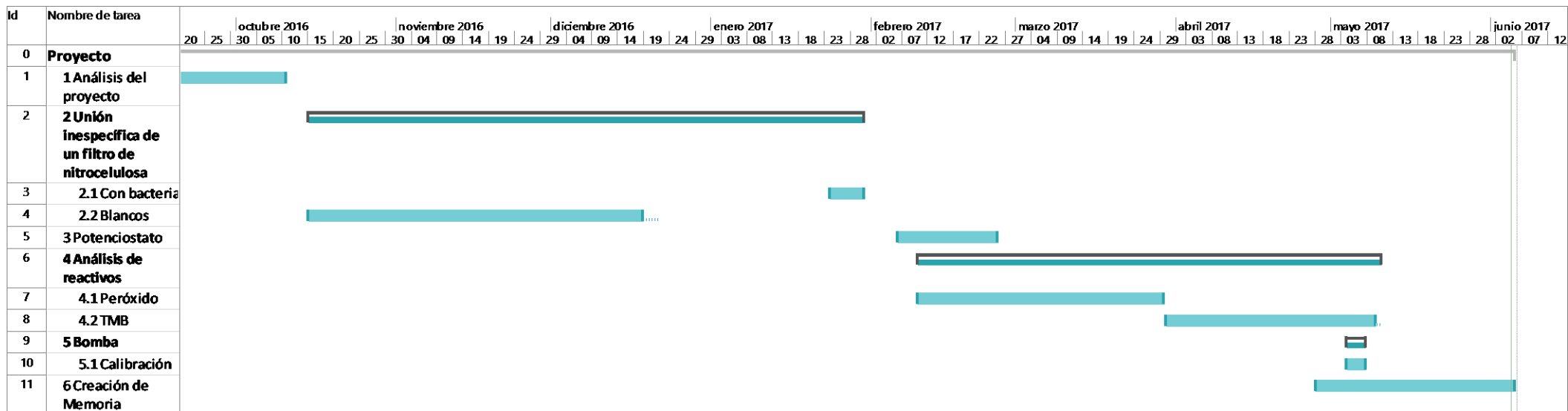


Figura 3.8.- Diagrama de Gantt del proyecto

4. Determinación de la unión inespecífica de un filtro de policarbonato causada por el filtrado

El error inespecífico que se ha querido estudiar de las membranas representa a los anticuerpos que se quedan unidos a la membrana, pero no a las bacterias.

Tal y como se indica en el [1], el mejor material para la membrana que se debe usar para la detección de *E. Coli* es el policarbonato ya que es la que más reduce la unión inespecífica de esta. Sin embargo, lo que se pretende hacer mediante este experimento es determinar cuál es el caudal óptimo para que el bloqueo aplicado en la membrana no se vea afectado negativamente por un posible arrastramiento de este por el flujo de agua que circula por él.

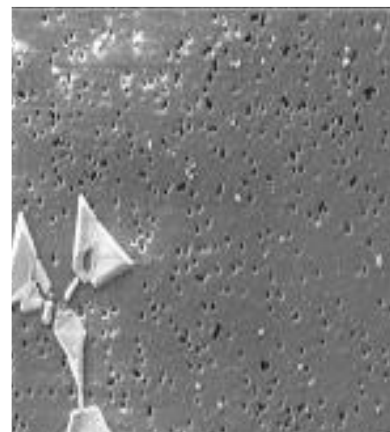


Figura 4.1.- Filtro de policarbonato bloqueado con Tw-20 al 1% bajo microscopio electrónico. (1).

4.1. Aspectos teóricos

Siguiendo las indicaciones encontradas en la referencia (1), se pretende hallar, usando el mismo procedimiento de laboratorio el error inespecífico que se da al hacer un lavado a distintos caudales.

En este caso, se define error inespecífico como el error producido por el atrapamiento de los anticuerpos en la membrana y su posterior detección. Para mitigar el alcance de este efecto, se bloquea con Tween 20 al 1 %, el cual según (1), es el mejor bloqueo aplicable a este tipo de filtro y a este tipo de anticuerpos en específico.

4.2. Análisis de flujo de la cámara de reacción

Se debe analizar los aspectos fluidicos que se corresponden con el filtro. Para determinar si la distribución de presión sobre la membrana no es uniforme. Esto provocaría una divergencia entre las zonas del filtro en lo que el bloqueo se refiere. Es decir, que habría zonas del filtro con un mayor bloqueo que se correspondería a las zonas donde la influencia de la presión fuera menor y otras zonas en la cual el bloqueo habría desaparecido.

4.2.1. Flujo del fluido

La Figura 4.2, ilustra el movimiento del agua en los distintos modos de funcionamiento del filtro. Como se aprecia durante el proceso de filtrado, todo el flujo de agua pasa por el filtro mientras que la segunda apertura queda bloqueada. En cambio, durante el proceso de Ab, lavado y detección; la entrada de los distintos productos, tiene como salida única la segunda apertura de la parte superior del filtro ya sea para proceder a la detección (en caso del YMB) o bien para su correcto almacenaje (en caso del Tween-20 y anticuerpos) y posterior tratamiento de residuos.

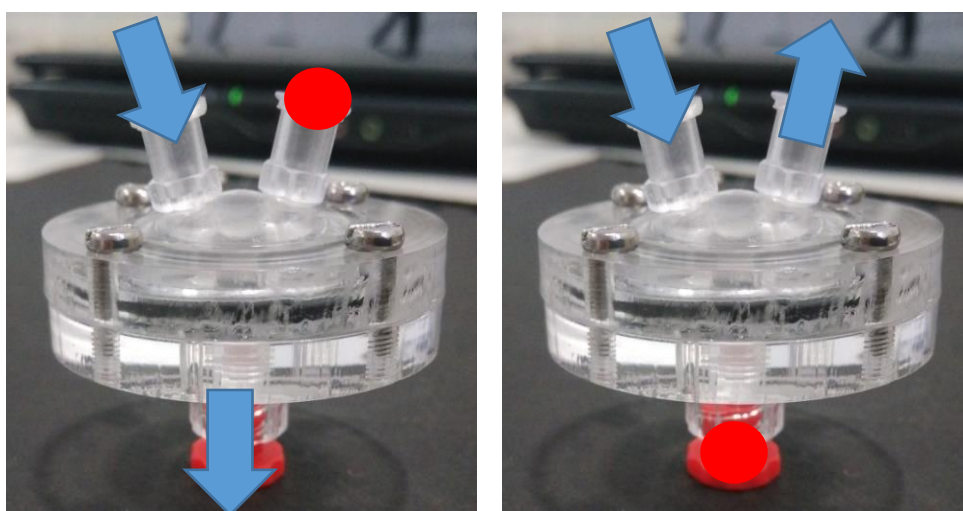


Figura 4.2.- Proceso de filtrado (izquierda). Proceso de Ab, lavado y detección (derecha)

4.2.2. Análisis del comportamiento fluídico

Se realizan una serie de simulaciones con el programa “Comsol multiphysics” en su versión 4.4 determinando la velocidad y vorticidad de agua en condiciones en las que el portafiltros, está en el proceso de lavado.

Respecto la velocidad, se pretende analizar, sobre todo, si el portafiltros es capaz de crear un flujo de agua por toda la superficie del portafiltros. Esto es relevante ya que de esta forma se evita que la medida que obtendremos por la tubería de salida, (la que se encuentra en el inferior de la Figura 4.3) no sea de una sección de la membrana, sino que sea de toda su área.

Analizando más en detalle la Figura 4.3, se aprecia que, aunque las velocidades más altas se concentran, en el camino más corto entre las tuberías de entrada y salida, también existe un flujo, aunque más débil en el resto del filtro. Lo que asegura que la medida que se obtendrá a la salida de la tubería 2, englobe a todo el filtro.

Porción: Magnitud de velocidad (m/s)
Línea de Flujo: Campo de velocidad

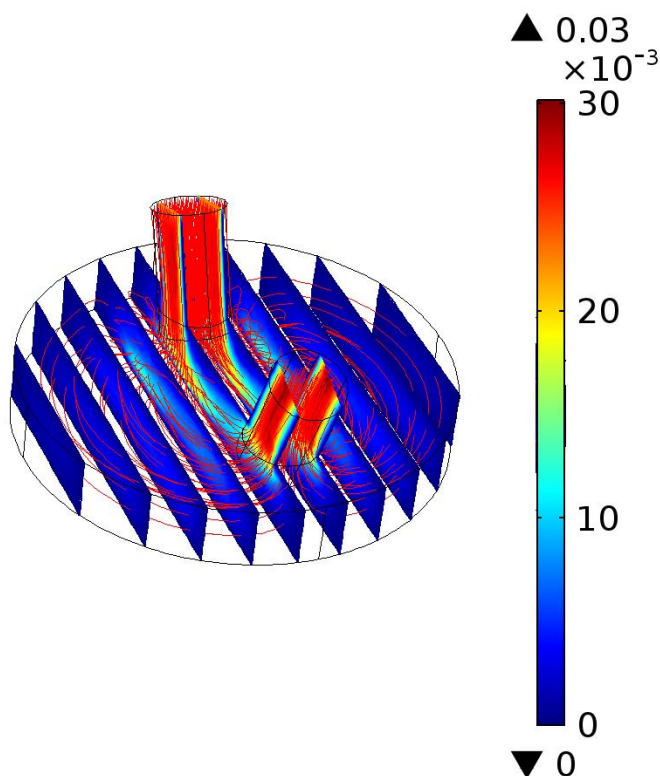


Figura 4.3.- Velocidad del agua en el portafiltros

La velocidad de cizalladura resulta ser de gran importancia puesto que no sólo es interesante medir la velocidad a la cual se desplaza el fluido sino también es relevante calcular la ratio de deformación sobre la superficie del filtro, para estimar la eliminación del bloqueo en los puntos. El “shear rate” o velocidad de cizalladura, entre dos placas paralelas se define como:

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h}$$

Donde $\dot{\gamma}$ es la velocidad de cizalladura que es el cociente de la velocidad de deformación entre la distancia entre las placas.

En la Figura 4.4, se muestra la dicha magnitud en el portafiltros en el que se aprecia como se crea un máximo relativo en la base de la entrada del portafiltros. Esto nos indica que existe una reducción del bloqueo en ese punto.

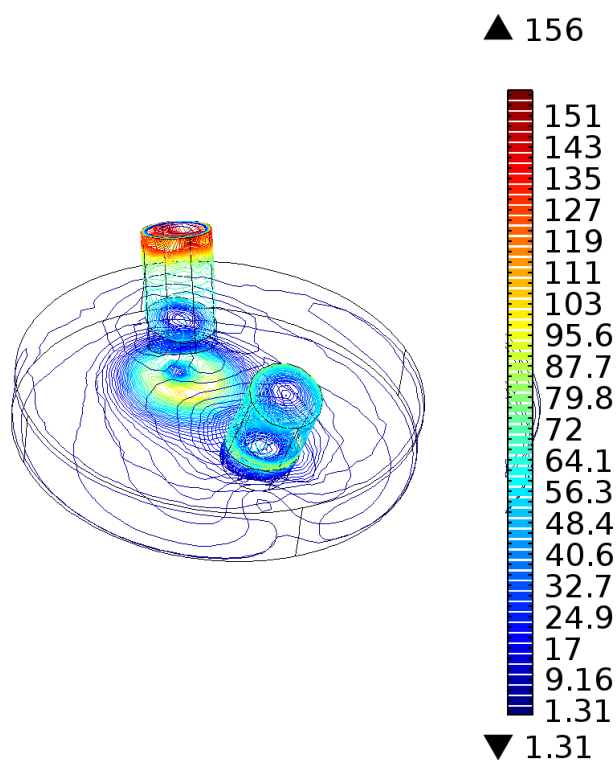


Figura 4.4.-Vorticidad del agua en el portafiltros

4.3. Proceso experimental

La hipótesis planteada es que, al hacer el lavado, debemos encontrar que el error inespecífico fuera mínimo a caudales bajos y que este fuera aumentando gradualmente o con un escalón a medida que se aumenta el caudal ya que, mediante el lavado con agua, la protección de la membrana proporcionada por el Tween-20 al 1%, podría degradarse.

El protocolo de laboratorio para realizar este experimento, se describe a continuación:

a) Preparación Phosphate-buffered saline (PBS)

1. Poner agua destilada en una botella.
2. Poner en la botella una pastilla de PBS por cada 200 mL.
3. Esperar que las pastillas se diluyan agitándolas con un agitador.
4. Autoclavar durante 15 minutos.

b) Preparación del Tw-20 al 1%

1. Preparar PBS.

2. Disolver 4 mL de Tw-20 en 400 mL de PBS.
3. Agitar la botella.
4. Autoclavar durante 15 minutos.

c) Preparación anticuerpos (1/10)

1. Pipetear 15 μ L de Ab y poner en un eppendorf
2. Pipetear 135 μ L de PBS y ponerlos en el anterior eppendorf

d) Pasos de filtrado

Todos los procesos anteriores son la antesala para poder realizar el proceso de filtrado y deben prepararse antes de llegar a este paso para ello, se requiere:

1. Colocar la membrana con la parte brillante hacia arriba para el tratamiento en un pozo de una placa de cultivo.
2. Bloquear la membrana con 2 mL de Tw-20
3. Agitar a 80 rpm (30 rpm con células) durante 5 minutos.
4. Montar la bomba en el segundo nivel poner agua en dos botes estériles y ajustar el caudal según lo señalado en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1.- Caudales de filtrado usados

| Caudal [ml/min] | Velocidad de la bomba | Volumen Final [ml] |
|-----------------|-----------------------|--------------------|
| 0 | 0 | 0 |
| 0.25 | 0.52 | 1.25 |
| 0.5 | 1.12 | 2.5 |
| 0.75 | 1.69 | 3.75 |
| 1 | 2.25 | 5 |
| 1.25 | 2.87 | 6.25 |
| 1.5 | 3.35 | 7.5 |
| 1.75 | 3.95 | 8.75 |

5. Purgar el circuito.
6. Una vez acabado el paso 3, sacar el Tw-20 del pozo.
7. Poner una membrana en el portafiltros con la parte mate mirando hacia el desagüe.
8. Atornillar las dos partes del portafiltros y los tubos de la bomba.
9. Encender la bomba, esperar a que haya salido el aire para poner el tapón e ir comprobando si hay pérdidas.
10. Sacar la membrana y ponerla en un pozo.
11. Coger anticuerpos del cajón nº3.
12. Poner los anticuerpos con la membrana en una disolución de 1980 y 20 Ab (1/1000).
13. Agitar a 80 rpm (30 rpm con células) durante 30 minutos.
14. Lavar con 2mL de Tw-20 al 0.5%.
15. Agitar a 80 rpm (30 rpm con células) durante 5 minutos.
16. Repetir los pasos 14 y 15 tres veces.
17. Arrancar ELISA con 620 nm.
18. Lavar con 2mL de PBS.
19. Agitar a 80 rpm (30 rpm con células) durante 5 minutos.
20. Pasar las membranas a otro pozo.
21. Añadir sobre las membranas 500 µL de tetrametilbencidina (TMB), nunca directamente del bote.

22. Agitar a 80 rpm (30 rpm con células) durante 16 minutos.
23. Pipetear 100 μ L del líquido resultante en el pozo mezclando con la pipeta.
24. Medir con ELISA.

Este último procedimiento deberá repetirse para cada uno de los caudales definidos en la Tabla 4.1.

4.4. Resultados

Este proceso experimental, arroja unos resultados mostrados en la Figura 4.5, en la que se muestra la absorción medida por el Multiskan EX a 620nm (color rojo). En ella se aprecia que, en el caso del caudal nulo, al no existir ningún elemento externo que perturbe al bloqueo, el anticuerpo no se queda unido al filtro. Sin embargo, ya en caudales muy bajos, apreciamos un arrastre del bloqueo que provocará una unión inespecífica de los anticuerpos al filtro.

La variación es poca en los tres primeros caudales (0.25 ml/min, 0.5 ml/min, 0.75 ml/min), de hecho, si observamos las barras de error, se considera todas las medidas tienen el mismo valor. No obstante, se aprecia una variación brusca a partir de un caudal de 1 ml/min, pudiendo extender dicha premisa para el resto de caudales.

El resultado anteriormente comentado hace pensar en una gráfica tipo escalón (tal como se muestra en la Figura 4.5 con una línea azul); Esto indica que, el flujo consigue eliminar el bloqueo de Tween-20 de forma superficial a caudales bajos, no obstante, a partir de un caudal de 1 ml/min, el flujo de agua, consigue arrancar el ya mencionado bloqueo en puntos más profundos de la membrana.

Con ello se indica que después de un filtrado, el bloqueo inicial, no es efectivo. Por ello es necesario que después de este proceso de filtrado, aunque los caudales sean bajos, se vuelva a bloquear la membrana para así evitar la unión inespecífica con el filtro y el error derivado de dicha unión.

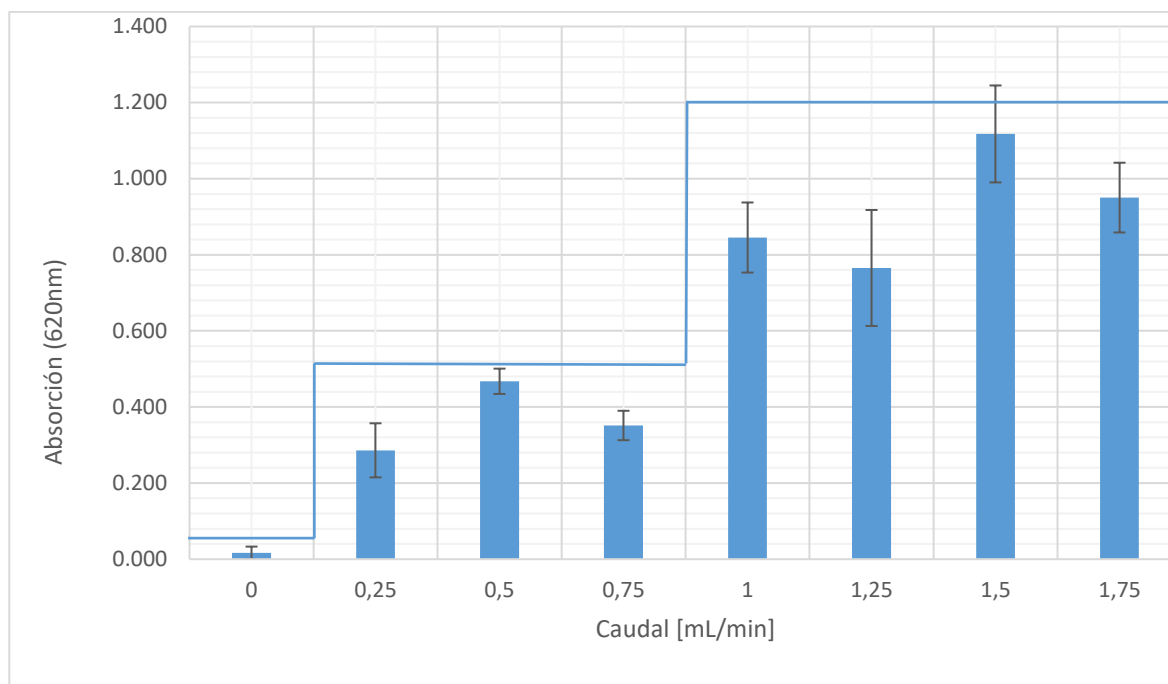


Figura 4.5.-Absorbión medida respecto de la velocidad de flujo

5. Cambio de un proceso inmunológico a uno electroquímico

Como ya se ha detallado en el Capítulo 1 de la presente memoria, este proyecto tiene como objetivo la automatización de un protocolo de laboratorio. Con dicha finalidad, se debe adaptar el método de inmunodetección usado en el Capítulo anterior con el objeto de poder hacer las medidas de una forma automática, autónoma y fiable. Una primera aproximación será continuar usando el mismo indicador usado para el método de inmunoabsorción. La decisión de usarlo para dos medidas de naturaleza distinta, viene dada por el artículo [37]; en el que se justifica que es posible el uso del TMB para medidas electroquímicas por los motivos que se detallan en el apartado 5.1.1.

En segundo lugar, se intentará cambiar el indicador original, es decir, TMB por peróxido de hidrógeno. Los motivos que se detallan en el apartado 5.2.1 son que los anticuerpos de tipo HRP reaccionan con el peróxido reduciéndolo, y por ello, se podría realizar una medida electroquímica de esta reacción redox.

5.1. Análisis electroquímico del TMB

En un primer lugar, se intenta mantener el indicador usado en el método óptico ya que tal y como se detalla en el siguiente apartado, parece posible mantenerlo.

5.1.1. Marco teórico

En la Figura 5.1, se ilustra la reacción química de tipo redox que se produce por medio de los anticuerpos de tipo HRP, que provocan un cambio de color en el sustrato de TMB. Con este sustrato, se realiza la prueba de ELISA en el protocolo del que se parte y que se quiere adaptar.

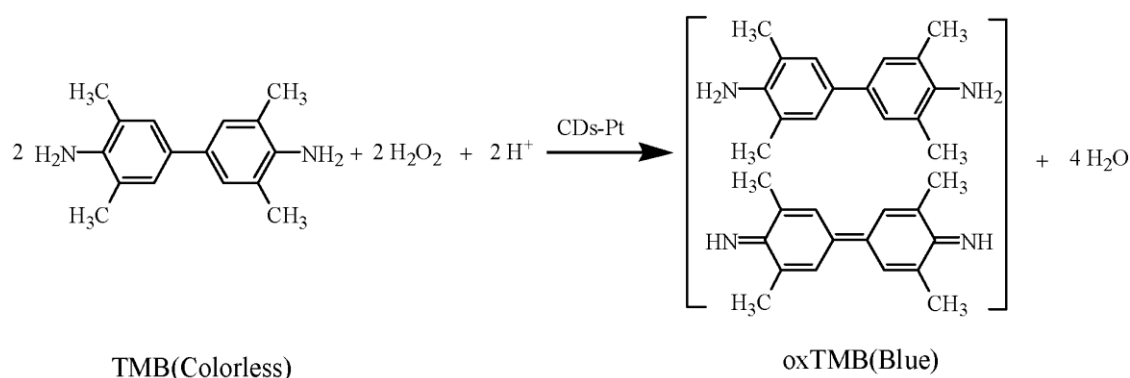


Figura 5.1.- Reacción del TMB

Como se aprecia en la figura anterior, y por la misma definición de una reacción redox, existe un intercambio de cargas. Aprovechando esta particularidad de la reacción, podemos transformar la medida óptica hecha por ELISA por una medida electroquímica mediante la evaluación de la transferencia de cargas entre el estado inicial (TMB reducido) al estado final (TMB oxidado). Con esta determinación se pretende establecer una relación entre el anterior método comprobado, desarrollado extensamente con este nuevo método electroquímico.

5.1.2. Requisitos previos

Con tal de establecer la relación entre el anterior método y el nuevo será necesario, en primer lugar, realizar una recta de calibración del método anterior para posteriormente establecer la relación deseada entre ambos métodos.

La Figura 5.2 pretende no sólo establecer el punto de partida para analizar las concentraciones de Ab que se deberán usar en el análisis electroquímico, sino que también se establece la recta de calibración para, posteriormente, establecer la relación entre ambos métodos. Para, poder trasladar todas las medidas realizadas con el anterior método óptico, al nuevo método electroquímico mediante una operación matemática.

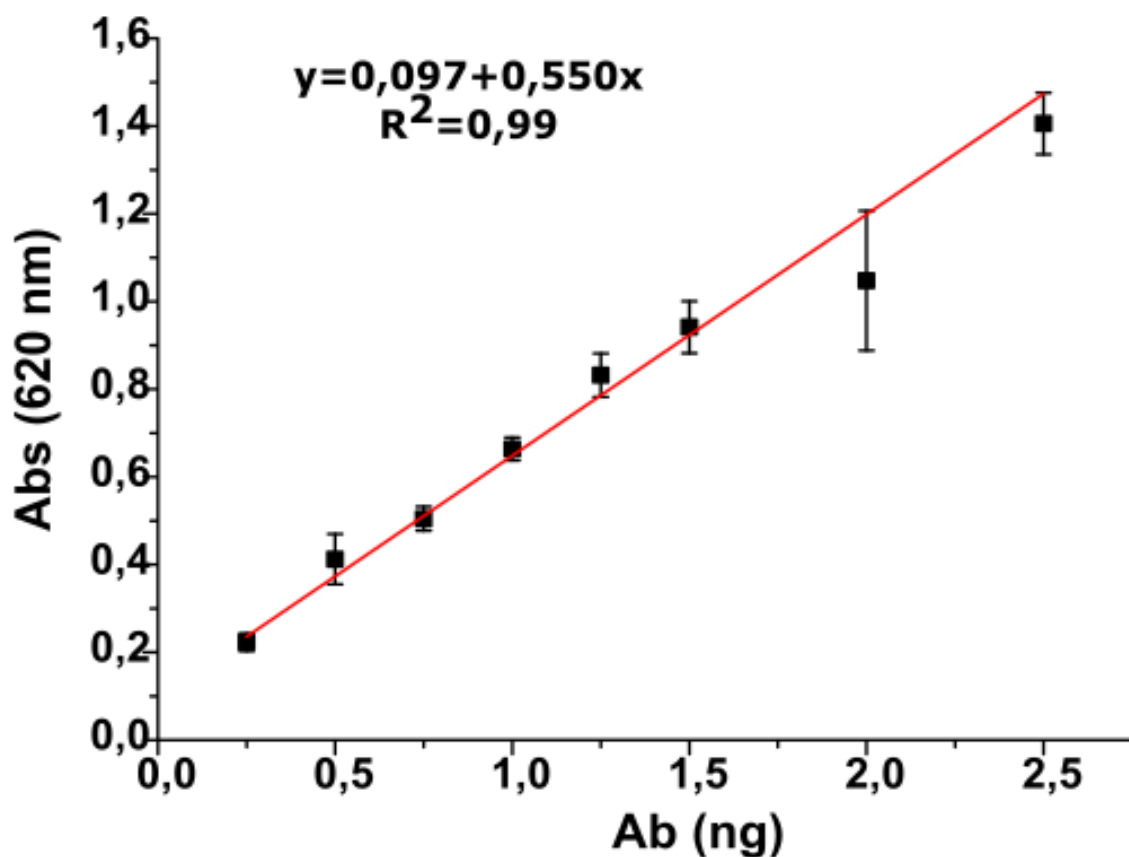


Figura 5.2.- Recta de calibración del TMB por el método de absorbancia

5.1.3. Proceso experimental

1. 1 mg / ml de anticuerpo en stock.
2. Consideramos una dilución de anticuerpos 1/1000 en PBS como el 100 % (1µg / ml).
3. Prepararemos otra dilución de un 10 %.
4. Seguidamente usaremos la dilución del 10 % para preparar las siguientes diluciones, tal como se detalla en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1.- Tabla de volúmenes de anticuerpos usados

| Concentración Final | Volumen anticuerpos al 10% [μ l] | Volumen PBS [μ l] |
|---------------------|---------------------------------------|------------------------|
| 0% | 0 | 200 |
| 0.25% | 5 | 195 |
| 0.5% | 10 | 190 |
| 1% | 20 | 180 |
| 1.5% | 30 | 170 |
| 2% | 40 | 160 |
| 2.5% | 50 | 150 |
| 3% | 60 | 140 |
| 4% | 80 | 120 |
| 5% | 100 | 100 |

5. En volúmenes iguales, mezclar una de las concentraciones de anticuerpos y TMB.
6. Poner en el electrodo una gota de 50 μ l.
7. Iniciar una voltametría cíclica.
8. Determinar los potenciales de los picos y las corrientes anódicas y catódicas.
9. Determinar el potencial relevante para el estudio.
10. Volver a repetir los pasos 1 hasta 6.
11. Iniciar una cronoamperometría de 1800 segundos.
12. Buscar el punto de estabilización de la cronoamperometría.
13. Trazar una curva de calibración con la concentración en función de la corriente.
14. Analizar si es posible establecer una relación entre el antiguo método de absorbancia y el nuevo método electroquímico.

a) Velocidad de reacción

Inicialmente, se deja la reacción en reposo durante un tiempo de 16 minutos, ya que es el tiempo de reacción usado para la medida en los filtros de policarbonato. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con los filtros, se forman precipitados en la dilución. Una posterior investigación sobre este comportamiento en el TMB, indica que, si la velocidad de reacción es demasiado alta, se puede dar la formación de precipitados, falseando así el valor medido.

La aparición de los precipitados, se da con mayor celeridad con este método ya que al mezclar directamente el TMB con los anticuerpos sin haber ningún bloqueo o membrana, se mejoran así las condiciones para que el HRP del anticuerpo pueda reaccionar más rápidamente con el sustrato de TMB. Los precipitados afectan tanto a la medida óptica, como también a la medida electroquímica.

Para solventar esta aparición de precipitados, se iniciará la medida en un tiempo nunca inferior a un minuto y nunca superior a tres minutos desde el momento de la mezcla del TMB con el Ab. De esta forma, podemos asegurar que la medida no se verá comprometida por la aparición de los precipitados.

b) Electrodo

El análisis electroquímico del TMB, no sólo se limita a la determinación de una recta de calibrado electroquímico del TMB, sino que también se pretende determinar cuál es el mejor material del electrodo de trabajo que se debe emplear para dicho análisis.

En este caso se han empleado cuatro electrodos distintos, tres de ellos de la marca comercial DropSens (electrodo de trabajo de Platino, Oro y Carbono) y un último propio del centro (electrodo de trabajo de carbono), llamado, a partir de este punto como electrodo “de Naroa”. Todos ellos, usan un electrodo de referencia de plata. En la Figura 5.3, encontramos una fotografía de los electrodos usados.



Figura 5.3.- Electrodo usados (Platino, Oro, Carbono y Carbono Naroa; respectivamente)

La razón principal por la que se usan electrodos distintos es debido a que los electrodos no están formados por materiales inertes, aunque se componen todos de metales nobles, es decir, que no reaccionen fácilmente con otros compuestos o elementos. Sin embargo, los electrodos reaccionarán con la sustancia con la que estén en contacto. Esto, provocará cambios en la zona superficial del electrodo y, por tanto, el proceso de medida se verá afectado por ello. En consecuencia, se trabaja con distintos materiales para determinar cuál es el electrodo que mejor se adapta a la sustancia con la que

se está trabajando. Esto se trata de un método empírico el cual requiere muchos ensayos, para más detalle ver el Anexo A.

En las cuatro figuras siguientes (Figura 5.4-Figura 5.7), a modo ilustrativo, se muestran las voltametrías cíclicas realizadas en las mismas condiciones (concentración y velocidad de barrido) y con las que se pretende ilustrar la variabilidad que existe entre los distintos electrodos. Además, estas gráficas también determinan cual será el electrodo más óptimo para la realización de los ensayos sucesivos con TMB.

Como se muestra en la Figura 5.4 hasta Figura 5.7, en las que se han hecho los voltamogramas con tres repeticiones, el TMB es muy sensible al material usado en el electrodo de trabajo. Además, analizando las figuras, se aprecia que los valles de reducción son los más difíciles de obtener. Los únicos electrodos que nos muestran correctamente esos valles, son los electrodos de carbono y entre los dos, los mejores son los electrodos no comerciales creados en el centro. Sin embargo, dichos electrodos tienen una variabilidad más alta que los electrodos de DS-110, pero al ser los comerciales más caros, se busca un compromiso y se eligen los electrodos del centro.

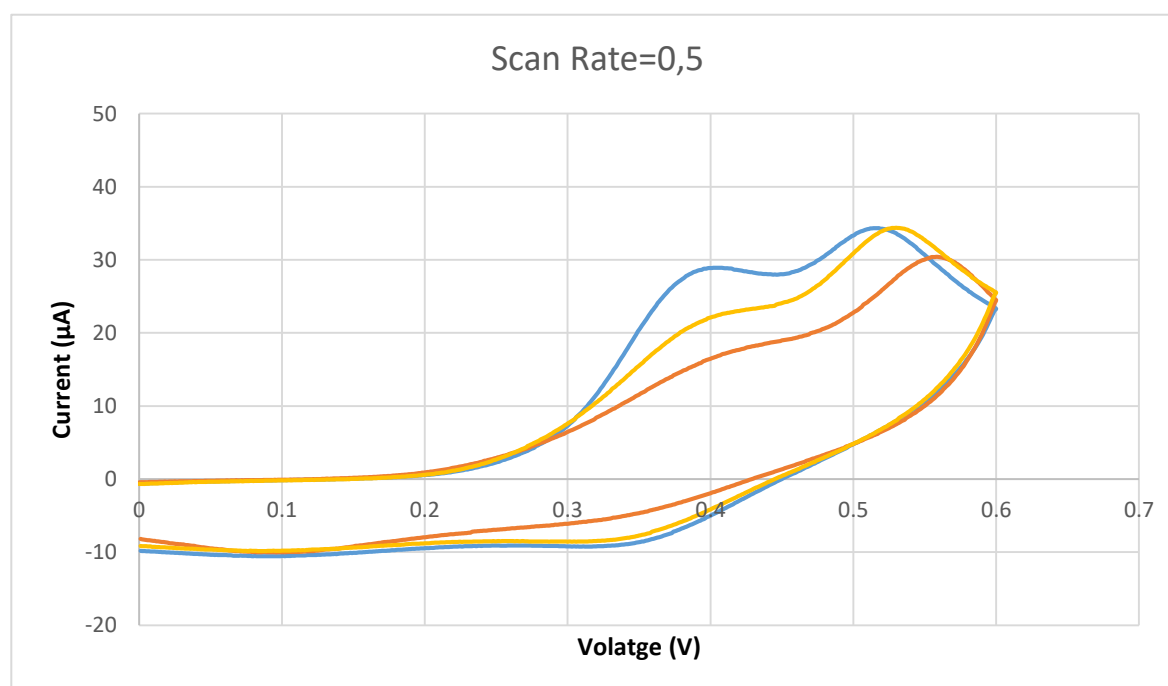


Figura 5.4.- Voltametría cíclica con electrodos DS-C223BT

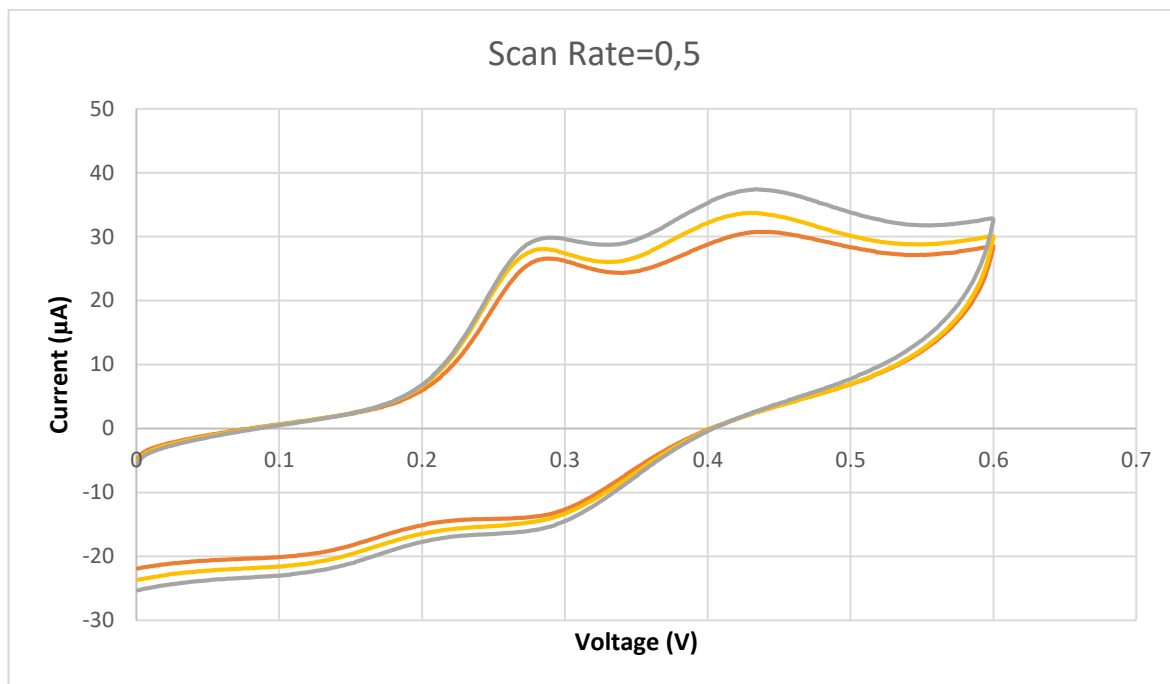


Figura 5.5.- Voltametría cíclica con electrodos DS-550

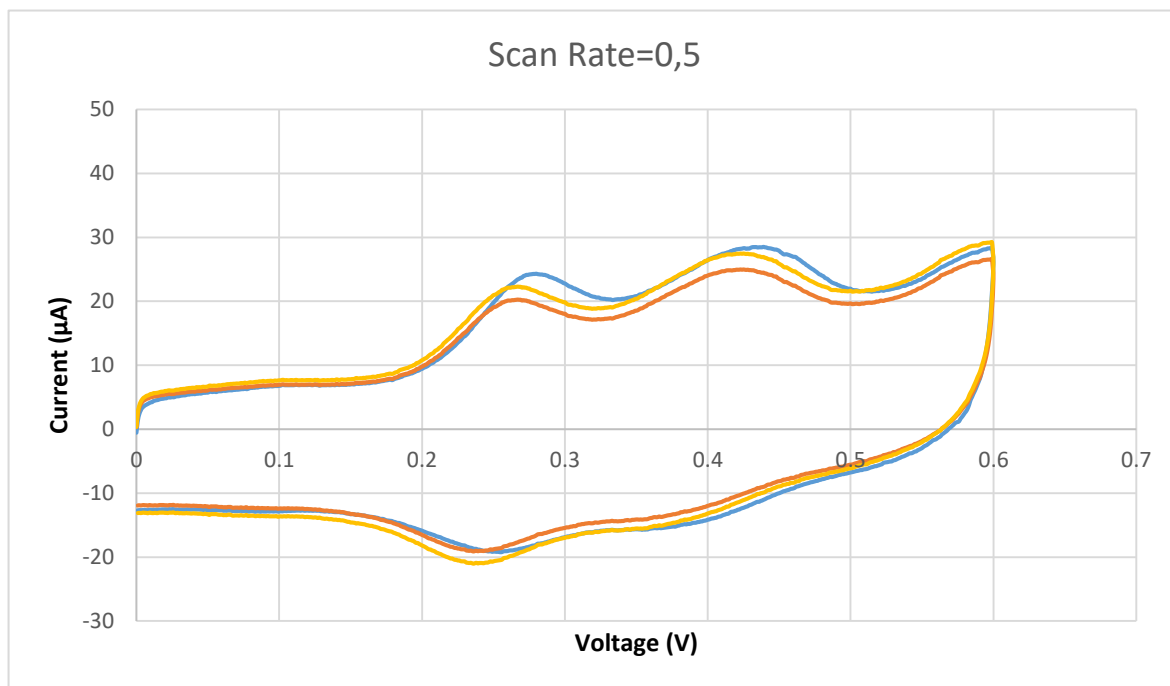


Figura 5.6.- Voltametría cíclica con electrodos DS-110

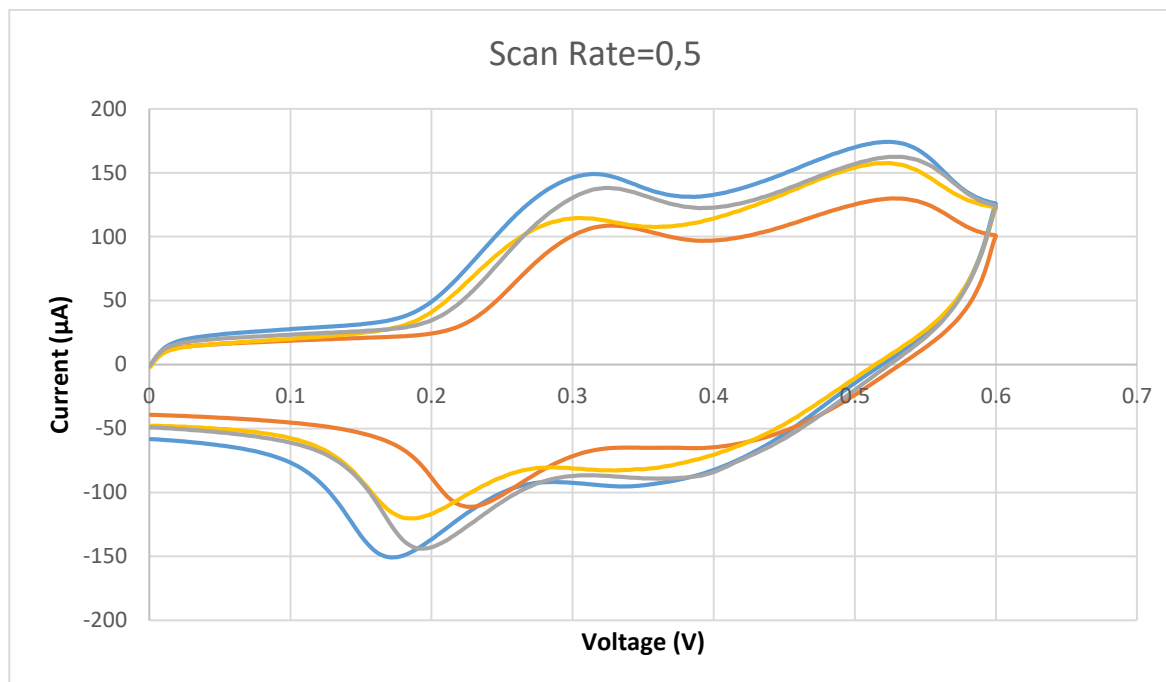


Figura 5.7.- Voltametría cíclica con electrodos Narao

c) Velocidad de barrido

La velocidad de reacción afectará a la medida porque perturbará el comportamiento difusivo que tiene un electrodo; Esto implica que existe una transferencia de masa que se puede definir por la ecuación de Plank-Nernsts:

$$J(x) = -D \frac{\delta C(x)}{\delta x} - \frac{z \cdot F}{RT} \cdot D \cdot C \cdot \frac{\delta \phi}{\delta x} + C \cdot v(x) \quad (1)$$

Obviando los fenómenos de migración y convección, obtenemos la ecuación (2):

$$J(x) = -D \frac{\delta C(x)}{\delta x} \quad (2)$$

Como se desprende de la ecuación (2), la zona difusiva dependerá como varíe la concentración con la posición y el tiempo. Por ello se debe emplear la segunda ley de Fick (3) en la que interviene tanto la posición como el tiempo:

$$\frac{\delta C}{\delta x} = D \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad (3)$$

De la anterior ecuación, se obtiene:

$$\frac{\delta C(x, t)}{\delta x \delta t} = \frac{C_s}{\sqrt{\pi \cdot D \cdot t}} \cdot e^{\left(-\frac{x^2}{4 \cdot D \cdot t}\right)} \quad (4)$$

En la superficie del electrodo:

$$\left. \frac{\delta C(x, t)}{\delta x \delta t} \right|_{x=0} = \frac{C_s}{\sqrt{\pi \cdot D \cdot t}} \quad (5)$$

De la ecuación (5) se deduce que como mayor sea el tiempo, menor será la pendiente de la concentración en función de la distancia. En otras palabras, si la velocidad de barrido es lenta, obtendremos una zona difusiva mayor, lo que permitirá una mayor facilidad de reposición de las especies. Esta afirmación se representa en la Figura 5.8:

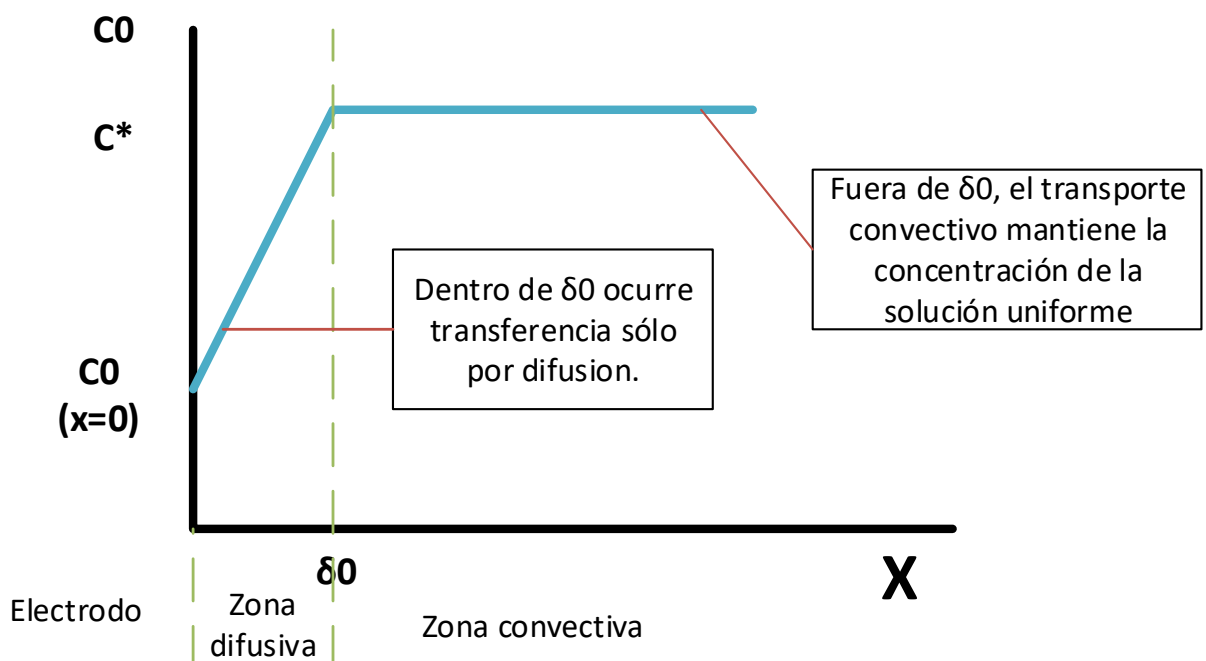


Figura 5.8.- Gráfica de difusión en el electrodo

Por otra parte, partiendo de la primera ley de Fick (6) donde J es el número de especies por unidad de tiempo y superficie, D es el coeficiente de difusión (si es alto el sistema podrá reponer los iones que faltan rápidamente) y la derivada $\frac{\delta C(x)}{\delta x}$, tiene en cuenta la variación de concentración C , a lo largo de una distancia, x . De la ecuación del flujo se deriva fácilmente la de densidad de corriente. No es más que el producto de la carga por el del flujo de las especies que las transporta (7):

$$J(x) = -D \cdot \frac{\delta C(x)}{\delta x} \quad (6)$$

$$j = -z \cdot F \cdot J = -z \cdot F \cdot D \cdot \frac{\delta C(x)}{\delta x} = -z \cdot F \cdot D \cdot \frac{C_0 - C^*}{\delta} \quad (7)$$

Atendiendo a esta expresión se puede deducir cuándo la densidad de corriente se hace máxima: cuando el valor de C_0 es cero, es decir, cuando la reacción ha agotado totalmente las existencias de especies reactivas en las cercanías del electrodo. Esto explica que en la Figura 5.9 los picos de corriente sean más bajos que en las velocidades de barrido bajas.

Por todo lo anterior, durante las voltametrías cíclicas, además del parámetro de la zona en el potencial a la que se desea hacer el barrido, también existe un parámetro que determina la velocidad de barrido o "Scan Rate" en los ensayos.

Este parámetro es crucial para poder apreciar bien los picos donde se ceden o reciben electrones. En este caso se ha probado con las velocidades de barrido que se muestran en la Figura 5.9.

Como se aprecia en dicha figura, las velocidades de barrido altas ($SR=5, 2, 1$ V/s) no permiten apreciar correctamente los picos que indican la liberación o absorción de electrones. Y las velocidades de barrido bajas ($SR=0.1, 0.05, 0.02, 0.01$ V/s), aunque conservan los picos de oxidación de la reacción, no se aprecian correctamente los picos de reducción.

En consecuencia, se establece que la mejor velocidad de barrido es la que corresponde con una velocidad de barrido de 0.5 ó 0.2 V/s. ya que visualmente se aprecia que son las dos gráficas que quedan mejor definidas entre las que se observan en la Figura 5.9.

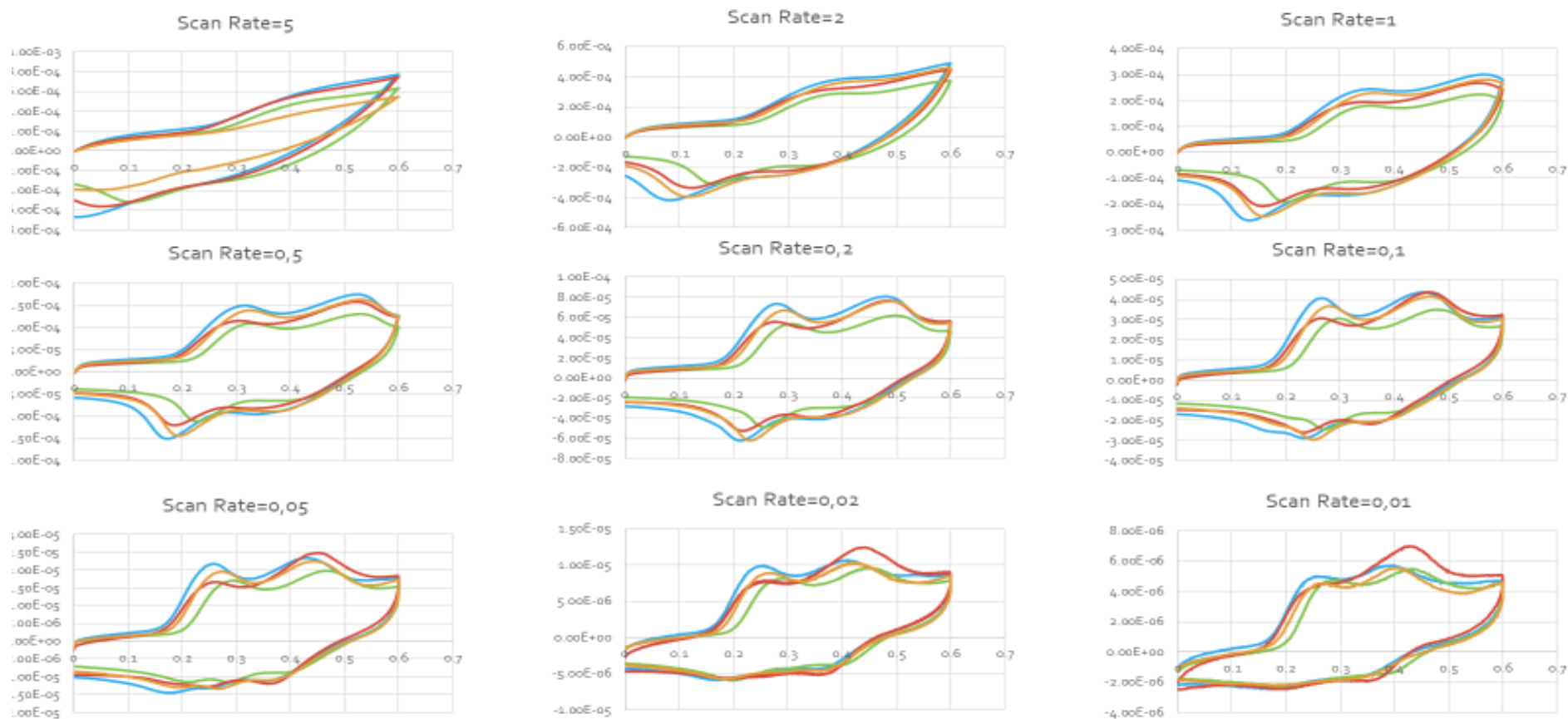


Figura 5.9.- Voltametrías cíclicas a distintas velocidades de barrido con los electrodos de Carbono Narao

5.1.4. Resultados

a) Análisis de concentraciones

Con el fin de analizar correctamente el sustrato de TMB, compararemos todas las medias de las voltametrías cíclicas a distintas concentraciones para verificar que el potencial de oxidación no se desplaza al variar la concentración. De la Figura 5.10 se interpreta que todos los picos de oxidación de distintas concentraciones, coinciden en su potencial. Esto último, resulta ser un dato ventajoso para la determinación del potencial en el cual se debe hacer la cronoamperometría, ya que es uno de los parámetros que se deberá fijar para este ensayo.

Sin embargo, en los picos de reducción se produce un desplazamiento inversamente proporcional a la concentración; Esto ya indica, que estos no serán los picos de interés, puesto que será más difícil establecer los parámetros necesarios para en estos casos.

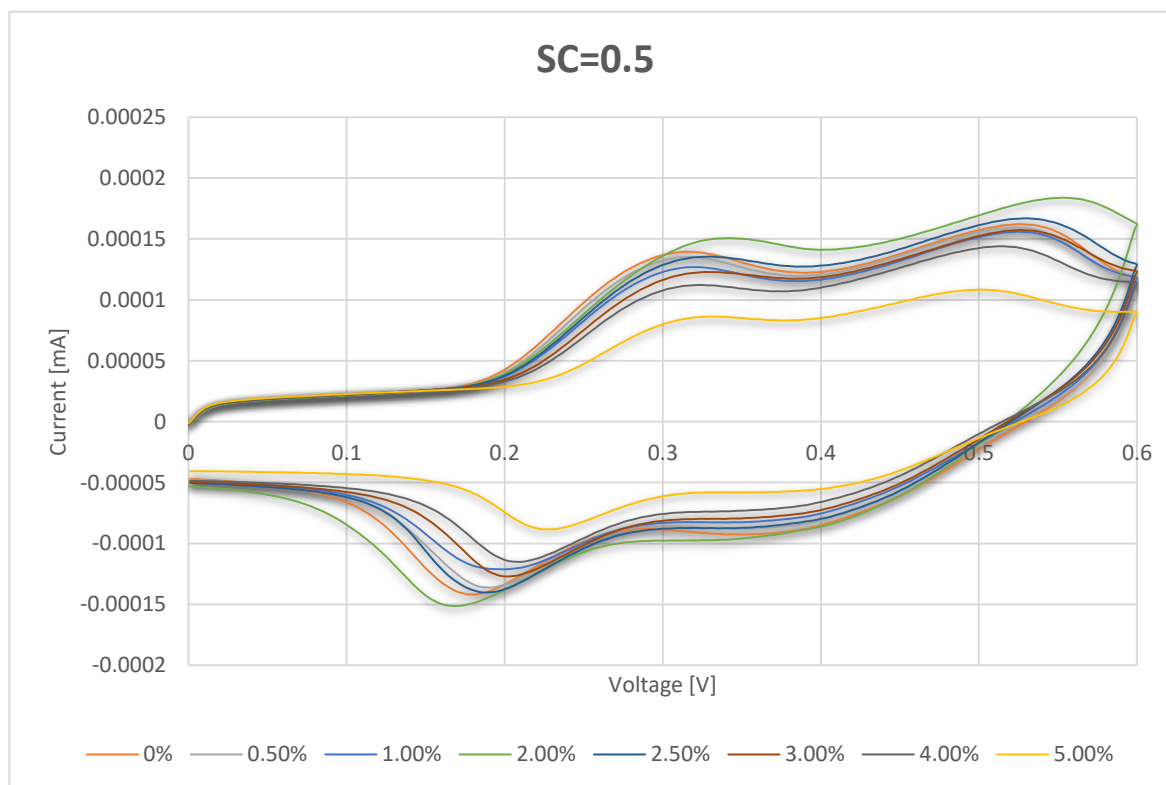


Figura 5.10.-Resumen de las voltametrías cíclicas a distintas concentraciones con los electrodos de Carbono Narao

b) Análisis de picos

El análisis de los picos hallados en las voltametrías cíclicas, es necesario para poder continuar con el ensayo puesto que, gracias este, se podrán determinar los parámetros de ejecución del siguiente ensayo. Por tanto, podemos decir que este es un ensayo intermedio antes de la obtención del resultado final.

Una vez determinados los picos de oxidación y reducción, procederemos a la determinación de las tensiones en los picos, las corrientes catódicas y anódicas. Con cada una de estas variables, se estudiará su variación en función de la concentración y velocidad de barrido.

Tal como ilustra la Figura 5.11, y como cabía esperar debido a los resultados mostrados en la Figura 5.10 el primer pico de oxidación tiene una variabilidad muy baja a los cambios de concentración e incluso a las velocidades de barrido. A pesar de haberse analizado todos los picos (los resultados se recogen en los anexos), se concluye que el relevante para el presente estudio es el mostrado en el presente gráfico.

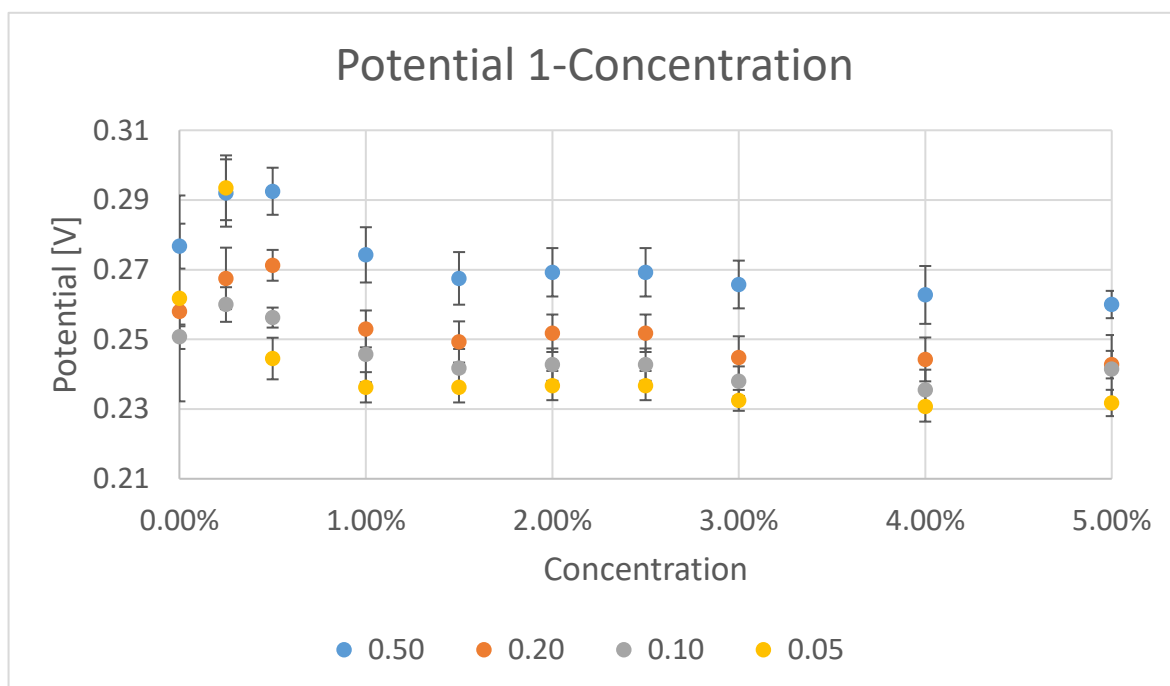


Figura 5.11.- Tensiones en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naroa

Por su parte, la Figura 5.12 trata de la corriente catódica en el primer pico de oxidación. En ella observamos claramente diferencias con las distintas velocidades de barrido, este es un resultado esperado debido a la velocidad de reacción del TMB. De la siguiente gráfica, se concluye que existe una buena linealización y una baja variabilidad. Asimismo, cabe destacar que el resultado obtenido a falta

de los resultados cronoamperométricos que se analizan en el apartado c), indican una buena linealización del TMB, por tanto, parece ser posible hacer el cambio de método.

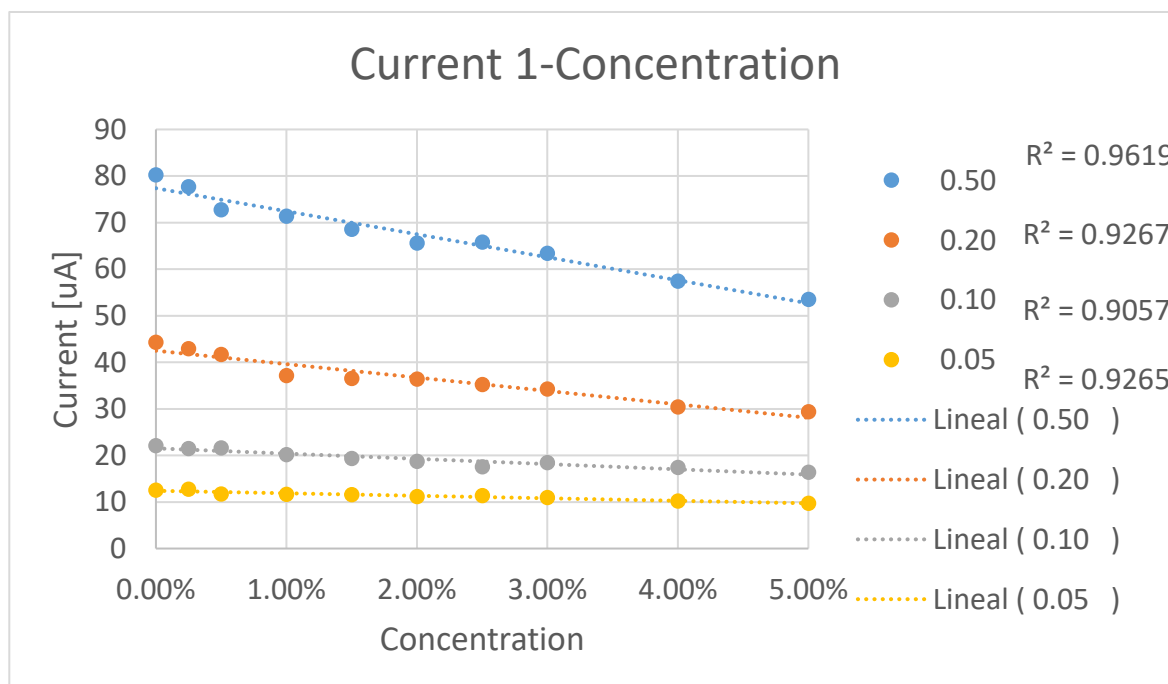


Figura 5.12.-Corriente en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naroa

c) Cronoamperometría

Finalmente, la medida más relevante, y que está basada en las medidas anteriores de este Capítulo, es la llamada cronoamperometría o curva I-t. Esta curva representará la corriente en función del tiempo a un potencial fijo. Esto nos permitirá determinar cuál es la corriente de estabilización en ese punto. El potencial se fija mediante el promedio de potenciales de oxidación o reducción hallados por las voltametrías cíclicas a distintas concentraciones. Adicionalmente, para asegurar que la reacción se produce totalmente, se le añade, en caso que se trate de una oxidación o sustrae si se trata de una reducción, un margen de seguridad al promedio del potencial.

En esta última fase del ensayo, se realizarán las cronoamperometrías al potencial anteriormente hallado más su desviación estándar, así se asegura en todos los casos la oxidación del sustrato, es decir, la tensión de la solución de anticuerpos y TMB debe ser de 0.27 V. Durante este ensayo, esperamos encontrar una relación y a la vista de los resultados obtenidos en la Figura 5.12, dicha relación debería ser de tipo lineal entre la corriente de estabilización y la concentración.

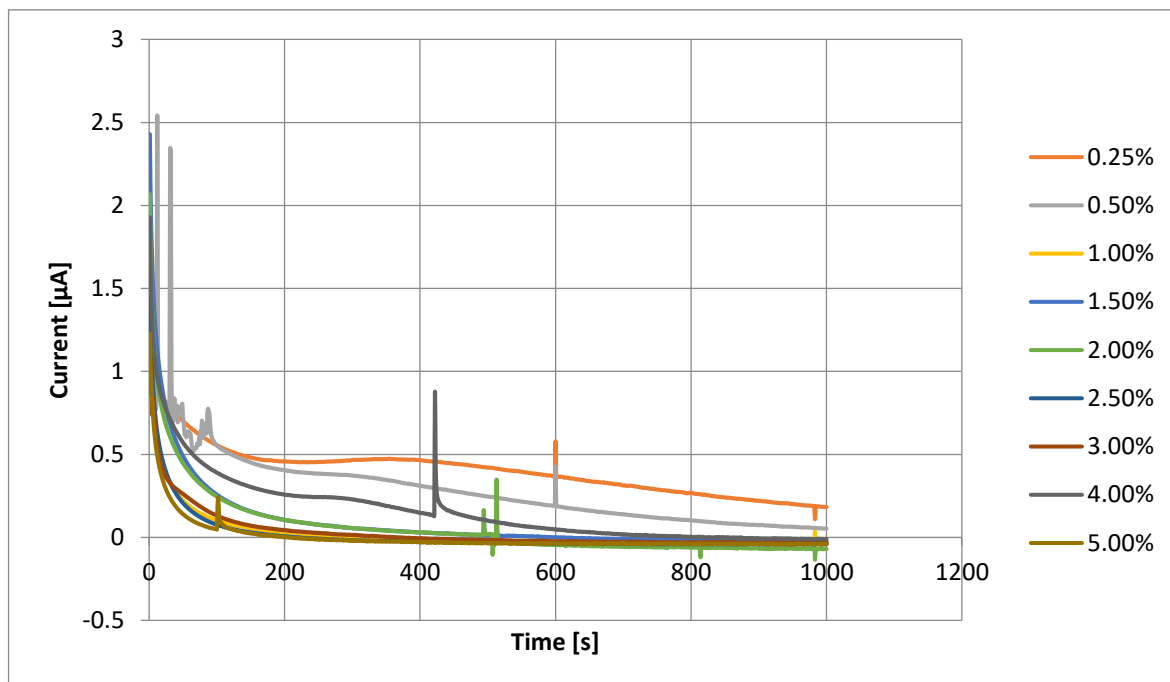


Figura 5.13.- Resumen de las Cronoamperometrías en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naroa

Como se esperaba por los datos arrojados en la Figura 5.12, se ha hallado una relación lineal entre la concentración de anticuerpos y la corriente de estabilización, (mostrada en la Figura 5.13) de la sustancia usada tal como se muestra de forma resumida en la Figura 5.14.

Adicionalmente a la Figura 5.14, la Figura 5.15 es una medida que se hizo en las mismas condiciones de ensayo antes de la realización de este proyecto. Como se puede comprobar, existen unas divergencias entre ambas, por lo que se deberían hacer más pruebas para determinar de dónde proviene el fallo ya que proviene de una degradación de los anticuerpos, una degradación del TMB o bien del propio proceso experimental.

Sin embargo, existen varios datos relevantes que indican que la medida va por buen camino. La pendiente negativa, el valor de dicha pendiente y el paso a valores negativos de corriente son comunes en las dos gráficas mencionadas en el párrafo anterior.

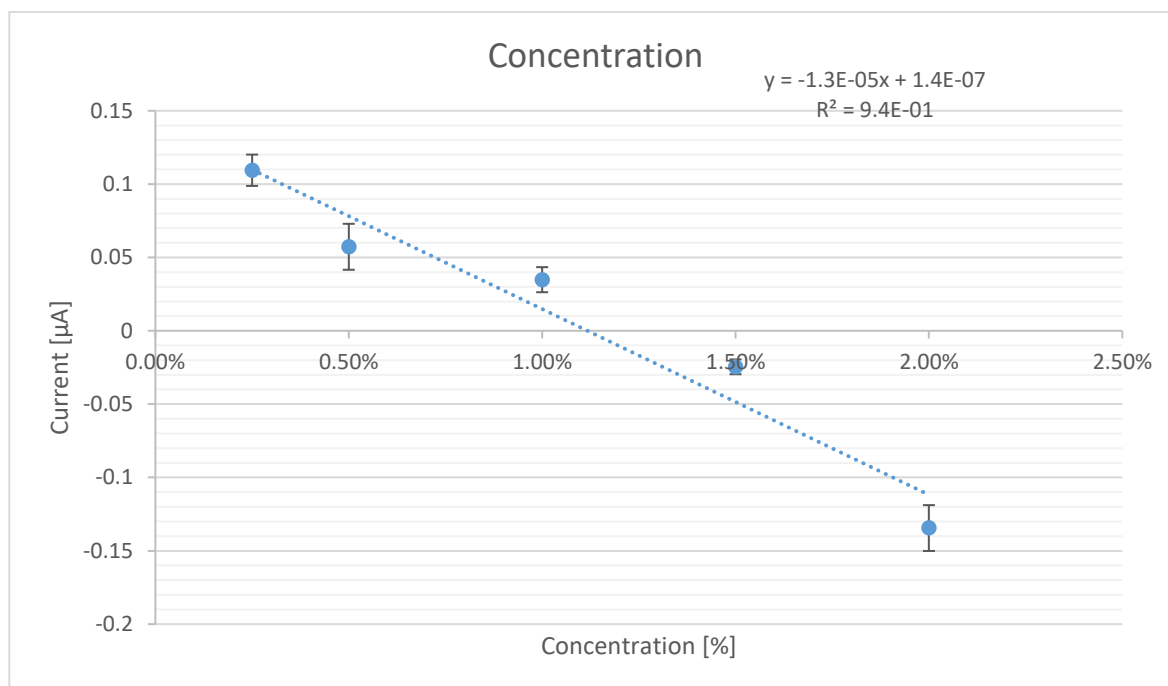


Figura 5.14.- Corrientes en función de la concentración en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naraa

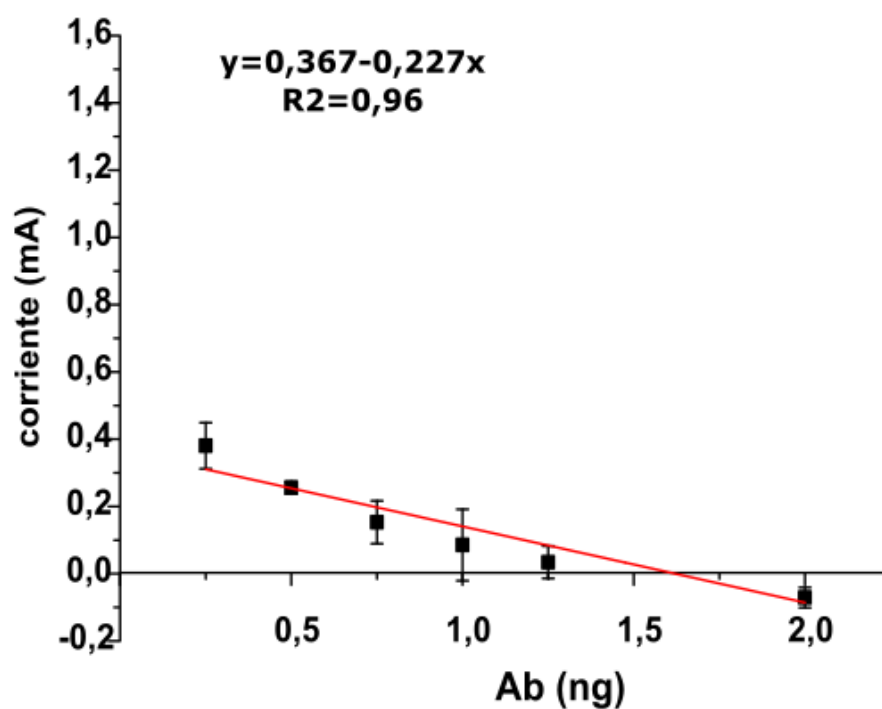


Figura 5.15.- Corrientes en función de la concentración en el primer pico de oxidación con los electrodos de Carbono Naraa (medida hecha previo a este proyecto)

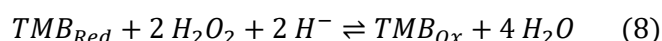
5.2. Peróxido de Hidrógeno

Debido al alto coste del TMB y puesto que el producto final será de tipo comercial, se intenta buscar el componente activo que reacciona con los anticuerpos y produce el inicio de la reacción redox del TMB y su concentración adecuada.

El objetivo de este segundo ensayo, es el de mantener la calidad o mejorar la resolución respecto al anterior sustrato y conseguir reducir los costes de fabricación del producto al mínimo posible. Con tal de conseguirlo, en el apartado 5.1.1, se detalla la hipótesis planteada.

5.2.1. Marco teórico

El TMB comercial usado está compuesto por TMB reducido diluido y en peróxido de hidrógeno. Este último reacciona con las enzimas anticuerpos de tipo peroxidasa de rábano también conocida como “*Horseradish peroxidase*” (HRP). Provocando la degradación del peróxido de hidrógeno en óxido de hidrógeno y el electrón que pierde este, a su vez reacciona con el TMB y le hace perder dos electrones, tal como se muestra en la siguiente ecuación:



Por tanto, para usos electroquímicos, se puede usar únicamente el peróxido de hidrógeno ya que no es necesario realizar un estudio colorimétrico del resultado. De tal forma que, durante el siguiente ensayo, se intentará demostrar que no es necesario usar TMB para el estudio electroquímico de anticuerpos del tipo HRP.

5.2.2. Requisitos previos

Una vez determinada la recta de calibración para el TMB y tal como se estipula en el punto 5.2, se pretende realizar un segundo cambio en el método de detección. Para ello, será necesario que los dos resultados anteriores sean compatibles entre sí, ya que se usa peróxido que es la molécula que reacciona con el HRP y el TMB. De acuerdo con lo anteriormente planteado en el (apartado número 5.1.4.c)), la situación expuesta, se cumple.

5.2.3. Proceso experimental

Con la finalidad de corroborar esta hipótesis, se procede al análisis electroquímico del peróxido a distintas concentraciones, para hallar una curva de calibrado del producto. Para ello, se hace una dilución en un medio conductor, en nuestro caso PBS al 0.2 μ M. Se ejecuta el siguiente procedimiento:

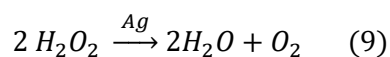
1. Mezcla del peróxido a concentraciones de 0.2 M hasta 0.02 μ M.

2. Análisis electroquímico de cada una de las diluciones mediante voltametrías cíclicas a distintas velocidades de barrido.
3. Poner en el electrodo una gota de 50 μl de las concentraciones.
4. Análisis de los puntos de oxidación y reducción del peróxido (tanto en tensión como en corriente).
5. Repetir los pasos 1 a 4 hasta completar todas las concentraciones.
6. Determinación del punto en el potencial más adecuado para realizar el análisis.
7. Poner en el electrodo una gota de 50 μl de las concentraciones.
8. Análisis amperométrico de cada una de las diluciones mediante un proceso de cronoamperometría con una duración de 1800 segundos.
9. Determinación del punto de equilibrio de la cronoamperometría.
10. Trazar la curva de calibración de la corriente en función de la concentración.

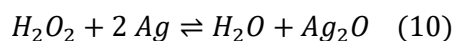
Cabe destacar que estos análisis se han realizado con cuatro tipos de electrodos distintos (todos ellos con una referencia de plata).

a) Problemática con la referencia de plata

Aunque en condiciones estándar la plata del electrodo de referencia no debería consumirse con el peróxido de hidrógeno, simplemente actuaría como catalizador tal como se muestra en la siguiente reacción:



Sin embargo, en presencia de un potencial eléctrico (provocados por el funcionamiento normal de un electrodo conectado a un potenciostato), esta fórmula resulta no ser exacta ya que la energía aportada por el electrodo en la reacción, da el siguiente resultado:



De la anterior ecuación, apreciamos que la plata cambia para crear óxido de plata (I) como se observa también en la Figura 5.16. Este cambio en el electrodo de referencia (marcado por un círculo rojo), producirá un cambio en el potencial de referencia. Por ello, especialmente cuando las concentraciones son altas (0.2 M - 10mM), se debe tener en cuenta este fenómeno, ya que después de 5 medidas, el electrodo de referencia se ha oxidado completamente, por ello, se deben sustituir los electrodos, regularmente para reducir los errores que produce este efecto.

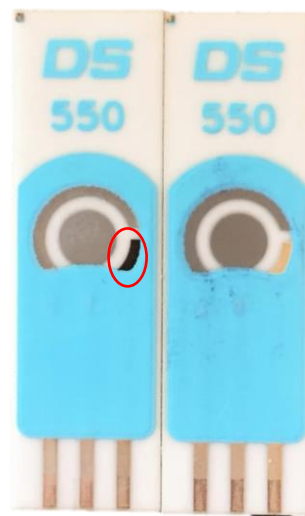


Figura 5.16.- Electrodo de referencia oxidado (izquierda) electrodo nuevo (derecha)

Ciertamente, se podría usar otro material para el electrodo de referencia, como podrían ser los electrodos de plata / cloruro de plata los cuales deberían ser más estables; Sin embargo, estos no se usan por motivos logísticos puesto que los plazos de entrega son muy altos, además del elevado coste de estos electrodos. Por otra parte, este electrodo de referencia, tampoco está probada con el TMB, de hecho, existen diversos ejemplos en la bibliografía [21] en los que se intenta usar este tipo de referencia sin obtener mejores resultados. Por lo anteriormente expuesto, su adquisición y posterior uso., no tiene por qué implicar unos mejores resultados.

Por ello, y porque dichas concentraciones no son objeto de estudio puesto que el TMB tiene una concentración de peróxido de hidrógeno mucho menor, se decide usar concentraciones de entre 0 y 110 μM . De esta forma, aseguramos que el electrodo de referencia no quede oxidado tan rápidamente por acción del peróxido de hidrógeno. En cambio, de esta forma, puede resistir hasta 50 medidas antes de empezar a apreciarse los cambios en la plata por acción del peróxido. De esta forma, los resultados serán válidos siempre y cuando se respeten las condiciones mencionadas en este párrafo, y se realice un cambio riguroso de los electrodos tras 50 medidas.

b) Electrodo

Igual que con la en el apartado 5.1.3.b) se realiza un análisis de distintos electrodos para determinar cuál de los materiales es el más óptimo para realizar las medidas electroquímicas. En este caso se usarán los electrodos comerciales de la marca Drop Sens 110, C223BT y 550 con electrodo de trabajo de carbono, oro y platino; todos ellos usan un electrodo de referencia de plata.

Los voltamogramas se muestran en la Figura 5.17, la Figura 5.18 y la Figura 5.19. en ellas se aprecia que el electrodo de carbono y de oro no muestran ningún tipo de información relevante en lo que concierne al análisis electroquímico del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, el análisis electroquímico realizado por el electrodo de platino si nos muestra la oxidación y reducción del peróxido de plata.

Cabe destacar que el pico que se encuentra entre 0.05 V y 0.1 V en todas las gráficas, por su forma, no se trata de un proceso difusivo (ya que tiene una pendiente muy alta) sino que se trata de un proceso superficial. Este proceso superficial corresponde a la oxidación del electrodo de referencia de plata tal como se describe en el apartado a) de la sección de Capítulo 5.1.3.

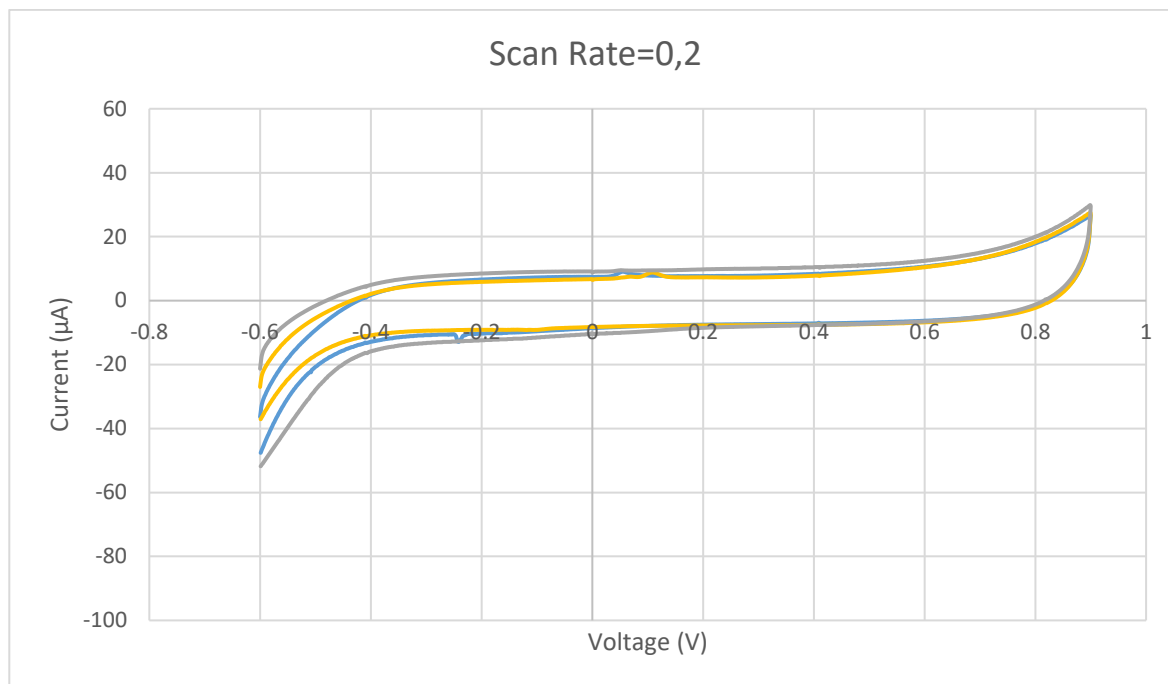


Figura 5.17.- Electrodes DS-110

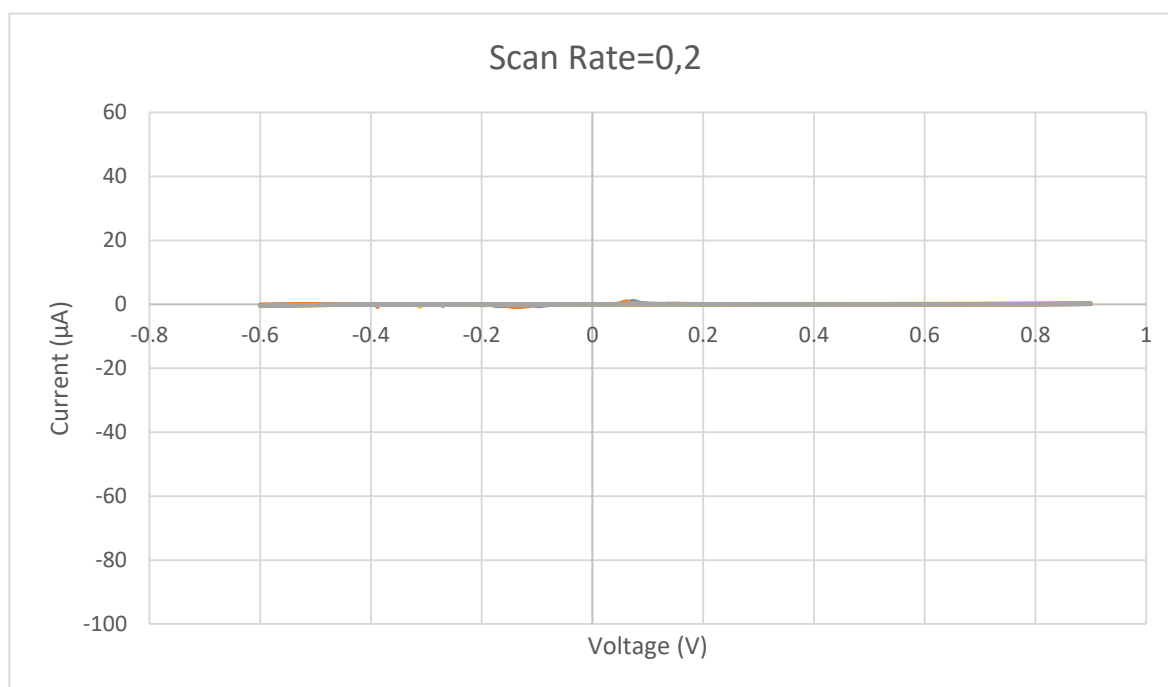


Figura 5.18.- Electrodes DS-C223BT

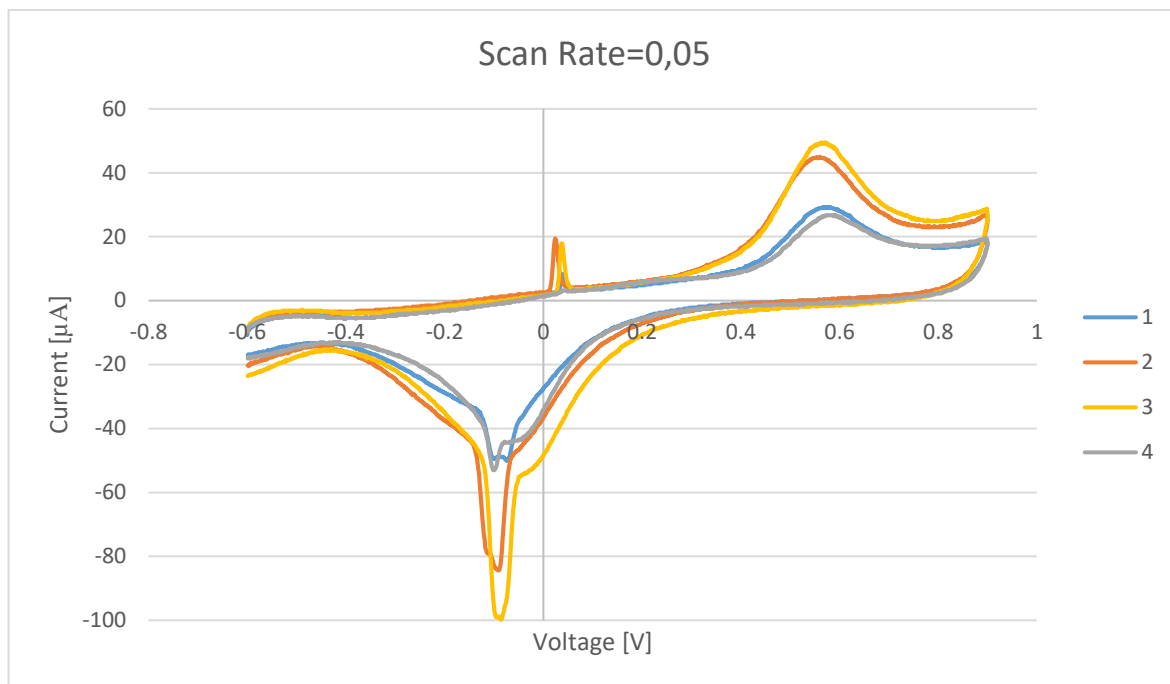


Figura 5.19.- Electrodos DS-550

c) Velocidad de barrido

De forma análoga al apartado 5.1.3.c), se estudia la velocidad de barrido más adecuada, por los motivos expuestos en el apartado anteriormente mencionado.

Una vez encontrado electrodo idóneo para este producto, es necesario analizar la velocidad de barrido que se debe usar para la detección del pico de oxidación y reducción correcto. En la Figura 5.20, se muestran las distintas velocidades de barrido usadas. Como se aprecia en dicha figura, el peróxido de hidrógeno requiere una velocidad de barrido baja, para la buena apreciación de los picos. En este caso, las velocidades de barrido óptimas serían las correspondientes a las de 0.02 ó 0.01.

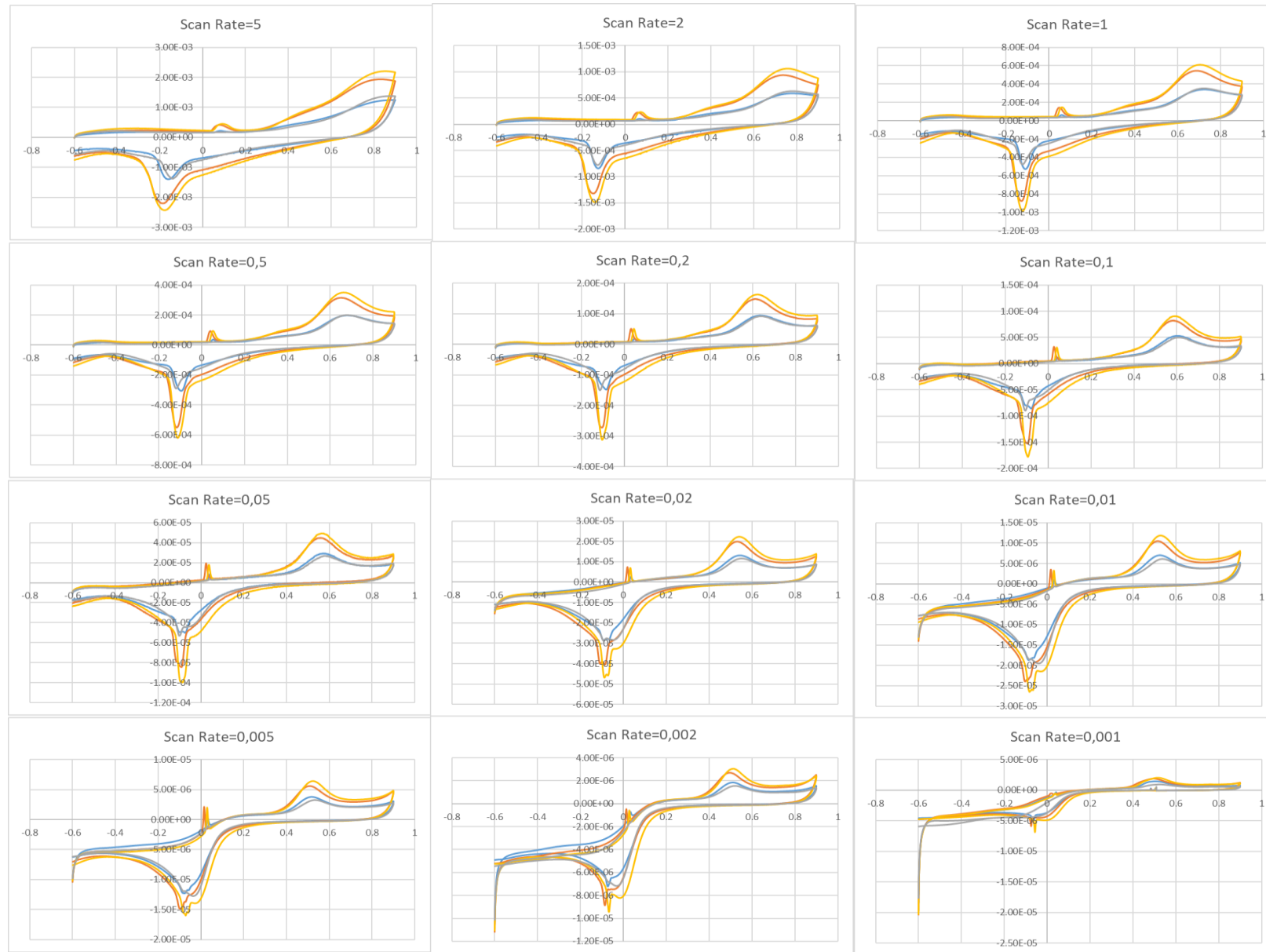


Figura 5.20.- Voltamogramas a distintas velocidades de barrido con los electrodos DS-550

5.2.4. Resultados

A diferencia de lo analizado en el proceso visto en el apartado 5.1, donde las pruebas previas recogidas en el anexo B, no se considera necesario hacer el análisis de picos.

a) Cronoamperometrías

Tal como se detalla en el apartado 5.1.4.c), en este caso se procede de forma análoga puesto que, aunque el compuesto no sea el mismo, el procedimiento experimental y el marco teórico entre ambos es el mismo.

En la Figura 5.21, se muestran las distintas Cronoamperometrías a un potencial de 0.6 V donde, en todos los casos queda reflejado en eje horizontal el tiempo en segundos y en el eje vertical queda reflejada la corriente en Amperios. Las medidas tomadas, se realizan con concentraciones desde 0 hasta 110 μM . La Figura 5.22 muestra un resumen más claro de los puntos de estabilización de estas Cronoamperometrías aquí mostradas. El momento temporal en el cual todas las gráficas se estabilizan, se establece en 350 segundos.

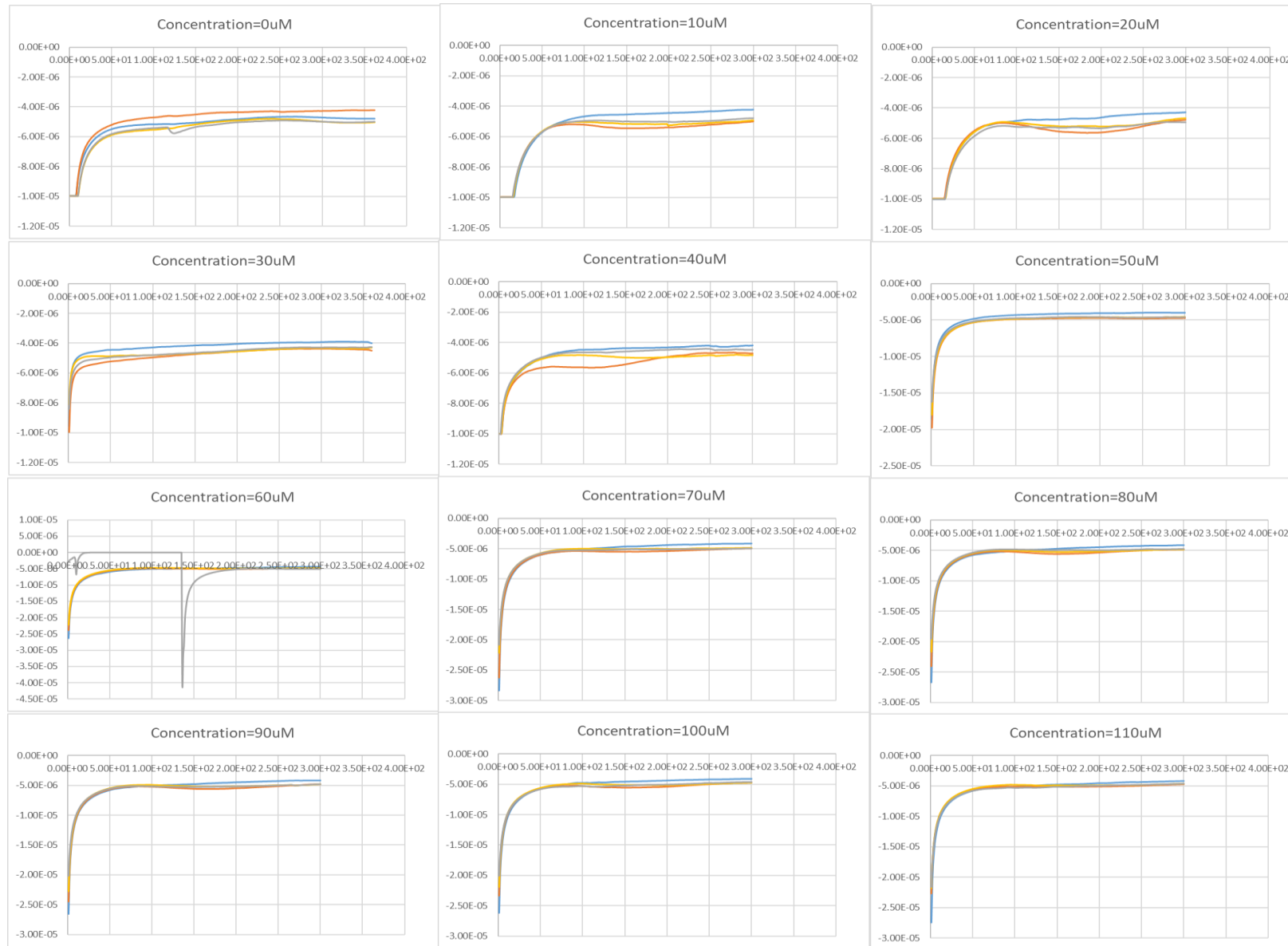


Figura 5.21.-Cronoamperometrias a distintas concentraciones con electrodo DS-550.

b) Análisis de concentraciones desde las cronoamperometrías

Con el objeto de realizar el análisis de las concentraciones de peróxido, se procede a trazar una curva para ajustarla a la recta de concentraciones del TMB. Posteriormente, se hará un análisis con anticuerpos y traslado de la curva de calibración del TMB a una nueva curva de calibración de peróxido.

Sin embargo, esta aproximación no es posible tal como se recoge en la Figura 5.22 donde se muestra la corriente en función de las concentraciones. Como se puede apreciar en dicha curva, no es posible trasladar estos resultados a la curva de TMB puesto que, las desviaciones estándar son demasiado grandes, de hecho, las desviaciones estándar se superponen entre ellas con hasta 8 otras medias. Adicionalmente, la pendiente obtenida es demasiado pobre para poder realizar medidas con seguridad. Finalmente, el valor del coeficiente de correlación no nos proporciona seguridad a la hora de trazar la recta.

Esto parece indicar que el producto comercial TMB además de la fórmula conocida e ilustrada por la Figura 5.1, contiene más elemento, no conocidos, y que permiten una mejor estabilización del sustrato que la establecida por la Figura 5.22.

En resumen, se descarta la posibilidad de hacer el cambio del TMB por el peróxido de hidrógeno en las condiciones que se ha hecho y se deja esta línea de investigación. Por tanto, se mantendrá el TMB como compuesto para le detección de los anticuerpos.

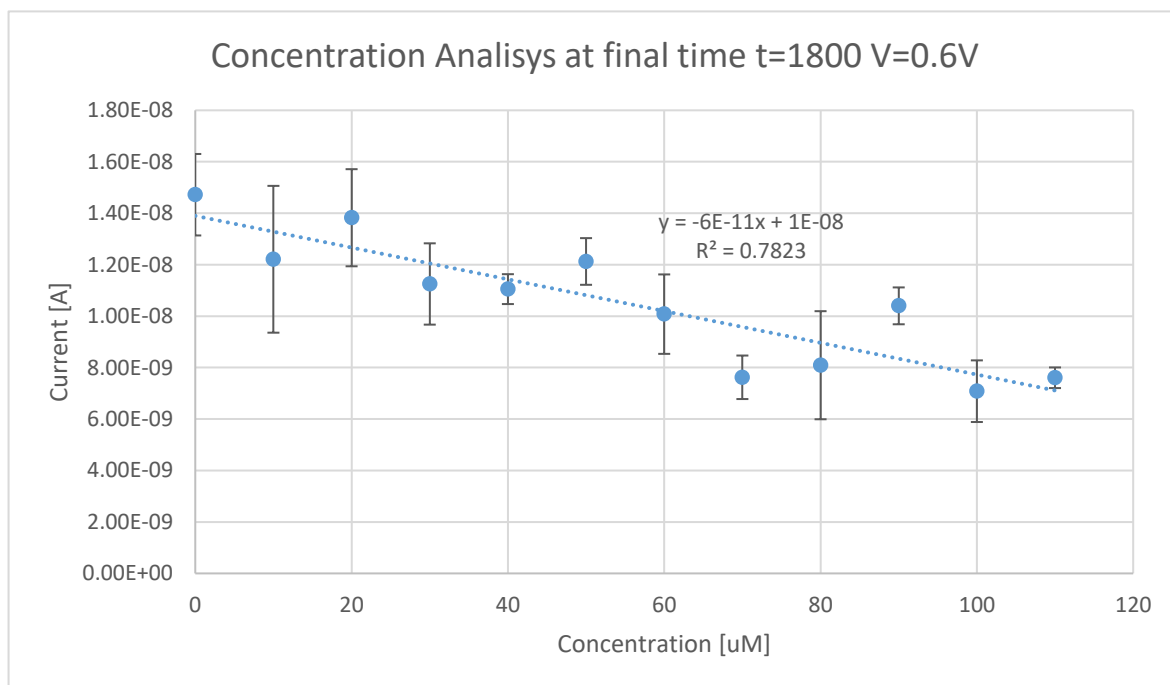


Figura 5.22.- Análisis de concentraciones del peróxido de hidrógeno

6. Estudio de los elementos para ser gobernados por el autómata

6.1. Potenciostato

Como se ha visto en el Capítulo 5, la aproximación que se usa para la detección de las bacterias es electroquímica. Esta disciplina de la química se estudia mediante un dispositivo llamado potenciostato.

Dependiendo de la detección que se desee hacer se podrá configurar el potenciostato de distintas formas. Los dos modos que se usan para este trabajo son: Voltametría Cíclica y Cronoamperometría.

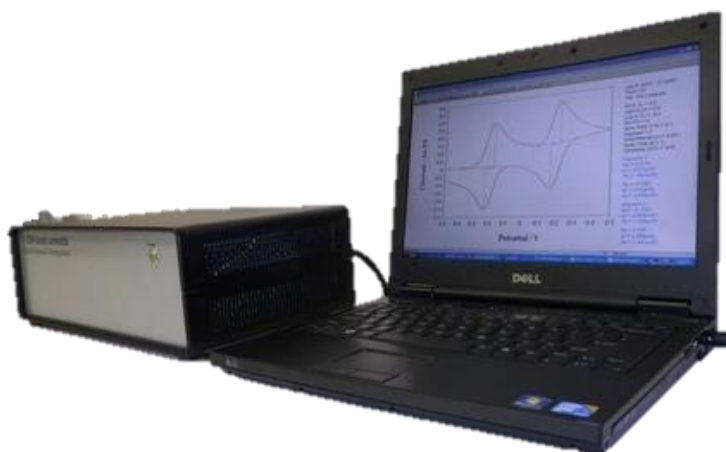


Figura 6.1.- Multipotenciostato CHI 1030B

El funcionamiento de este dispositivo es el siguiente: lee la corriente a un potencial dado. Esto permite la obtención de curvas I-V (voltametría cíclica) y I-t (cronoamperometría). La voltametría cíclica, se trata de un tipo de medida electroquímica en la que se realiza un barrido de un potencial a otro de forma cíclica, con ella, se pueden obtener el potencial en el cual la reacción redox desprende o absorbe un electrón. Por su lado, la cronoamperometría, pretende establecer el transporte de masa por difusión.

Los potenciostatos usados para la validación de las medidas son de tipo profesional, equipos muy complejos y precisos que pueden llegar a leer corrientes del orden del pico Ampere (Figura 6.1). Sin embargo, aunque para la validación del protocolo es necesario conocer con exactitud la medida realizada, no se considera



Figura 6.2.- Potenciostato USB usado

necesaria esa precisión para la detección de anticuerpos en el prototipo final ya que el TMB, como se ha visto anteriormente, tiene corriente del orden de las decenas, incluso centenas de micro Amperes. En el centro, existe un potenciostato creado por un trabajador del mismo, (a partir de ahora

denominado Potenciostato USB) que cumple con estas condiciones; Se plantea la posibilidad de usarlo para este tipo de medidas.

Dicho potenciostato, como se aprecia en la Figura 6.2, que se trata de un aparato de reducidas dimensiones en comparación con los potenciostatos usados en los ensayos de laboratorio como el mostrado en la Figura 6.1.

El potenciostato USB, se conecta al dispositivo (PC o la tableta) de medida a través de un puerto serie conectado al puerto USB del equipo. El programa ha de configurar el instrumento para realizar la medida deseada y recoger los datos, presentarlos en una gráfica y realizar un análisis básico de los datos obtenidos (detección de picos y valles, potenciales de oxidación y reducción).

6.1.1. Detección del problema

Dicho potenciostato, aunque ya creado y completamente en funcionamiento en su momento, presenta una serie de problemas en el momento de su puesta en funcionamiento.

Estos problemas no son causados por el hardware, sino que se trata de problemas de software, en concreto en problemas de compatibilidad de los drivers del dispositivo y la nueva versión del sistema operativo Windows 10 ya que este potenciostato fue diseñado para la adquisición de datos en Windows 7.

Además de los problemas hallados en la puesta en funcionamiento del potenciostato, también se encuentran limitaciones a nivel de hardware del potenciostato en lo que se refiere al suministro de corriente cuando el ensayo lo demanda, como es el caso del Capítulo 5.2 donde se probó el uso de este potenciostato de forma infructuosa puesto que este no era capaz de suministrar la corriente suficiente en el caso de las concentraciones más altas 0.2 M – 0.2 mM.

6.1.2. Solución adoptada

La solución que se adopta para solucionar el problema que se plantea, es la actualización del software VISA en el programa de LabView. Puesto que después de diversas pruebas con distintos ordenadores, se determina que uno de los problemas que imposibilitan la comunicación entre el dispositivo y el ordenador es este módulo de LabView. Adicionalmente, también se deberán instalar en el ordenador huésped, los drivers correspondientes a FTDI en su versión 2.8.2.0 o superior para la correcta comunicación con el PC.

Sin embargo, respecto al segundo problema planteado, no es posible hallar una solución sin que este pase por la modificación del hardware del equipo; Lo cual excede del ámbito de este proyecto. Por ello,

se decide trabajar con los potenciostatos comerciales que existen en el laboratorio de biosensores del centro.

6.1.3. Resultados

Una vez solucionada la problemática expuesta, y habiendo agregado las funcionalidades comentadas en el anterior apartado, se procede a la comprobación de su funcionamiento a través de voltametrías cíclicas medidas en distintos medios.

a) Comprobación con ferrocianuro y una voltametría cíclica

Para comprobar el correcto funcionamiento del potenciostato, se ha usado una solución de ferrocianuro al 0.5 Molar, ya que se trata de una reacción electroquímica muy estudiada de la que se conocen muy bien sus parámetros de reducción y oxidación. Además, tal como indica el artículo [25], es un tipo de compuesto muy usado precisamente para comprobar e incluso calibrar el buen funcionamiento de los potenciostatos.

Como podemos observar, en la comparativa de la Figura 6.3 y de la Figura 6.4. ligeras diferencias entre una y otra, ahora bien, ambas gráficas son muy semejantes a nivel cualitativo. Esto nos puede indicar que el sensor funciona correctamente.

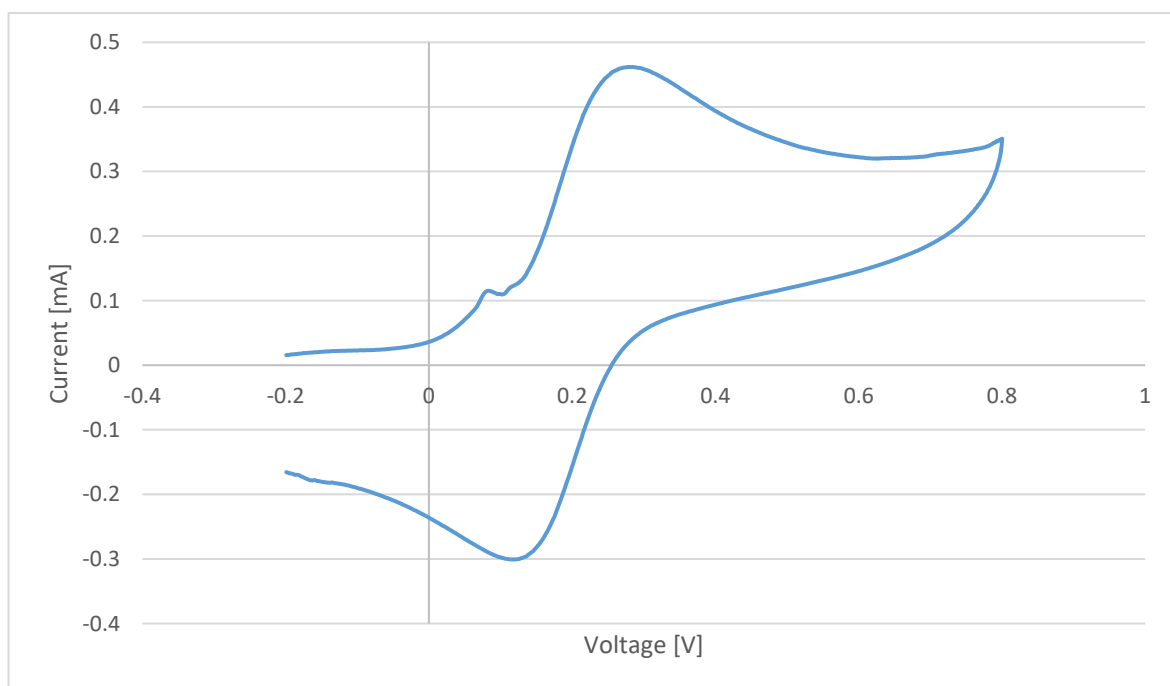


Figura 6.3.- Medida del ferrocianuro con el potenciostato USB

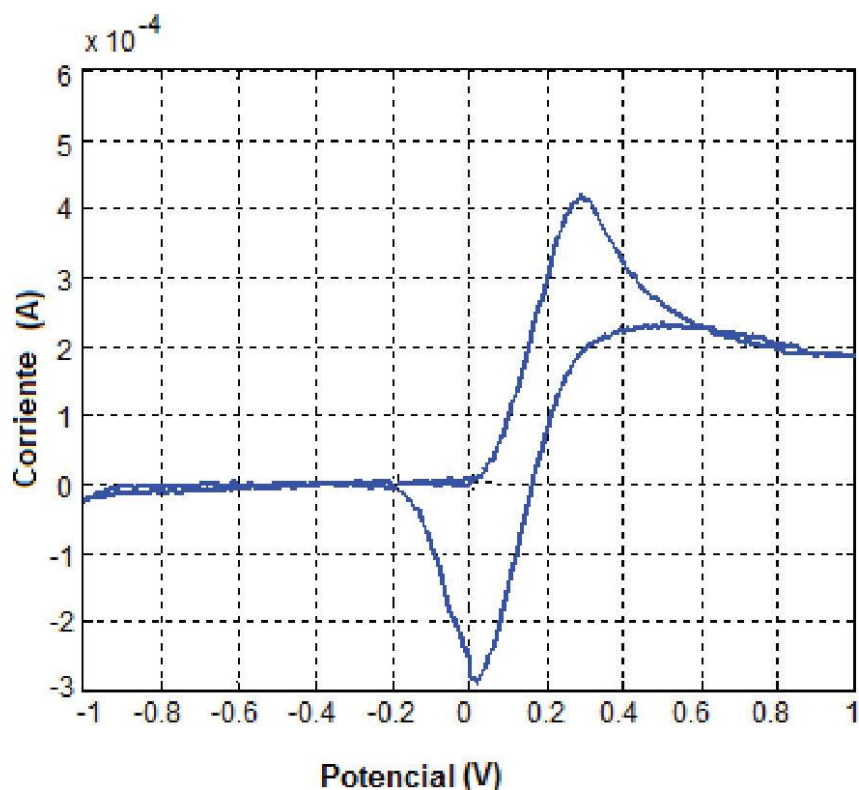


Figura 6.4.- Voltamograma del ferrocianuro con AutoLab

b) Voltametrías con peróxido

Con este ensayo se quiere comprobar, como se detalla en el apartado 6.1.1, el potenciostato no puede suministrar la corriente necesaria para mediciones en un medio con altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Para ello, se procede a la ya conocida voltametría cíclica donde se comprueba que los picos no quedan bien definidos y los valores hallados no son los obtenidos por el potenciostato comercial en la Figura 5.19, siendo ambas medidas tomadas con el mismo electrodo. Por ello, este potenciostato no es capaz de aguantar grandes corrientes. Lo analizado, no supone ser un problema ya, que finalmente se hace una aproximación a la medida mediante TMB, tal como se detalla en el Capítulo 5. El motivo por el cual esta limitación en corriente no representa un inconveniente con el TMB, suministro de corriente tan elevado como las necesarias para el peróxido de hidrógeno.

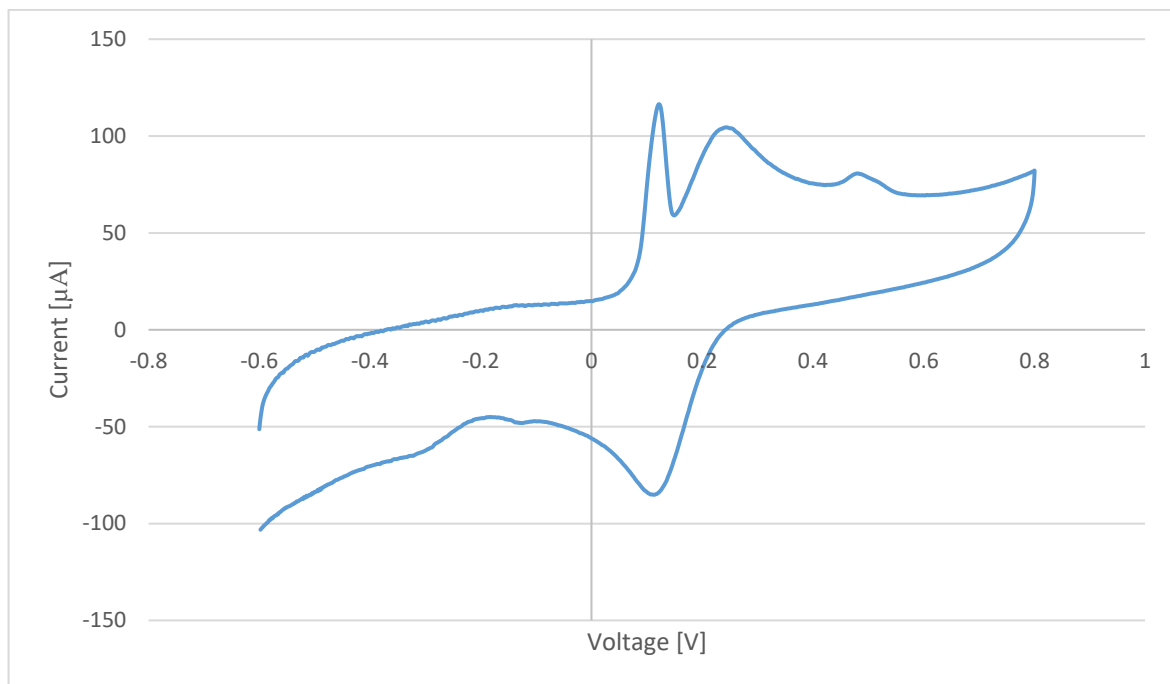


Figura 6.5.- Voltametría Cíclica hecha con el potenciostato USB y electrodo DS-550

6.2. Bomba

Esta bomba se compone de un “Motor Controller Unit” (MCU) de tipo “Pulse With Modulation” (PWM) a una tensión de pico de 12V y un motor de corriente continua que se alimenta también a 12V y 0.3A lo que supone una potencia de 36W. El ancho de pulso está ajustado mediante un doble potenciómetro lo que permite reducir el error. Este potenciómetro es de 11/12 vueltas. Y el diámetro interior de las tuberías en el interior de la bomba es de 2 mm.

6.2.1. Calibración de la bomba

La calibración de la bomba peristáltica usada en el autómata es determinante para conocer si todas las pruebas realizadas anteriormente a la llegada de esta nueva bomba pueden ser extrapolables. Y, en especial, si esta bomba permitirá poder mantener el bloqueo de la membrana. Para ello, se determinan los caudales en cada posición del potenciómetro como se detalla a continuación, en la Tabla 6.1, así como algunas gráficas relevantes, las Figura 6.6 y Figura 6.7:

Tabla 6.1.- Tabla de calibración de la bomba

| Posición | Tensión | Corriente | Tiempo | Caudal (ml/min) |
|----------|---------|-----------|---------|-----------------|
| 0/12 | 0.001 | 0 | ∞ | 0.00E+00 |
| 1/12 | 0.046 | 0.01 | ∞ | 0.00E+00 |
| 2/12 | 0.046 | 0.01 | ∞ | 0.00E+00 |
| 3/12 | 0.543 | 0.02 | ∞ | 0.00E+00 |
| 4/12 | 2.2 | 0.08 | ∞ | 0.00E+00 |
| 5/12 | 3.407 | 0.15 | ∞ | 0.00E+00 |
| 6/12 | 4.824 | 0.16 | 15:08.0 | 1.65E+01 |
| 7/12 | 6.895 | 0.16 | 09:01.6 | 2.77E+01 |
| 8/12 | 8.087 | 0.18 | 07:04.2 | 3.54E+01 |
| 9/12 | 10.119 | 0.21 | 05:13.0 | 4.79E+01 |
| 10/12 | 11.901 | 0.25 | 04:12.8 | 5.93E+01 |
| 11/12 | 11.943 | 0.28 | 04:10.8 | 5.98E+01 |

Las Figura 6.6 y Figura 6.7, muestran los parámetros de flujo de salida de la bomba usada. Como discretización de puntos, se ha tomado cada una de las divisiones marcadas en el potencióstato. En lo que concierne al flujo, se observa que la bomba tiene un umbral que, si no se cruza, no tiene movimiento. Dicho umbral es el correspondiente a la posición del potenciómetro 5/12, lo cual se debe tener en cuenta en el momento de la construcción del autómeta se debe tener en cuenta. Por otro lado, se observa que la tensión de la bomba aumenta de forma lineal, con lo que se podría establecer una relación entre la pendiente de la tensión y la pendiente correspondiente al flujo. Posteriormente se podría integrar en el autómeta. La pendiente que relaciona ambas variables es la siguiente ecuación (11):

$$\frac{F}{V} = \frac{m_F}{m_V} = \frac{128.4}{21.23} = 6.048 \quad (11)$$

Donde F es el flujo y V es la tensión suministrada a la bomba siendo m_F y m_V sus respectivas pendientes. Por lo tanto, obtenemos (12):

$$F = V \cdot 6.048 \quad (12)$$

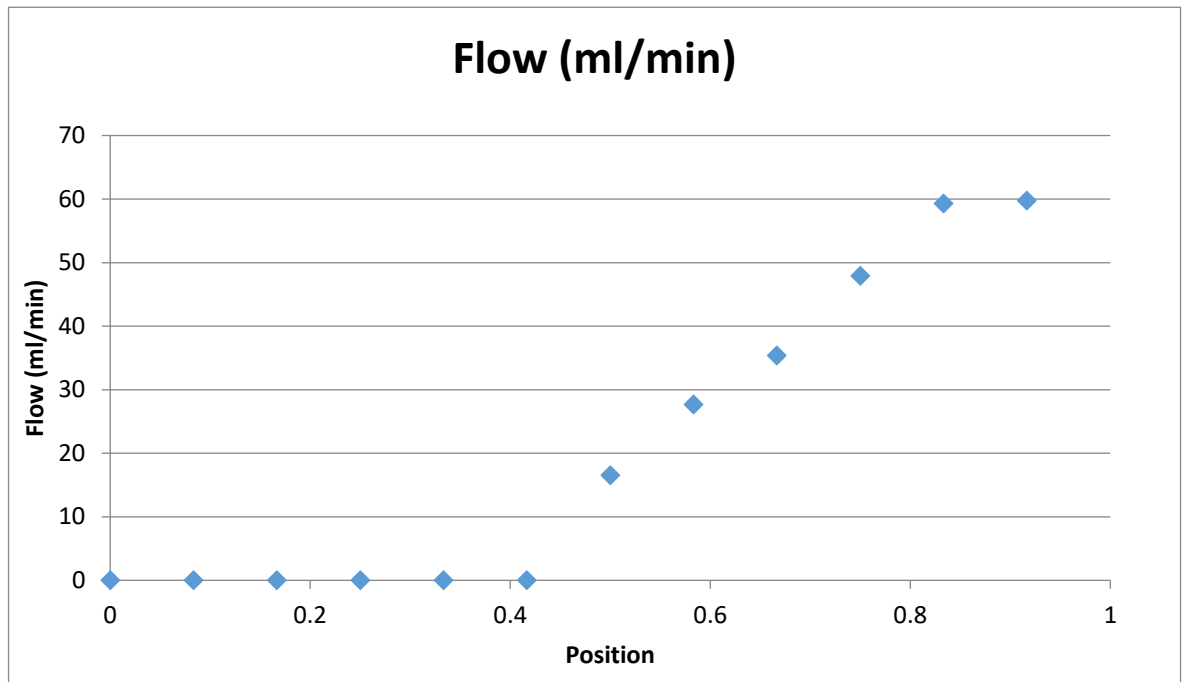


Figura 6.6.- Flujo de la bomba en función de la posición del potenciómetro

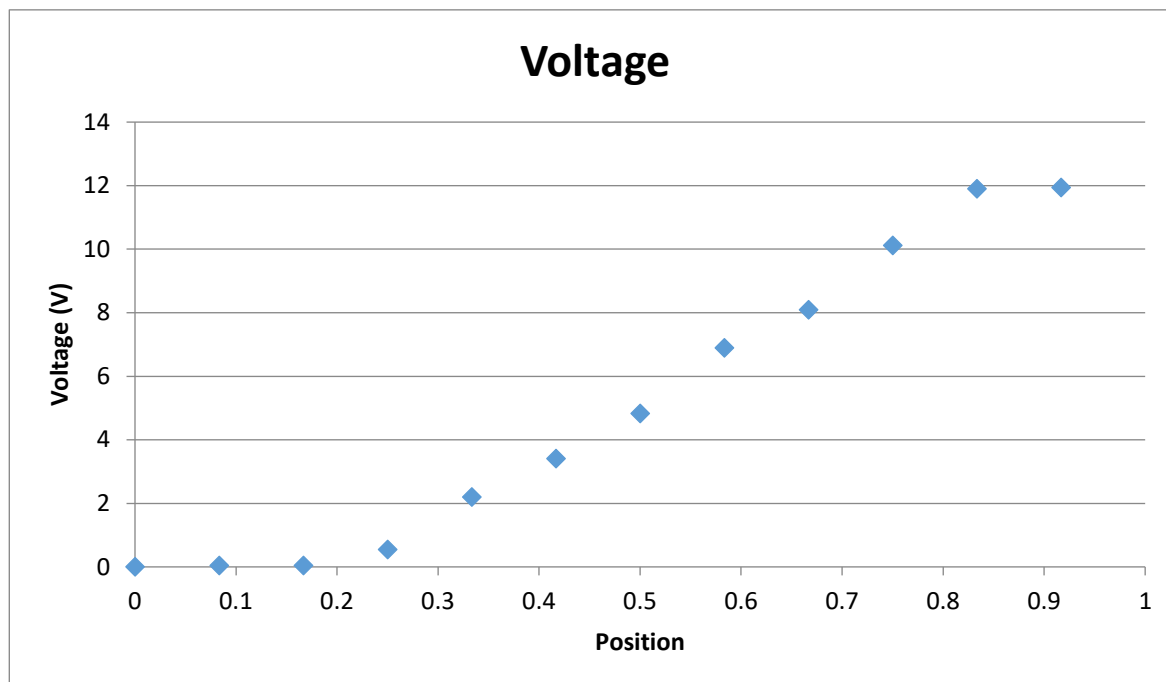


Figura 6.7.- Voltaje de salida del PWM en función de la posición del potenciómetro

6.2.2. Resultados

De estos resultados se extraen varias conclusiones: en primer lugar, la bomba anteriormente usada en el laboratorio (Capítulo 4), tiene una precisión mucho mayor a la bomba aquí usada. Esto comportará que el control que se realice de esta bomba tenga que ser muy preciso e incluso sería recomendable el uso de un lazo cerrado en el sistema.

Como ya se ha señalado anteriormente, uno de los objetivos del presente trabajo es poder reducir el coste al máximo. Por ello, aun sabiendo que la bomba usada para las pruebas de laboratorio es mejor a la bomba del autómatas, se considera que el hecho de integrar la bomba Gilson provocaría un incremento en el coste de la máquina demasiado elevada y entonces el producto dejaría de ser competitivo. Por ello, se debe adaptar esta segunda bomba para intentar que sea lo más semejante posible a la usada en las pruebas de laboratorio.

Si observamos la Figura 6.6, apreciamos que el primer punto discreto de flujo distinto de cero que obtenemos es de 16.5 ml/min. Puesto que al ser los caudales del Capítulo 4 mucho menores que el primer caudal, se debe idear un sistema que consiga alcanzarlos con la mayor precisión posible tal como representa en la Figura 6.8 a modo de recordatorio del Capítulo mencionado.

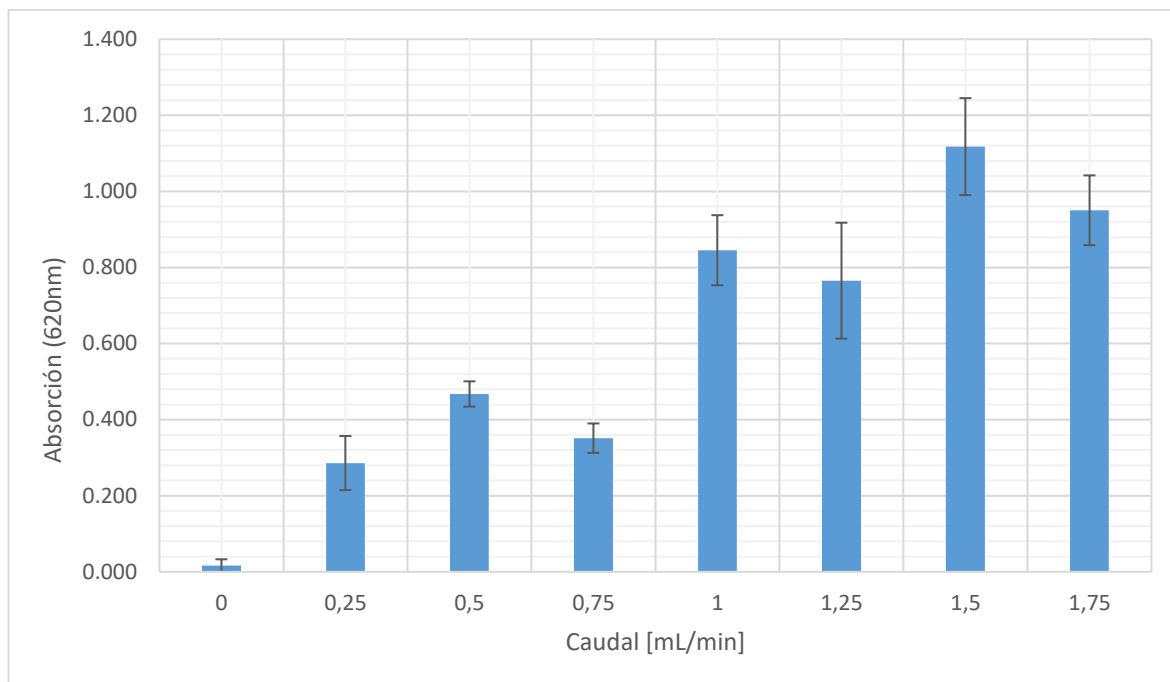


Figura 6.8.-Absorción medida respecto de la velocidad de flujo

El resultado analizado en el párrafo anterior, implica que se debe implementar un sistema que consiga la reducción de flujo en esta nueva bomba, ya sea mediante control electrónico o bien mediante un sistema mecánico de engranajes de tipo reductor. La implementación de cualquiera de estos sistemas o una combinación de ambos, conseguiría adaptar esta bomba a la usada en el laboratorio para todas las pruebas; Por ello, se podrían trasladar todas las pruebas realizadas con la anterior bomba a esta nueva propuesta.

Conclusiones

La envergadura del proyecto es muy grande, y esto, ha provocado que no se haya podido desarrollar algunos puntos en la profundidad deseada. Sin embargo, el trabajo realizado, después de 9 meses es más que satisfactorio.

Este proyecto me ha permitido adquirir conocimientos que hubiera sido impensable adquirir puesto que están lejos de mi ámbito de desarrollo académico. Gracias a ello, he podido conocer no sólo otra área de estudio a la mía sino que también me ha permitido conocer la forma de trabajo empleada en un centro de investigación de prestigio como es el Centro Nacional de Microelectrónica.

Limitaciones del trabajo

Uno de los objetivos del presente trabajo consiste en determinar las limitaciones del protocolo de laboratorio, para establecer los parámetros idóneos para el funcionamiento de un autómata.

En la realización del proyecto, han acaecido circunstancias externas que han imposibilitado profundizar, como hubiera sido deseable, en el análisis de todos los aspectos inicialmente planteados.

Trabajo futuro

Con tareas no resueltas en el presente trabajo y que se podrían realizar en un futuro, se señalan: acabar de implementar el autómata en el protocolo de laboratorio, aplicando los estudios y resultados contemplados en dicho trabajo.

Completar la implementación en el autómata de la bomba y la programación de la misma. Evitando que esta modifique el resultado final al cual se ha llegado en el desarrollo del anterior protocolo.

Análisis del impacto ambiental

Dado que se trata de un prototipo y que la mayoría de componentes del equipo han sido adquiridos a empresas externas que pueden no ser porque ser las proveedoras del producto final, el impacto ambiental de este, no tiene por qué coincidir con producto final. Aquí se detalla el impacto ambiental de la fase de desarrollo de este proyecto.

Fase de desarrollo

Puesto que los materiales usados suponen riesgos bajos para el medio ambiente si se tratan adecuadamente, no suponen ningún tipo de riesgo para la seguridad ambiental. Sin embargo, en el CNM, tienen aprobado un protocolo que clasifica los residuos para ser tratados adecuadamente por una empresa especializada en la gestión de residuos, estos se clasifican de la siguiente forma:

- Basura general.
- Líquidos alcalinos.
- Líquidos ácidos.
- Líquidos básicos.
- Cristales rotos.
- Disolventes orgánicos no halogenados.
- Disolventes orgánicos halogenados.
- Compuestos mercuriados.
- Sales y soluciones en cromo.
- Envases de plástico vidrio y metal.
- Residuos biosanitarios.
- Materiales contaminados con productos químicos.

Durante la concepción de este trabajo de investigación, se han usado recursos susceptibles de afectar al medio ambiente. Los elementos usados durante la realización del proyecto tanto su funcionamiento normal o por su deposición afecten al medio ambiente, son las que se detallan en la Tabla 0.1.

Tabla 0.1.- Tabla resumen de los residuos creados por la realización del proyecto

| Material | Tipo de residuo | Tratamiento |
|--|-----------------|--|
| Filtro de policarbonato sin bacterias | Sólido | Basura general |
| Filtro de policarbonato con bacterias | Sólido | Residuos biosanitarios |
| TMB | Líquido | Líquidos ácidos |
| Peróxido de hidrógeno | Líquido | Líquidos ácidos |
| PBS | Líquido | Sin tratamiento |
| Tween-20 | Líquido | Sin tratamiento |
| Ab | Sólido | Residuos biosanitarios |
| Electrodos | Líquido | Materiales contaminados con productos químicos |
| Puntas de pipetas usadas | Sólido | Materiales contaminados con productos químicos |
| Mezcla final compuesta por TMB, PBS, Tween-20 y Ab | Líquido | Líquidos ácidos |

Como se puede comprobar en la Tabla 0.2, donde se detalla de forma resumida y visual el impacto medioambiental que tiene el producto durante su proceso de concepción:

Tabla 0.2.-Análisis los factores ambientales

| Factores Ambientales | Impactos (Fase de Explotación) | Funcionamiento de la instalación | Vertidos accidentales |
|------------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------|
| Clima | Alteración del clima | | |
| Geomorfología | Inestabilidad del terreno / alteración de las formas del terreno | | |
| Geología | Alteración de rasgos geológicos de interés | | |
| Hidrología Superficial | Disminución de la calidad de las aguas | | |
| Hidrología Subterránea | Disminución de la calidad de las aguas | | |
| Edafología (suelo) | Ocupación y pérdida irreversible de suelo | | |
| | Contaminación / pérdida de capacidad productiva | | |
| Vegetación | Pérdida / afectación a la cubierta vegetal | | |
| Fauna | Destrucción directa de la fauna | | |
| | Destrucción y pérdida de calidad de hábitats para la fauna. | | |
| Paisaje | Alteración de la calidad paisajística. | | |
| Ruido | Incremento de los niveles sonoros. | | |
| | | | |
| Calidad del Aire | Aumento de niveles de inmisión de partículas (polvo) | | |
| | Aumento de niveles de inmisión de gases | | |
| Elementos del patrimonio | Afectación a elementos del patrimonio cultural | | |
| Espacios de interés natural | Afectación a elementos del interés natural | | |
| Planeamiento Urbanístico | Afección a las normas de planeamiento urbanístico | | |
| Sistema demográfico | Número de población activa ocupada | | |

Legenda: Verde: Afecta positivamente; Sin color: No influye; Afecta negativamente: Rojo

Bibliografía

1. AGUSTIN SUAREZ, J. and VEZA, Jose M. Dead-end microfiltration as advanced treatment for wastewater. *Desalination*. 2000. Vol. 127, no. 1, p. 47–58. DOI 10.1016/S0011-9164(99)00191-5. [Consultado el: 9/2016]
2. LEE, JiYoung and DEININGER, Rolf A. Detection of E. coli in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. *Luminescence*. 2004. Vol. 19, no. 1, p. 31–36. DOI 10.1002/bio.753. [Consultado el: 9/2016]
3. BIRD, Christopher R., GEARING, Andrew J H and THORPE, Robin. The use of Tween 20 alone as a blocking agent for immunoblotting can cause artefactual results. *Journal of Immunological Methods*. 1988. Vol. 106, no. 2, p. 175–179. DOI 10.1016/0022-1759(88)90194-9. [Consultado el: 9/2016]
4. VELUSAMY, Vijayalakshmi, ARSHAK, Khalil, KOROSTYNSKA, Olga, OLIWA, Kamila and ADLEY, Catherine. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. 2010. ISBN 0734-9750. [Consultado el: 9/2016]
5. WEST, Supersignal. *Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide*. Pierce [online]. 2004. P. 1–52. DOI 10.1016/j.ymeth.2005.11.007. Available from: http://www.socochim.ch/Catalogs/Compl_PIERCE/WB1600990.pdf#search='western+blotting+handbook+and+troubleshooting+guide'%5Cnwww.piercenet.com . [Consultado el: 9/2016]
6. GIBBS, Judy. Effective Blocking Procedures. *ELISA Technical Bulletin* Corning Incorporated Life Sciences Kennebunk, ME [online]. 2001. No. 3, p. 1–6. Available from: http://virtual.ces.edu.co/pluginfile.php/106763/mod_resource/content/1/elisa3.pdf [Consultado el: 9/2016]
7. BUTLER, John E. Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays. *Methods* [online]. 2000. Vol. 22, no. 1, p. 4–23. DOI 10.1006/meth.2000.1031. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020313%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202300910314> [Consultado el: 10/2016]
8. LEONARD, Paul, HEARTY, Stephen, BRENNAN, Joanne, DUNNE, Lynsey, QUINN, John, CHAKRABORTY, Trinad and O'KENNEDY, Richard. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. 2003. ISBN 0141-0229. [Consultado el: 10/2016]
9. DARWISH, Ibrahim A. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis : Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science* [online]. 2006. Vol. 2, no. 2, p. 217–235. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3614608&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Consultado el: 10/2016]
10. ABDEL-HAMID, Ihab, IVNITSKI, Dmitri, ATANASOV, Plamen and WILKINS, Ebtisam. Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of E. coli O157:H7. *Biosensors*

- and Bioelectronics. 1999. Vol. 14, no. 3, p. 309–316. DOI 10.1016/S0956-5663(99)00004-4. [Consultado el: 10/2016]
11. SHAH, Jasmin, CHEMBURU, Sireesha, WILKINS, Ebtisam and ABDEL-HAMID, Ihab. Rapid Amperometric Immunoassay for *Escherichia coli* Based on Graphite Coated Nylon Membranes. *Electroanalysis* [online]. 2003. Vol. 15, no. 2324, p. 1809–1814. DOI 10.1002/elan.200302791. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.200302791> [Consultado el: 10/2016]
 12. LI, Xuan, XIMENES, Eduardo, AMALARADJOU, Mary Anne Roshni, VIBBERT, Hunter B., FOSTER, Kirk, JONES, Jim, LIU, Xingya, BHUNIA, Arun K. and LADISCH, Michael R. Rapid sample processing for detection of food-borne pathogens via cross-flow microfiltration. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013. Vol. 79, no. 22, p. 7048–7054. DOI 10.1128/AEM.02587-13. [Consultado el: 10/2016]
 13. LAZCKA, Olivier, CAMPO, F. Javier Del and MUÑOZ, F. Xavier. *Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors*. 2007. ISBN 0956-5663 (Print)r0956-5663 (Linking). [Consultado el: 10/2016]
 14. NOBLE, Rachel T. and WEISBERG, Stephen B. *A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters*. 2005. ISBN 1477-8920 (Print). [Consultado el: 10/2016]
 15. KATSOUNAROS, Ioannis, SCHNEIDER, Wolfgang B., MEIER, Josef C., BENEDIKT, Udo, BIEDERMANN, P. Ulrich, AUER, Alexander a. and MAYRHOFER, Karl J. J. Hydrogen peroxide electrochemistry on platinum: towards understanding the oxygen reduction reaction mechanism. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012. Vol. 14, no. 20, p. 7384. DOI 10.1039/c2cp40616k. [Consultado el: 10/2016]
 16. DHARMASIRI, Udara, WITEK, Małgorzata A, ADAMS, Andre A and SOPER, Steven A. *Microsystems for the capture of low-abundance cells*. *Annual review of analytical chemistry* [online]. 2010. Vol. 3, p. 409–31. DOI 10.1146/annurev.anchem.111808.073610. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20636049> [Consultado el: 10/2016]
 17. THOMPSON, Michael., BRUCE LENNOX, R and MCLELLAND, R A. Structure and electrochemical properties of microfiltration filter-lipid membrane systems. *Anal. Chem.* [online]. 1982. Vol. 54, no. Ref #2407 of 2800 in sirius july 20 2007.ref, p. 76–81. DOI 10.1021/ac00238a024. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00238a024> [Consultado el: 10/2016]
 18. TIAN, Feng, LYU, Jing, SHI, Jingyu, TAN, Fei and YANG, Mo. A polymeric microfluidic device integrated with nanoporous alumina membranes for simultaneous detection of multiple foodborne pathogens. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2016. Vol. 225, p. 312–318. DOI 10.1016/j.snb.2015.11.059. [Consultado el: 10/2016]
 19. GERLACHE, Marc, SENTURK, Zühre, QUARIN, Guy and KAUFFMANN, Jean-Michel. Electrochemical behavior of H₂O₂ on gold. *Electroanalysis* [online]. 1997. Vol. 9, no. 14, p. 1088–1092. DOI 10.1007/s10295-011-0986-8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.1140091411> [Consultado el: 10/2016]

20. KUO, Jong Tar, CHENG, Chiu Yu, HUANG, Hsiao Han, TSAO, Chia Fen and CHUNG, Ying Chien. A rapid method for the detection of representative coliforms in water samples: Polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010. Vol. 37, no. 3, p. 237–244. DOI 10.1007/s10295-009-0666-0. [Consultado el: 10/2016]
21. HALL, Simon B., KHUDAISH, Emad A. and HART, Alan L. Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part III: Effect of temperature. *Electrochimica Acta* [online]. 1999. Vol. 44, no. 14, p. 2455–2462. DOI 10.1016/S0013-4686(98)00369-7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468698003697> [Consultado el: 10/2016]
22. GOLBERG, Alexander, LINSHIZ, Gregory, KRAVETS, Ilia, STAWSKI, Nina, HILLSON, Nathan J, YARMUSH, Martin L, MARKS, Robert S and KONRY, Tania. Cloud-Enabled Microscopy and Droplet Microfluidic Platform for Specific Detection of *Escherichia coli* in Water. *PLoS ONE* [online]. 2014. Vol. 9, no. 1, p. e86341. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086341> [Consultado el: 10/2016]
23. WEISS, Alan J. Overview of membranes and membrane plates used in research and diagnostic ELISPOT assays. *Methods in Molecular Biology*. 2012. Vol. 792, p. 243–256. DOI 10.1007/978-1-61779-325-7_19. [Consultado el: 10/2016]
24. IVANDINI, Tribidasari A., SATO, Rika, MAKIDE, Yoshihiro, FUJISHIMA, Akira and EINAGA, Yasuaki. Pt-implanted boron-doped diamond electrodes and the application for electrochemical detection of hydrogen peroxide. In : *Diamond and Related Materials*. 2005. p. 2133–2138. [Consultado el: 10/2016]
25. WANG, Joseph and WANG, J. Joseph Wang. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* [online]. 2014. P. 2–3. DOI 10.1002/anie.201400645. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616000> [Consultado el: 10/2016]
26. HALL, S B, KHUDAISH, E A and HART, A L. Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part IV: phosphate buffer dependence. *Electrochimica Acta*. 1999. Vol. 44, no. 25, p. 4573–4582. [Consultado el: 10/2016]
27. HALL, S, KHUDAISH, E and HART, a. Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part II: effect of potential. *Electrochimica Acta* [online]. 1998. Vol. 43, no. 14–15, p. 2015–2024. DOI 10.1016/S0013-4686(97)10116-5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468697101165> [Consultado el: 10/2016]
28. DE BLAS, Angel L. and CHERWINSKI, Holly M. Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry*. 1983. Vol. 133, no. 1, p. 214–219. DOI 10.1016/0003-2697(83)90245-2. [Consultado el: 10/2016]
29. HOFFMAN, Wayne L. and JUMP, Adrien A. Tween 20 removes antibodies and other proteins from nitrocellulose. *Journal of Immunological Methods*. 1986. Vol. 94, no. 1–2, p. 191–196. DOI 10.1016/0022-1759(86)90232-2. [Consultado el: 10/2016]
30. IJSSELMUIDEN, O. E., HERBRINK, P., MEDDENS, M. J M, TANK, B., STOLZ, E. and VAN EIJK, R. V W. Optimizing the solid-phase immunofiltration assay. A rapid alternative to

- immunoassays. *Journal of Immunological Methods*. 1989. Vol. 119, no. 1, p. 35–43. DOI 10.1016/0022-1759(89)90378-5. [Consultado el: 10/2016]
31. CHEN, Wan Tzu, HENDRICKSON, Richard L., HUANG, Chia Ping, SHERMAN, Deb, GENG, Tao, BHUNIA, Arun K. and LADISCH, Michael R. Mechanistic study of membrane concentration and recovery of *Listeria monocytogenes*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005. Vol. 89, no. 3, p. 263–273. DOI 10.1002/bit.20256. [Consultado el: 10/2016]
32. WU, Min, STOCKLEY, Peter G. and MARTIN, William J. An improved western blotting technique effectively reduces background. *Electrophoresis*. 2002. Vol. 23, no. 15, p. 2373–2376. DOI 10.1002/1522-2683(200208)23:15<2373::AID-ELPS2373>3.0.CO;2-W. [Consultado el: 10/2016]
33. WANG, X, ZHANG, L, AN, Q and CHEN, H. Morphology and formation mechanism of poly(vinylidene fluoride) membranes prepared with immerse precipitation: Effect of dissolving temperature. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics* [online]. 2009. Vol. 48, no. 4, p. 696–709. DOI 10.1080/00222340902958950. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70449578821&partnerID=40&md5=824c09bd5472ebd2fda7037ebbe21ca7> [Consultado el: 11/2016]
34. HAMBLETT, Kevin J, SENTER, Peter D, CHACE, Dana F, SUN, Michael M C, LENOX, Joel, CERVENY, Charles G, KISSLER, Kim M, BERNHARDT, Starr X, KOPCHA, Anastasia K, ZABINSKI, Roger F, MEYER, Damon L and FRANCISCO, Joseph A. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [online]. 2004. Vol. 10, no. 20, p. 7063–70. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-04-0789. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501986> [Consultado el: 11/2016]
35. CLARK, M F, ADAMS, A N, MALLING, East, CLARK, M F, ADAMS, A N and MALLING, East. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* [online]. 1977. Vol. 34, p. 475–483. DOI 10.1099/0022-1317-34-3-475. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/323416> [Consultado el: 11/2016]
36. SAXENA, Arunima, TRIPATHI, Bijay P., KUMAR, Mahendra and SHAHI, Vinod K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. 2009. ISBN 1873-3727 (Electronic). [Consultado el: 11/2016]
37. J.EZENARRO, Josune, URIA, Naroa, CASTILLO, Oscar, PÁRRAGA, Noemí, SABRIÁ, Miquel and MUÑOZ, Francesc Xavier. Development of a microfiltration membrane treatment protocol for the integration of concentration and immunodetection of bacteria. . 2016. P. 45. [Consultado el: 12/2016]
38. DELAEDT, Yasmine, DANEELS, Arne, DECLERCK, Priscilla, BEHETS, Jonas, RYCKEBOER, Jaak, PETERS, Elmar and OLLEVIER, Frans. The impact of electrochemical disinfection on *Escherichia coli* and *Legionella pneumophila* in tap water. *Microbiological Research*. 2008. Vol. 163, no. 2, p. 192–199. DOI 10.1016/j.micres.2006.05.002. [Consultado el: 12/2016]



