



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Físico Matemáticas

Simulación y optimización de la reacción en cadena de la polimerasa
en un sistema microfluídico de convección natural

Tesis presentada al

Colegio de Física

Requisito para la obtención del grado de

Licenciado en Física Aplicada

Por

Luis Carlos Olivares Rueda

Directores de tesis

Dr. Víctor Manuel Altuzar Aguilar

Dr. Aldo Yair Tenorio Barajas

Marzo 2023

Puebla, Pue, México

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por la formación brindada.

Al Dr. Víctor Manuel Altuzar Aguilar y al Dr. Aldo Yair Tenorio Barajas de la FCFM-BUAP por su respaldo y asesoría en la realización de esta tesis.

Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS), por los recursos computacionales, el apoyo y la asistencia técnica brindados, a través del proyecto 202101045C. A los proyectos VIEP 2022 (ID 00261) y Ciencia Básica 2016 (CONACyT No. de proyectos 286652 y 286647).

A los profesores revisores de esta tesis.

Dedicatorias

A mis padres por su confianza y apoyo incondicional.

A mis amigos por hacer de este viaje más divertido.

A mis asesores, por toda la paciencia y apoyo brindado.

Resumen

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que somete una mezcla de ADN y enzimas a ciclos térmicos para copiar fragmentos específicos de ADN. Es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para el diagnóstico molecular de enfermedades debido a su alta sensibilidad y especificidad. Una de sus principales limitaciones es el tiempo de desarrollo de nuevos y mejores dispositivos lo cual puede resultar costoso. Además, estos están diseñados para su uso en laboratorios, por lo que carecen de portabilidad, esto imposibilita su uso en lugares de difícil acceso. La simulación por computadora se vuelve necesaria como una forma más rápida y económica de diseñar, probar y optimizar nuevos dispositivos PCR.

En este trabajo realizamos un análisis numérico de un dispositivo microfluídico PCR en el que se generan flujos de convección natural debido a gradientes de temperatura constantes en tres diferentes zonas de dicho dispositivo formado por un tubo capilar en circuito cerrado triangular. El modelo de la cinética de reacciones PCR empleado es de cinco etapas (desnaturalización, renaturalización, alineación, alineación reversa y extensión) y los coeficientes de reacción utilizados son dependientes de la temperatura. La implementación numérica por elemento finito de la metodología se realizó en COMSOL Multiphysics, permitiendo predecir el campo de temperatura y velocidad que se forma debido a los gradientes de temperatura, la concentración y reacciones de diferentes especies químicas involucradas en el dispositivo PCR a través del tiempo. Los parámetros experimentales de operación del dispositivo fueron: el diámetro interno del capilar (632.4, 690.8 y 797.5 μm) y las temperaturas de desnaturalización (92, 95 y 98 $^{\circ}\text{C}$), alineación (55, 60 y 65 $^{\circ}\text{C}$) y extensión (70, 72 y 74 $^{\circ}\text{C}$). Se realizaron 81 simulaciones resultado de un análisis factorial completo, combinando los distintos parámetros de operación. Todas las simulaciones presentaron un flujo en una dirección no ideal debido a que las diferentes especies químicas viajan por las distintas zonas de temperatura en el siguiente orden: 1) desnaturalización, 2) extensión y 3) alineación. Mediante análisis gráfico y de regresión lineal se determinó el impacto de los distintos parámetros de operación en la eficiencia de las reacciones PCR. En el primer análisis de regresión se encontró que el factor con mayor importancia es la temperatura de alineación, aproximadamente 3.6 veces más importante que la temperatura de extensión y 5.7 veces más importante que la temperatura de desnaturalización. En el segundo análisis de regresión se encontró que el factor con mayor importancia es la diferencia de temperaturas de extensión y alineación, aproximadamente 2.4 veces más importante que la diferencia de temperaturas de desnaturalización y alineación. En ambos análisis de regresión se encontró que el segundo factor con mayor importancia de los parámetros de operación es el diámetro interno de los capilares debido a su estrecha relación con la velocidad del fluido

presentado una correlación positiva. A través del análisis gráfico se encontró que la diferencia de temperaturas de desnaturalización y extensión no tiene correlación alguna con la eficiencia del sistema. Las diferencias de temperatura y diámetro interno del capilar deben incrementarse para incrementar la eficiencia de las reacciones, debido a la dirección no ideal del flujo, mientras mayor es la velocidad del fluido, menor tiempo tienen para completarse los procesos de renaturalización y alineación reversa, estos dos procesos afectan negativamente la eficiencia del sistema. Los mejores tiempos de reacción encontrados fueron de entre 18 a 22 minutos, siendo el capilar con mayor diámetro interno el que mejores resultados presenta.

Palabras clave: PCR, Simulación, Convección Natural, COMSOL

Objetivos

Objetivo General

Simular y optimizar la cinética de reacciones PCR por convección natural en un sistema capilar microfluídico.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar e implementar un modelo de simulación en COMSOL Multiphysics para sistemas microfluídicos de convección natural empleando análisis por elementos finitos.
2. Estudiar y modelar la relación que hay entre distintos parámetros de operación (temperatura aplicada y radio interno de los canales) y la eficiencia de la cinética de reacciones PCR empleando el método de análisis de regresión lineal.
3. Estudiar la relación que hay entre distintos parámetros de operación y la velocidad promedio del fluido mediante análisis gráfico.
4. Estudiar y modelar la relación que hay entre la velocidad del fluido y la eficiencia de la cinética de reacciones PCR empleando el método de análisis de regresión lineal.
5. Usar los resultados generados de los objetivos 2 y 4 para optimizar la eficiencia del sistema PCR.

Introducción

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue inventada por Kary Mullis a mediados de la década de 1980 [1]. Ha tenido un gran impacto en diversas áreas, especialmente la médica y la biológica, entre sus aplicaciones se encuentran la clonación, detección de mutaciones, mutagénesis dirigida, genética de poblaciones, detección de enfermedades genéticas, entre otras. De entre las aplicaciones de la PCR una de las más importantes es la detección de enfermedades virales como la infección de COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2 [2], donde fue de vital importancia la detección temprana de infectados por este virus para controlar la propagación de este mismo. La PCR debido a su alta sensibilidad puede ser utilizada para la detección temprana de distintos tipos de cáncer [3] ya que varios de los métodos tradicionales requieren de grandes volúmenes de células cancerígenas. La PCR también permite detectar enfermedades de origen bacteriano tales como las causadas por la *Escherichia coli* [4] o la *Mycobacterium tuberculosis* [5], la primera tiene diversas variantes que provocan enfermedades como diarrea, enfermedades urinarias y respiratorias, la segunda provoca la enfermedad de la tuberculosis.

La reacción PCR genera copias (amplificaciones o amplicones) de secuencias específicas de la región blanco (target) de cadenas de ADN, sometiendo a diferentes ciclos térmicos las soluciones que contiene muestras de ADN, enzimas y ácidos nucleicos. Durante el proceso de la PCR cada cadena de ADN presente durante la reacción se duplica, lo que significa que la acumulación de amplicones es de forma exponencial 2^n , suponiendo que es un caso ideal.

Por su parte, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) es una variante de la PCR que permite medir los resultados de la reacción PCR en tiempo real mediante el uso de fluoróforos [6], [7]. Durante la reacción del qPCR el incremento de la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de acumulación del producto (amplicones) durante cada ciclo y presenta una gran ventaja contra la técnica original y es que no requiere de postprocesamiento de las muestras y eso a su vez evita posibles medios de contaminación.

El método de elementos finitos (FEM) es un método numérico usado ampliamente para la aproximación de soluciones de ecuaciones diferenciales que describen sistemas físicos que pueden o no involucrar fenómenos de distintos tipos. Con el FEM dado un dominio, este se subdivide en varios subdominios (elementos finitos), estos subdominios se conectan en puntos nodales (nodos) localizados en las esquinas y a lo largo de los lados y las caras de los distintos elementos. Las ecuaciones diferenciales son discretizadas y transformadas en sistemas de ecuaciones algebraicas, estos sistemas algebraicos se solucionan en cada uno de los puntos nodales y mediante métodos de

interpolación se aproxima el comportamiento del sistema alrededor de los nodos usando polinomios de cierto orden especificado. Los polinomios resultantes de la interpolación deben ser continuos en los puntos adyacentes con otros subdominios o nodos al igual que sus derivadas [8], [9].

En la presente tesis, se realizó un análisis numérico en COMSOL Multiphysics mediante FEM de las reacciones en un dispositivo PCR formado por un tubo capilar de borosilicato en forma de un circuito cerrado triangular en el que se generan flujos de convección natural a través de gradientes de temperatura constantes. Este análisis numérico permite predecir el campo de velocidad y temperatura en el dispositivo, así como la concentración de las diferentes especies químicas involucradas a lo largo del tiempo. Esto nos permitió estudiar y modelar la relación que hay entre distintos parámetros de operación (temperatura aplicada y radio interno de los canales) y la eficiencia de la cinética de reacciones PCR empleando análisis gráfico y el método de análisis de regresión lineal. El análisis de regresión lineal fue realizado con el lenguaje de programación Python, además los modelos generados permiten optimizar el sistema.

En el capítulo 1 se presenta las diferentes etapas de la reacción en cada polimerasa y los reactivos usados para generar copias específicas de cadenas de ADN. Se describe una revisión de aplicaciones tecnológicas de la PCR en el área de la microfluídica. Por último, se presenta los tipos de termociclado conductivo o convectivo que de manera general se usa en dispositivos microfluídicos PCR.

En el capítulo 2 se presenta la deducción de la ecuación de continuidad o de conservación de una cantidad escalar y a partir de esta ecuación se derivan las ecuaciones de continuidad para mecánica de fluidos (conservación de la masa), ecuación de transporte de calor (conservación de la energía térmica) y la de transporte de especies químicas (conservación de la masa). Además, se derivan las ecuaciones de Navier-Stokes (conservación del momento) las cuales son las ecuaciones gobernantes de la mecánica de fluidos junto con la ecuación de continuidad. Finalmente, se describe el modelo de la cinética de reacciones PCR utilizada en este trabajo.

En el capítulo 3 se describe la metodología aplicada en la realización del presente trabajo de tesis, se describen las suposiciones utilizadas en las ecuaciones del modelo matemático deducidas en el capítulo 2 y las ecuaciones resultantes de estas suposiciones, se mencionan las condiciones iniciales y de frontera utilizadas, así como la derivación de la forma débil y discretización de las ecuaciones que utiliza COMSOL para la realización de las simulaciones FEM. Se describe brevemente los módulos utilizados para las simulaciones y como estas se llevaron a cabo, como se realizó el procesamiento y análisis de los resultados de las simulaciones a través de análisis gráfico y de regresión lineal.

En el capítulo 4 se presenta el análisis y discusión de los resultados de las simulaciones y del análisis gráfico y de regresión lineal entre distintos parámetros de operación (diámetro interno del capilar y temperaturas de desnaturalización, alineación y extensión, así como combinaciones de estos parámetros) en la eficiencia de las reacciones de un sistema PCR.

Nomenclatura y abreviaturas

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés).
FEM	Análisis de elementos finitos (FEM por sus siglas en inglés).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
bp	Pares de bases (bp por sus siglas en inglés).
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato.
S_1S_2	Cadenas bicatenarias de ADN.
P_1	Primer complementario a S_2 .
P_2	Primer complementario a S_1 .
S_1	Cadena monocatenaria de ADN desprendida de la desnaturalización de S_1S_2 y complementaria a S_2 .
S_2	Cadena monocatenaria de ADN desprendida de la desnaturalización de S_1S_2 y complementaria a S_1 .
S_1P_2	Primer P_2 hibridado con la cadena monocatenaria S_1 .
S_2P_1	Primer P_1 hibridado con la cadena monocatenaria S_2 .
Desnaturalización	Proceso en el cual las cadenas bicatenarias de ADN se separan en dos cadenas monocatenarias de ADN complementarias debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno.
Renaturalización	Proceso en el cual cadenas monocatenarias de ADN complementarias se unen debido a la creación de puentes de hidrógeno.
Alineación	Proceso en el cual los primers complementarios a sus respectivas cadenas monocatenarias de ADN se hibridan.
Alineación reversa	Proceso en el cual los primers se deshibridan de las cadenas monocatenarias de ADN.
Extensión	Proceso en el cual se crea una cadena complementaria de ADN sobre el primer hibridado a la cadena monocatenaria.

Índice General

Agradecimientos	I
Dedicatorias	II
Resumen	III
Objetivos	V
Introducción.....	VI
Nomenclatura y abreviaturas	IX
Capítulo 1.....	1
1.1 PCR	1
1.2 Tecnología PCR	5
Capítulo 2.....	11
2.1 Ecuación de continuidad.....	11
2.2 Ecuación de calor	12
2.3 Ecuación de transporte de especies.....	13
2.4 Ecuación de continuidad (mecánica de fluidos).....	14
2.5 Ecuaciones de Navier Stokes	14
2.6 Modelo de la cinética de reacciones PCR	18
Capítulo 3.....	24
3.1 Parámetros de Operación.....	24
3.2 Geometría del Sistema PCR.....	25
3.3 Software FEM utilizado y Mallado.....	26
3.4 Modelos utilizados en la simulación.....	27
3.5 Modelo de Transporte de Especies Diluidas	33
3.6 Análisis de Elementos Finitos (Simulación)	35
3.7 Procesamiento de los Resultados de las Simulaciones.....	37
3.8 Selección de la Variable de Respuesta	38
3.9 Análisis Exploratorio de Datos (AED)	39
3.10 Teoría de Análisis de Regresión Lineal	39
Capítulo 4.....	41
4.1 Simulación	41
4.2 Selección de Respuesta del Sistema	49

4.3 Análisis Exploratorio de Datos (AED)	51
4.4 Análisis de Regresión del sistema PCR	58
4.5 Optimización	65
Conclusiones	67
Trabajo Futuro	68
Productos.....	69
Bibliografía	70
Apéndices	i
Apéndice 1	i
Apéndice 2.....	ii
2.1 Construcción detallada de la simulación en COMSOL Multiphysics.....	ii
Apéndice 3.....	xiii
Apéndice 4.....	xiv
Apéndice 5.....	xvi
Apéndice 6.....	xviii
Apéndice 7.....	xix
Apéndice 8.....	xxi

Índice de Figuras

Figura 1.1: ADN bicatenario y su composición. Imagen tomada de [13].	2
Figura 1.2: Esquema simplificado de algunos reactivos y del ADN bicatenario y su composición. Imagen adaptada de [14].	3
Figura 1.3: Esquema simplificado de los primers alineados (P1 y P2) con sus respectivas cadenas monocatenarias complementarias (S1 y S2). Imagen adaptada de [14].	3
Figura 1.4: Reacciones de la PCR. Imagen adaptada de [14].	4
Figura 1.5: Fases de la qPCR. Imagen adaptada de [14].	5
Figura 1.6: Dispositivo PCR: a) Fotografía de un dispositivo portátil PCR en una carcasa de aluminio y b) fotografía del dispositivo que muestra las placas de circuitos con una pantalla táctil, el sistema de detección de fluorescencia se encuentra debajo del chip. Dispositivo PCR desarrollado por Pavel et al. [19].	7
Figura 1.7: Dispositivo PCR: a) diagrama del dispositivo PCR y sus partes, b) fotografía del dispositivo, c) calentadores rotados -90° , el calentador a 95°C se encuentra sobre el chip, d) calentadores rotados -0° , ningún calentador se encuentra sobre el chip para que este se enfríe, e) calentadores rotados 90° , el calentador a 60°C se encuentra sobre el chip. El dispositivo fue desarrollado por Limin et al. [20].	8
Figura 1.8: Diagramas y gráficas de a) visualización del flujo y temperatura de un circuito triangular, b) visualización del flujo en una variación del circuito triangular y c) la visualización del flujo en un circuito rectangular. Imagen tomada del trabajo de Madhavi et al. [18].	9
Figura 1.9: Dispositivo PCR: a) diagrama del diseño del chip, b) fotografía del chip y c) componentes del dispositivo PCR con sistema óptico, fuente de poder y bomba de infusión. Dispositivo elaborado por Leticia et al. [22].	10
Figura 2.1: Región en el espacio Ω en la que circula un campo vectorial \mathbf{J} . Esquema libre de fuentes o sumideros.	11
Figura 2.2: a) Fuerza causada por un estrés actuando sobre una superficie unitaria. b) Volumen diferencial en el que se definen las componentes del tensor de estrés viscoso. c) Cubo diferencial en el que se muestra las componentes de la presión y de los efectos de compresibilidad actuando perpendicularmente en la superficie del cubo. ...	16
Figura 2.3: Estrés causado sobre en la dirección x .	17
Figura 2.4: Tasa de reacción del proceso de extensión.	20
Figura 2.5: Tasas de reacción de los procesos de: a) desnaturalización, b) renaturalización, c) alineación y d) alineación reversa.	21
Figura 3.1: a) Fronteras de temperatura isotermas: zona de desnaturalización TD, zona de alineación TA y zona de extensión TE. b) Dominios del sistema PCR: fluido y frontera.	25
Figura 3.2: Mallado más fino del sistema capilar microfluídico PCR usando COMSOL Multiphysics.	26

Figura 4.1: Ejemplo del calculo del perfil de velocidades en una geometría cuadrada (8 mm de largo y ancho e ID=100 μm), se registró una velocidad máxima de 0.15 mm/s en el centro del tubo capilar.	41
Figura 4.2: Perfil de velocidad de la simulacion del sistema (SIM78) con parámetros ID del capilar de 797.5 μm , TD=98°C, TA=65°C y TE=72°C.	44
Figura 4.3: Perfil de temperatura de la simulacion del sistema (SIM78) con parámetros ID del capilar de 797.5 μm , TD=98°C, TA=65°C y TE=72°C.....	44
Figura 4.4: Cinética de las reacciones PCR de las especies químicas de las simulaciones: a) SIM3 con parámetros ID = 797.5 μm , TD = 92°C, TA = 55°C y TE = 70°C y b) SIM78 con parámetros ID = 797.5 μm , TD = 98°C, TA = 65°C y TE = 72°C. .	45
Figura 4.5: Cinética de reacción normalizada de las reacciones PCR de las especies químicas de las simulaciones: a) SIM3 y b) SIM78	46
Figura 4.6: Cinética de reacciones de las concentraciones de los amplicones S1S2 vs tiempo de las mejores cinco simulaciones (SIM 30, SIM 45, SIM 60, SIM 63 y SIM 72), todas corresponden a un valor ID = 797.5 μm del capilar.	46
Figura 4.7: Cinética de a) concentración S1S2 y b) logaritmo de la concentración normalizada de S1S2 en función del tiempo para un ID = 632.4 μm del capilar. Encerrado en cuadro rojo se muestra la recta donde se calcula la pendiente Slope-Log-dsDNA.....	47
Figura 4.8: Cinética de a) concentración S1S2 y b) logaritmo de la concentración normalizada de S1S2 en función del tiempo para un ID = 690.8 μm del capilar. Encerrado en cuadro rojo se muestra la recta donde se calcula la pendiente Slope-Log-dsDNA.....	48
Figura 4.9: Cinética de a) concentración S1S2 y b) logaritmo de la concentración normalizada de S1S2 en función del tiempo para un ID = 797.5 μm del capilar. Encerrado en cuadro rojo se muestra la recta donde se calcula la pendiente Slope-Log-dsDNA.....	48
Figura 4.10: Correlación entre variables de respuesta: a) EXPTIME vs Slope-Log-dsDNA y b) EXPTIME vs RTIME del sistema PCR.....	49
Figura 4.11: Distribución de la frecuencia de las variables de interés a) Slope-Log-dsDNA, b) EXPTIME y c) RTIME del sistema PCR.	50
Figura 4.12: Gráfica de los valores de la concentración de las cadenas monocatenarias (S ₁ y S ₂) a los 30 min vs Slope-Log-dsDNA.....	51
Figura 4.13: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: a) VPROM vs TD, b) VPROM vs TA, c) VPROM vs TE y d) VPROM vs ID.	52
Figura 4.14: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: a) VPROM vs (TD-TA), b) VPROM vs (TE-TA) y c) (VPROM vs TD-TE).....	53
Figura 4.15: Correlación entre distintas variables de las simulaciones PCR: a) VPROM vs (TD-TA)/(TE-TA) y b) VPROM vs TPROM.	54
Figura 4.16: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: a) EXPTIME vs TD, b) EXPTIME vs TA, c) EXPTIME vs TE y d) EXPTIME vs ID.....	55
Figura 4.17: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: a) EXPTIME vs (TD-TA), b) EXPTIME vs (TE-TA) y c) EXPTIME vs (TD-TE).	56

Figura 4.18: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: EXPTIME vs $(TD-TA)/(TE-TA)$	57
Figura 4.19: Corelación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: a) EXPTIME vs VPROP y b) EXPTIME vs TPROM.	58
Figura 4.20: Superficie de respuesta: EXPTIME vs TA e ID estandarizadas, manteniendo $TD=98^{\circ}C$ y $TE=74^{\circ}C$	60
Figura 4.21: Distribución de los residuos de la regresión lineal 1 (EXPTIME vs TD, TA, TE e ID): a) histograma de la frecuencia de los residuos, b) gráfica de probabilidad normal de los residuos y c) residuos de la regresión.	61
Figura 4.22: Superficie de respuesta: EXPTIME vs $(TE-TA)$ e ID estandarizadas, haciendo $(TD-TA)=43^{\circ}C$	62
Figura 4.23: Distribución de los residuos de la regresión 2 (EXPTIME vs TD-TA, TE-TA e ID): a) histograma de la frecuencia de los residuos, b) gráfica de probabilidad normal de los residuos y c) residuos de la regresión.	63
Figura 4.24: Línea de tendencia entre: EXPTIME vs VPROP estandarizada.	64
Figura 4.25: Distribución de los residuos de la regresión 3 (EXPTIME vs VPROP): a) histograma de la frecuencia de los residuos, b) gráfica de probabilidad normal de los residuos y c) residuos de la regresión.	65
Figura A2.1: Captura 1 de pantalla del proceso de la implementación en COMSOL 13. Geometría generada para el ejemplo de este apéndice.	ii
Figura A2.2: Captura 2 de pantalla del proceso de la implementación en COMSOL.	iii

Índice de Tablas

Tabla 3.1: Parámetros de operación. Temperaturas TD, TA y TE fueron basadas en [10], [11]. Diámetros internos ID fueron tomados de [30].	24
Tabla 3.2: Marcas, masa, medidas, precio, costo y tiempo aproximado para llevar a cabo la síntesis de amplicones de la PCR de algunos dispositivos [31].	26
Tabla 3.3: Propiedades del mallado más fino de los distintos capilares correspondientes a diámetros internos diferentes.	26
Tabla 3.4: Protocolo común de la disolución usada en las reacciones PCR. Tomada de [32].	28
Tabla 3.5: Parámetros de las especies químicas (S1S2, S1 y S2, P1 y P2, y S1P2 y S2P1) y sus coeficientes de difusividad tomados de la referencia [23].	33
Tabla 3.6: Número de grados de libertad resueltos para cada uno de los capilares de diámetro interno ID distinto.	36
Tabla 4.1: Parametros TD, TA, TE e ID y resultados VPROM, TPROM, SLOPE, EXPTIME, RTIME y concentración de las cadenas monocatenarias S1 y S2 (CS1 y CS2) de las simulaciones del sistema PCR que convergieron.	42
Tabla 4.2: Promedios de distintas variables: VPROM, SLOPE EXPTIME, RTIME y concentración de las cadenas monocatenarias (CS1 y CS2) de la Tabla 4.1 .	43
Tabla 4.3: Sesgo y curtosis de las variables de interés del sistema PCR.	50
Tabla A2.1: Tabla de variables insertados en COMSOL junto con su definición.	vii
Tabla A2.2: Tabla de parámetros insertados en COMSOL junto con su definición.	vii
Tabla A6.1: Simulaciones PCR que no convergieron.	xviii

Capítulo 1

Antecedentes

En este capítulo se presenta las diferentes etapas de la reacción en cada polimerasa y los reactivos usados para generar copias específicas de cadenas de ADN. Se describe una revisión de aplicaciones tecnológicas de la PCR en el área de la microfluídica. Por último, se presenta los tipos de termociclados conductivo o convectivo que de manera general se usa en dispositivos microfluídicos PCR.

1.1 PCR

La PCR es una técnica que somete a una mezcla de ADN y enzimas a ciclos térmicos para generar copias de cadenas de ADN, la reacción necesita de los siguientes “reactivos”:

- Muestra de ADN bicatenario (S_1S_2) que contiene la región blanco (o target) de interés. Esta región target es una secuencia específica de nucleótidos característica de la especie de algún virus o bacteria, además es la región que nos interesa amplificar (copiar) para poder detectarla.
- Iones de magnesio: Cofactores esenciales necesarios para la actividad de la mayoría de las polimerasas comerciales [10], [11], siendo comúnmente usados el cloruro de magnesio ($MgCl_2$) o sulfato de magnesio ($MgSO_4$).
- ADN polimerasas: Enzimas que catalizan la creación de una hebra monocatenaria de ADN complementario, siendo comúnmente utilizada por su termo-estabilidad la Taq polimerasa, catalogada como una extremo-enzima (enzimas capaces de catalizar reacciones químicas en ambientes extremos).
- Primers (cebadores o iniciadores) (P_1 y P_2). Cadenas monocatenarias de ADN de aproximadamente 20 bp de longitud, complementarios a las secuencias de ADN, delimitando la región target [12]. Los primers son reconocidos por la polimerasa Taq como “señales” para el inicio y finalización de la amplificación de la región target.
- dNTPs: monómeros constituyentes del ADN usados para la formación de nuevas cadenas.
- Solución buffer: garantiza un medio óptimo para la reacción.

1.1.1 Cadenas bicatenarias de ADN

Las cadenas bicatenarias de ADN (**Figura 1.1**) consisten en dos hebras de ADN monocatenario (S_1 y S_2) y la estructura de soporte de estas, se encuentra formada por

grupos fosfato, azúcar (desoxirribosa en el ADN) y una base nitrogenada. Estas desoxirribosas tienen unidas bases nitrogenadas las cuales se enlazan a otras bases nitrogenadas complementarias mediante puentes de hidrógeno para la formación de las cadenas bicatenarias, estas bases son: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G). Estas bases nitrogenadas se encuentran enlazadas específicamente en pares, A-T y C-G.

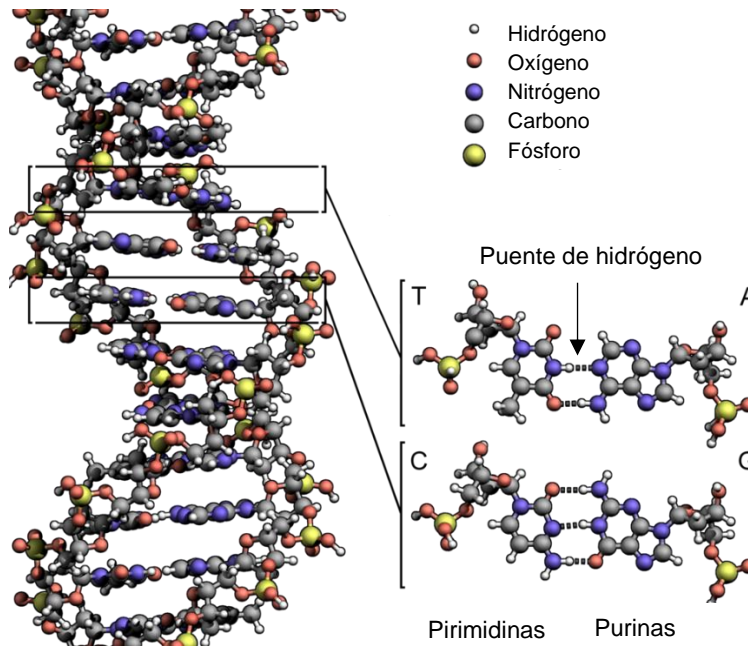


Figura 1.1: ADN bicatenario y su composición. Imagen tomada de [13].

El enlace entre pares de bases se forma mediante puentes de hidrógeno (**Figura 1.1**) y de forma simplificada en la **Figura 1.2**, donde los pares T-A se encuentran enlazados mediante dos puentes de hidrógeno y los pares C-G mediante tres puentes de hidrógeno (esto hace más fuerte la unión de este par de bases a comparación del par T-A).

Las cadenas de ADN bicatenario se desnaturalizan (separación de las hebras bicatenarias en dos hebras monocatenarias) sometiéndolas a altas temperaturas y mientras mayor sea la concentración de los pares C-G, más difícil será desnaturalizar estas cadenas debido a su enlace mediante tres puentes de hidrógeno.

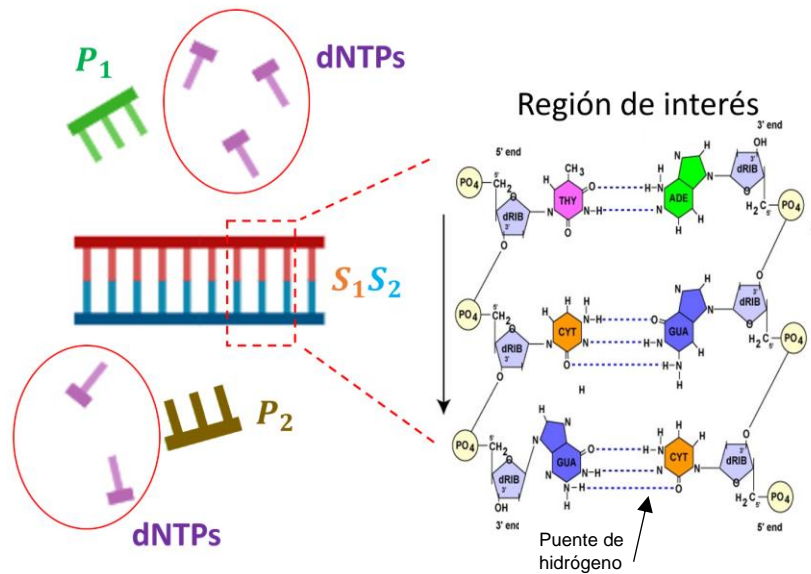


Figura 1.2: Esquema simplificado de algunos reactivos y del ADN bicatenario y su composición. Imagen adaptada de [14].

1.1.2 Primers

Los primers (P_1 y P_2) son cadenas monocatenarias de ADN de ~ 20 bp de longitud, estos son complementarios a las cadenas de ADN monocatenario y se enlazan a estas últimas flanqueando la región target [12], los primers forman complejos con las cadenas monocatenarias S_2P_1 y S_1P_2 (**Figura 1.3**). Además, estos primers son reconocidos por la polimerasa Taq como “señales” para el inicio y finalización de la amplificación de la región target.

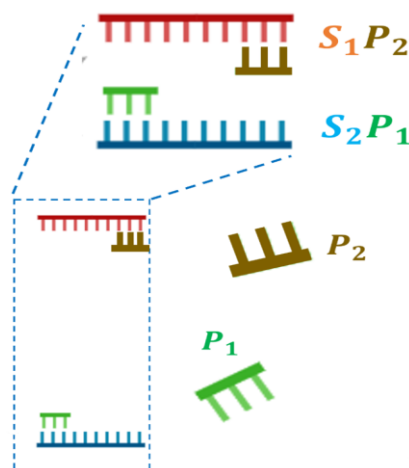


Figura 1.3: Esquema simplificado de los primers alineados (P_1 y P_2) con sus respectivas cadenas monocatenarias complementarias (S_1 y S_2). Imagen adaptada de [14].

Los primers son diseñados “a la medida” para unirse a secuencias específicas del ADN monocatenario, estas secuencias específicas corresponden a los extremos de la región

target (región de interés a amplificar). Debido a esto la especificidad de las pruebas PCR puede llegar a alcanzar de 98 a 99%.

1.1.3 Etapas de la PCR

La reacción PCR se lleva a cabo en ciclos formados de 3 etapas principales [10]–[12] (**Figura 1.4**) mostrados a continuación:

- 1) **Desnaturalización:** Se calienta la disolución a $\sim 96^{\circ}\text{C}$ ya que, a esa temperatura, los puentes de hidrógeno se vuelven inestables, lo que ocasiona que las cadenas de ADN bicatenarias (S_1S_2) sean separadas y que cada cadena monocatenaria (S_1 y S_2) resultante de la desnaturalización actúe como molde para la generación de copias.
- 2) **Alineación:** La disolución se baja a $\sim 55^{\circ}\text{C}$, a esa temperatura los primers “reconocen” sus secuencias complementarias en los extremos correspondientes de las cadenas de ADN monocatenarias (flanquean la región target), y se enlazan a estas mediante la formación de puentes de hidrógeno (S_2P_1 y S_1P_2).
- 3) **Extensión (amplificación, elongación o polimerización):** La disolución se calienta a $\sim 72^{\circ}\text{C}$, a esa temperatura la polimerasa Taq alcanza su mayor actividad, permitiendo que esta tome los dNTPs del medio, extendiendo los primers para sintetizar la secuencia de ADN complementaria a las cadenas monocatenarias (se generan amplicones o copias).

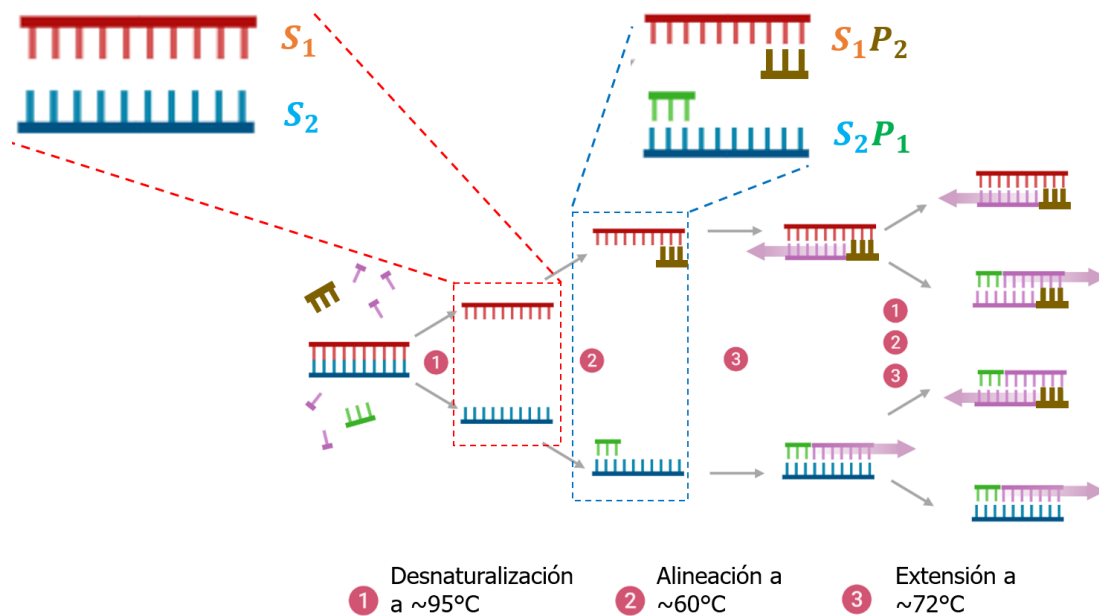


Figura 1.4: Reacciones de la PCR. Imagen adaptada de [14].

Los 3 pasos mencionados forman un ciclo y una reacción PCR comúnmente requiere de entre 20 a 40 ciclos. Además, varias enzimas comerciales tienen acoplado un anticuerpo para evitar amplificaciones inespecíficas, por lo que se requiere de una desnaturalización inicial alrededor de los 96°C para desacoplar ese anticuerpo.

La visualización de los resultados de la reacción PCR tradicional se lleva a cabo mediante electroforesis en gel, técnica en la que se aplica un potencial eléctrico para mover la muestra biológica de acuerdo con su peso molecular a través de un gel, además la muestra es mezclada con un buffer con carga que evita que la muestra se disperse en el medio, se tiñe el ADN con Bromuro de Etidio (BrEt) para poder visualizar las bandas de muestra mediante fluorescencia exponiéndola a luz ultravioleta.

1.2 Tecnología PCR

1.2.1 qPCR

La qPCR es una variante de la PCR que permite medir el incremento de la concentración de amplicones a lo largo del tiempo a través de la medición de la intensidad de la fluorescencia generada por fluoróforos (la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de amplicones). El comportamiento de la intensidad de la fluorescencia en la qPCR tiene 4 fases (**Figura 1.5**):

- 1) Fase basal: Se considera que la reacción no se está produciendo o que aún no se detecta.
- 2) Fase exponencial: Fase en que la generación de amplicones se da de forma exponencial.
- 3) Fase lineal: Fase en que la generación de amplicones se da de forma lineal.
- 4) Fase meseta: La reacción empieza a parar debido a la falta de algún reactivo por el agotamiento o merma de los precursores.

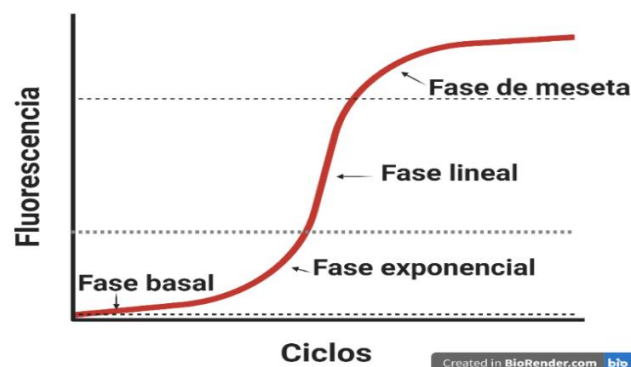


Figura 1.5: Fases de la qPCR. Imagen adaptada de [14].

La qPCR tiene varias ventajas sobre la PCR convencional las cuales son: la medición y detección en tiempo real de la muestra y la eliminación de la necesidad de postprocesamiento de la muestra (el postprocesamiento de la muestra puede causar contaminaciones).

Existen varios factores que influyen en la eficiencia de la PCR, como lo son: el volumen de la reacción, la concentración y calidad de las muestras de ADN [10], por ejemplo, la concentración de iones de Magnesio afecta la actividad de las polimerasas [10], [11] la concentración de dNTPs y polimerasas pueden dar lugar a amplificaciones inespecíficas [10], la capacidad de los termocicladores de alcanzar las temperaturas deseadas, así como la capacidad de transmisión de calor entre el dispositivo y la muestra afectan el tiempo de reacción [15].

1.2.2 Termocicladores PCR

Actualmente, la mayoría de los dispositivos tradicionales para realizar PCR y qPCR, están diseñados para su uso en laboratorios, por lo que carecen de portabilidad debido a su gran tamaño y peso, además requieren de un alto consumo energético, esto imposibilita su uso en lugares de difícil acceso o escasos recursos.

Además, dichos reactivos usados en la PCR requieren de pasar por distintos ciclos térmicos que se repiten múltiples veces, para ello existen diversos tipos de termocicladores como los que usan radiación infrarroja para el control de temperatura [16]. En general, existen dos tipos principales:

- Conductivos: Utilizan la conducción de calor en recipientes de reacción colocados en placas fijas que son enfriadas o calentadas con componentes termoeléctricos.
- Convectivos: Generan flujos de convección mediante gradientes de temperatura en un contenedor en el cual se encuentra la disolución usada en la PCR, estos flujos de convección llevan a la muestra por diferentes zonas de temperatura. Una de las ventajas de este tipo de termocicladores es que requieren de un control de temperatura pasivo [17], [18].

1.2.3 Tecnología microfluídica

Los dispositivos microfluídicos para PCR presentan una gran ventaja con respecto a otros dispositivos tradicionales, ya que estos dispositivos pueden ser bastante pequeños, esto aumenta su portabilidad y además permiten trabajar con volúmenes de reactivos bastante pequeños y así poder generar cambios de temperatura más rápidos en las disoluciones, esto se traduce en un tiempo de análisis más rápido.

1.2.3.1 PCR por conducción

Los dispositivos PCR con termocicladores basados en la conducción térmica para el termociclado de las disoluciones, utilizan sistemas de control de temperatura activo, varios de estos dispositivos se han adaptado a dispositivos microfluídicos como lo son las placas de micro-pozos, que reducen la cantidad de reactivos y volúmenes necesarios para la reacción, lo cual agiliza el termociclado de las disoluciones.

Otros dispositivos utilizan cámaras de reacción fijas, con un elemento termoeléctrico en contacto para termociclar las disoluciones, por medio de la conducción de calor, como el dispositivo hecho por Pavel *et al.* [19], que utiliza un calentador de película delgada de silicio para calentar una gota de aceite que encapsula la disolución PCR. Este implementa un sistema de medición de fluorescencia por debajo del chip y una pantalla táctil, además este dispositivo requiere de 3W de potencia (**Figura 1.6**).

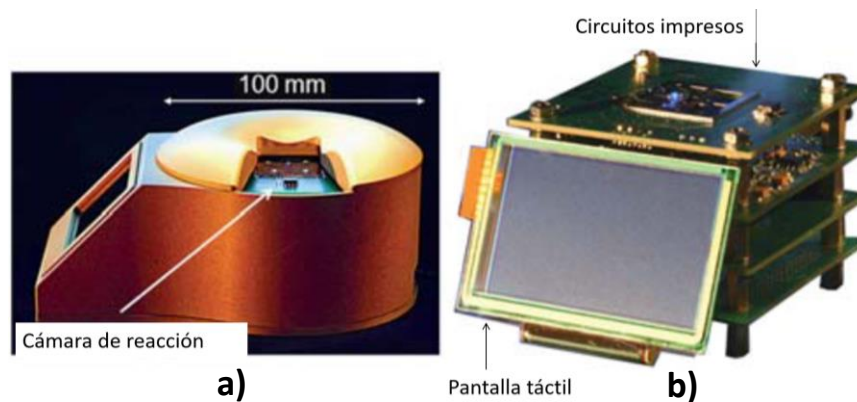


Figura 1.6: Dispositivo PCR: **a)** Fotografía de un dispositivo portátil PCR en una carcasa de aluminio y **b)** fotografía del dispositivo que muestra las placas de circuitos con una pantalla táctil, el sistema de detección de fluorescencia se encuentra debajo del chip. Dispositivo PCR desarrollado por Pavel *et al.* [19].

Otro dispositivo es el propuesto por Limin *et al.* [20], donde implementa un sistema de medición de fluorescencia con una fuente de luz y una cámara, además utiliza un sistema de rotación que mueve calentadores a temperatura constante sobre el chip que se encuentra fijo, este chip contiene la cámara de reacción donde por medio de la conducción de calor se calienta o se enfría el chip. El sistema de rotación consiste en un motor que mueve dos calentadores a una temperatura fija de 95° y 60°C y los pone en contacto sobre el chip para llevarlo a las temperaturas ideales de los procesos de desnaturalización y alineación. Para bajar la temperatura del chip de 95° a 60°C ningún calentador se encuentra sobre el chip. Una desventaja de este dispositivo es que requiere de elementos extra como lo es un motor, que se usa para mover los calentadores, además de que esto incrementa el peso y tamaño del dispositivo (**Figura 1.7**).

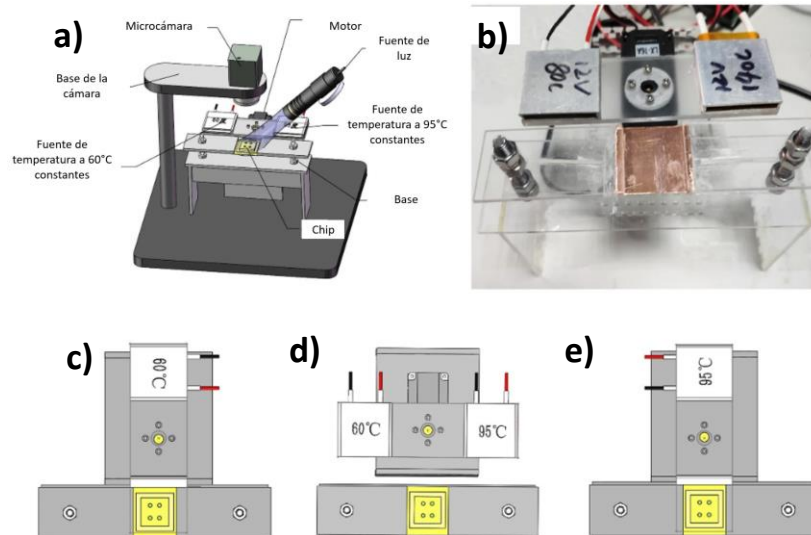


Figura 1.7: Dispositivo PCR: **a)** diagrama del dispositivo PCR y sus partes, **b)** fotografía del dispositivo, **c)** calentadores rotados -90° , el calentador a 95°C se encuentra sobre el chip, **d)** calentadores rotados -0° , ningún calentador se encuentra sobre el chip para que este se enfríe, **e)** calentadores rotados 90° , el calentador a 60°C se encuentra sobre el chip. El dispositivo fue desarrollado por Limin *et al.* [20].

1.2.3.2 PCR por convección

La PCR por convección utiliza dispositivos con canales que forman circuitos cerrados, en los cuales, las diferentes etapas de un ciclo PCR se encuentran separadas espacialmente [17], [18]. Debido a que un flujo de convección arrastra diferentes especies químicas involucradas en el proceso a diferentes zonas de temperatura, estos flujos de convección se generan creando gradientes de temperatura utilizando un sistema de control de temperatura pasivo que calienta y/o enfría distintas zonas fijas del chip (cada zona representa una etapa diferente de las reacciones PCR). En este tipo de PCR gracias al fenómeno de la convección las 3 etapas del proceso de la PCR (desnaturalización, alineación y extensión) se llevan a cabo al mismo tiempo.

Este tipo de PCR permite un termociclado de los reactivos rápido y sencillo, el tiempo en el que se dan las reacciones químicas es rápido debido a las pequeñas cantidades de volumen que se utilizan. Otra ventaja de este tipo de dispositivos es que presentan un tamaño bastante pequeño comparado con otros dispositivos y la implementación de distintas geometrías puede llegar a ser sencilla [18].

En el trabajo realizado por Madhavi *et al.* [18] se presentan los resultados de varias simulaciones y pruebas de concepto para dispositivos de convección con distintas geometrías, la parte relacionada con la simulación se enfocó en la influencia de los gradientes de temperatura en la velocidad de los flujos de convección, y los resultados de las pruebas de concepto resultaron ser positivos debido a que prueban la

adaptabilidad de este tipo de PCR para distintos volúmenes de reacción y a los rápidos ciclos en que se lleva a cabo el termociclado de la disolución PCR (**Figura 1.8**).

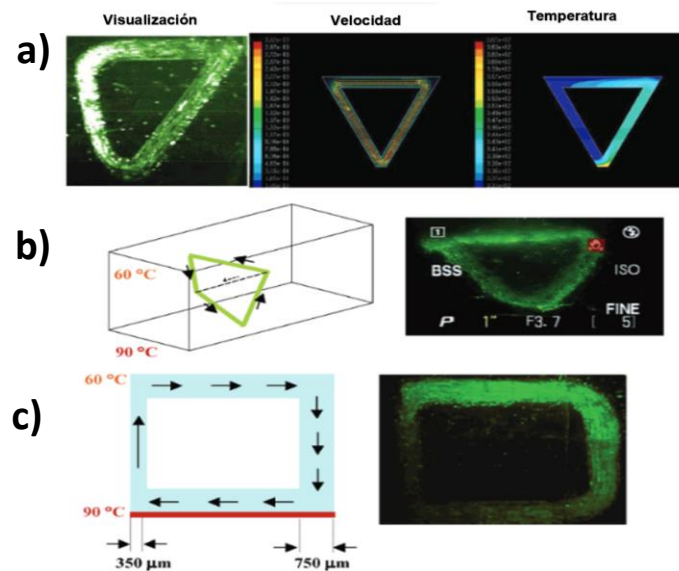


Figura 1.8: Diagramas y gráficas de **a)** visualización del flujo y temperatura de un circuito triangular, **b)** visualización del flujo en una variación del circuito triangular y **c)** la visualización del flujo en un circuito rectangular. Imagen tomada del trabajo de Madhavi *et al.* [18].

1.2.3.3 PCR de flujo continuo

La PCR de flujo continuo utiliza dispositivos donde las diferentes etapas de un ciclo PCR se encuentran separadas espacialmente, debido a que se utiliza un sistema de control de temperatura pasivo que calienta y/o enfría distintas zonas fijas del chip, a través del cual, usando una bomba, circula un fluido por canales serpenteantes que recorren varias veces las distintas zonas de temperaturas [15], [21], [22].

Este tipo de PCR permite un termociclado rápido y sencillo de la disolución para PCR, el tiempo de reacción para cada paso depende de la velocidad con el que se esté inyectando la disolución en el dispositivo y la longitud de los canales [21], [22] en las distintas zonas de temperaturas, cada nuevo ciclo empieza cuando el fluido vuelve a pasar por el área de desnaturalización y todas las etapas de la PCR se llevan a cabo al mismo tiempo.

En el trabajo de Leticia *et al.* [22] se presenta un chip hecho de un polímero termoplástico, donde se utiliza una bomba de infusión para inyectar los reactivos PCR e implementan un sistema de medición de fluorescencia con una cámara CCD (**Figura 1.9**). Este dispositivo obtuvo resultados positivos debido a los rápidos tiempos de reacción y obtuvo una eficiencia entre el 90-100% en la detección de las bacterias *C. trachomatis* y *E. coli*.

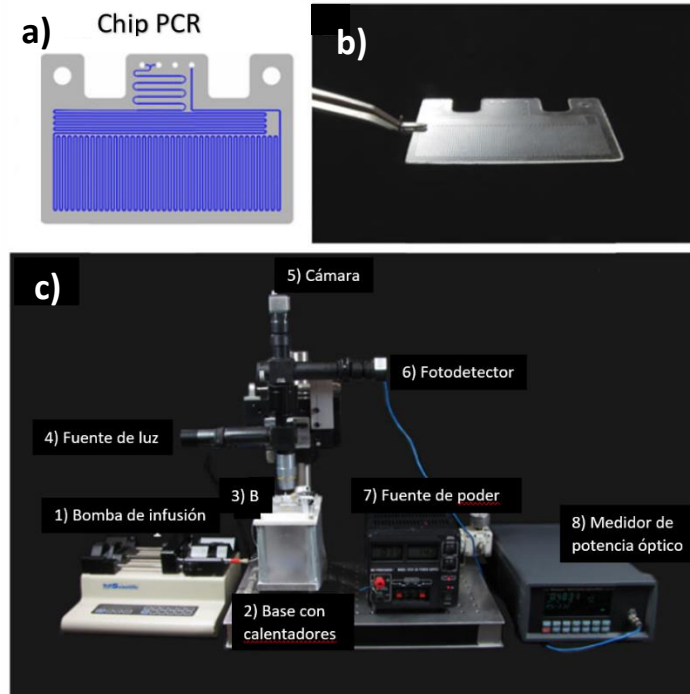


Figura 1.9: Dispositivo PCR: **a)** diagrama del diseño del chip, **b)** fotografía del chip y **c)** componentes del dispositivo PCR con sistema óptico, fuente de poder y bomba de infusión. Dispositivo elaborado por Leticia *et al.* [22].

Varios trabajos relacionados con la simulación de dispositivos PCR se han presentado, como por ejemplo los trabajos de Papadopoulos *et al.* y Matthew *et al.* [23], [24]. En donde se presenta la simulación multi-física de dispositivos PCR de flujo continuo y donde analizan el impacto de la temperatura aplicada en las reacciones PCR que se están llevando a cabo, estos dos trabajos utilizan un modelo de 5 pasos (desnaturalización, renaturalización, alineación, alineación reversa y extensión), además en estos trabajos se acoplan los fenómenos de transferencia de calor, dinámica de fluidos, transporte de masa y un modelo de reacciones químicas dependiente de la temperatura. En el trabajo de Papadopoulos *et al.* [23] se presentó un problema en el cual no se hibridaban todos los primers con sus respectivas cadenas monocatenarias en la zona de alineación, lo cual causa que todas las reacciones PCR tarden más en completarse, una solución a esto es la reducción de velocidad con la que se inyecta el fluido.

Capítulo 2

Marco teórico

En este capítulo se presenta la deducción de la ecuación de continuidad o de conservación de una cantidad escalar y a partir de esta ecuación se derivan las ecuaciones de continuidad para mecánica de fluidos (conservación de la masa), ecuación de transporte de calor (conservación de la energía térmica) y la de transporte de especies químicas (conservación de la masa). Además, se derivan las ecuaciones de Navier-Stokes (conservación del momento) las cuales son las ecuaciones gobernantes de la mecánica de fluidos junto con la ecuación de continuidad. Finalmente, se describe el modelo de la cinética de reacciones PCR utilizada en este trabajo.

2.1 Ecuación de continuidad

La ecuación de continuidad (o de transporte) es una ecuación que indica la conservación de una cantidad física (o química) de interés que puede fluir (o moverse). Para derivar la ecuación de continuidad, se define una región en el espacio Ω encerrada por una superficie $\partial\Omega$ y un vector normal unitario \mathbf{n} (saliente) a esta superficie (**Figura 2.1**). Dentro de la región Ω se encuentra el total de la cantidad física o química de interés $q(\Omega, t)$ (ua) y se define la densidad por unidad de volumen $\varrho(\mathbf{r}, t)$ ($ua \cdot m^{-3}$) de $q(\Omega, t)$. La cantidad $q(\Omega, t)$ puede moverse o fluir, esto nos permite definir un campo vectorial de densidad de flujo \mathbf{J} ($ua \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) de esta cantidad, además este vector de flujo circula a través de la región Ω .

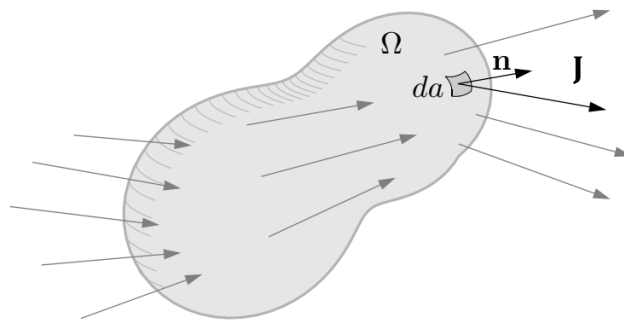


Figura 2.1: Región en el espacio Ω en la que circula un campo vectorial \mathbf{J} . Esquema libre de fuentes o sumideros.

El total de la cantidad $q(\Omega, t)$ es la integral de volumen de la densidad $\varrho(\mathbf{r}, t)$ de esa cantidad en la región Ω (2.1).

$$q(\Omega, t) = \iiint_{\Omega} \varrho(\mathbf{r}, t) dV \quad (2.1)$$

donde t es el tiempo, V el volumen y \mathbf{r} es el vector de posición de la partícula de interés. Por otro lado, la tasa de cambio de $q(\Omega, t)$ a través del tiempo está dado por la ecuación (2.2).

$$D_t q(\Omega, t) = D_t \iiint_{\Omega} q(\mathbf{r}, t) dV = \iiint_{\Omega} \partial_t q(\mathbf{r}, t) dV \quad (2.2)$$

Observamos que el cambio de $q(\Omega, t)$ a través del tiempo (2.2) también es igual a la diferencia de la cantidad $q(\Omega, t)$ generada (o destruida) dentro de la región Ω y de la cantidad $q(\Omega, t)$ que sale (o entra) de (o a) la región Ω (2.3).

$$D_t q(\Omega, t) = \iiint_{\Omega} \sum_j Q_j dV - \iint_{\partial\Omega} \mathbf{J} \cdot \mathbf{n} da = \iiint_{\Omega} \sum_j Q_j dV - \iiint_{\Omega} \nabla \cdot (\mathbf{J}) dV \quad (2.3)$$

donde Q_j representa sumideros o fuentes de la cantidad $q(\Omega, t)$, estos sumideros pueden deberse a que algún fenómeno ya sea físico o químico está contribuyendo (o restando) a la cantidad de interés. De esta manera podemos igualar las ecuaciones (2.2) y (2.3) y se obtiene la forma integral de la ecuación de continuidad (2.4).

$$\iiint_{\Omega} [\partial_t q(\mathbf{r}, t) + \nabla \cdot (\mathbf{J}) - \sum_j Q_j] dV = 0 \quad (2.4)$$

la ecuación (2.4) es válida para cualquier región Ω arbitraria y esto es posible si el integrando es 0. Entonces se obtiene la ecuación de continuidad en forma diferencial (2.5).

$$\partial_t q(\mathbf{r}, t) + \nabla \cdot (\mathbf{J}) = \sum_j Q_j \quad (2.5)$$

2.2 Ecuación de calor

La ecuación de calor expresa la conservación de la energía térmica. Para derivarla se retoma la ecuación (2.5), donde ahora nos interesa que la energía térmica total en la región Ω sea la cantidad física de interés $q(\Omega, t)$ (J), por esto la densidad $q(\mathbf{r}, t)$ ($J \cdot m^{-3}$) [25] representa la densidad por unidad de volumen de la energía térmica en la región Ω (2.6) y \mathbf{J} ($J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) representa al vector de flujo de calor (o vector de flujo de densidad de energía térmica) [25].

$$q(\mathbf{r}, t) = \rho(\mathbf{r}, t) C_p(T) T(\mathbf{r}, t) \quad (2.6)$$

donde $\rho(\mathbf{r}, t)$ ($kg \cdot m^{-3}$) es la densidad del medio en la región Ω , $C_p(T)$ ($J \cdot K^{-1} \cdot kg^{-1}$) es la capacidad calorífica específica y $T(\mathbf{r}, t)$ (K) es el campo de temperatura. El vector de flujo de calor \mathbf{J} se encuentra dado por la suma de dos flujos (2.7) [25]: el de difusión \mathbf{J}_{dif} (2.8) y el de convección \mathbf{J}_{conv} (2.9). El flujo de difusión viene dado por la ley de Fourier para un medio isotrópico (2.8), una ley experimental que expresa que el calor fluye de las zonas más calientes (mayor energía térmica) a las más frías (menor energía térmica)

y es proporcional al gradiente de la temperatura. El flujo de convección (2.9) viene dado por la cantidad de energía térmica que es arrastrada dentro y fuera de la región Ω debido a un campo vectorial, el cual, en este caso, es la velocidad de un fluido $\mathbf{u}(\mathbf{r}, t)$.

$$\mathbf{J} = \mathbf{J}_{\text{dif}} + \mathbf{J}_{\text{conv}} \quad (2.7)$$

$$\mathbf{J}_{\text{dif}} = -\kappa(\mathbf{r})\nabla T(\mathbf{r}, t) \quad (2.8)$$

$$\mathbf{J}_{\text{conv}} = \varrho(\mathbf{r}, t)\mathbf{u}(\mathbf{r}, t) = \rho(\mathbf{r}, t)C_p(T)T(\mathbf{r}, t)\mathbf{u}(\mathbf{r}, t) \quad (2.9)$$

Donde $\kappa(\mathbf{r})$ ($\text{J} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) es el coeficiente de conductividad térmica. Sustituyendo las ecuaciones (2.6) a (2.9) en la ecuación (2.5) obtenemos la ecuación de transporte de calor (2.10) (ecuación de calor).

$$\partial_t[\rho(\mathbf{r}, t)C_p(T)T(\mathbf{r}, t)] - \nabla \cdot (\kappa(\mathbf{r})\nabla T(\mathbf{r}, t)) + \nabla \cdot (\rho(\mathbf{r}, t)C_p(T)T(\mathbf{r}, t)\mathbf{u}(\mathbf{r}, t)) = \sum_j Q_j \quad (2.10)$$

Las fuentes (o sumideros) en esta ecuación representan una pérdida (o ganancia) de energía térmica a través del intercambio de energía con el medio (por ejemplo, pérdidas de energía por transferencia de calor al aire o por que un dispositivo está calentando o enfriando zonas del dispositivo) o por medio de reacciones químicas exotérmicas (o endotérmicas).

2.3 Ecuación de transporte de especies

La ecuación de transporte de especies expresa la conservación de la masa. Para derivarla se retoma la ecuación (2.5) y, en este caso, nos interesa que la masa total correspondiente a la i -ésima especie química en la región Ω sea la cantidad química de interés $q(\Omega, t)$ (mol), por esto sustituimos la densidad $\varrho(\mathbf{r}, t)$ por la concentración molar $c_i(\mathbf{r}, t)$ ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$) [25] de la i -ésima especie química en la región Ω (2.11) y \mathbf{J} ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) [25] representa al vector de flujo de concentración molar,

$$\varrho(\mathbf{r}, t) \equiv c_i(\mathbf{r}, t) \quad (2.11)$$

El vector de flujo de concentración molar \mathbf{J}_i se encuentra dado por la suma de dos flujos (2.12) [25]: el de difusión $\mathbf{J}_i^{\text{dif}}$ (2.13) y el de convección $\mathbf{J}_i^{\text{conv}}$ (2.14). El flujo de difusión viene dado por la ley de Fick (2.13), una ley experimental que expresa que la concentración de especies químicas fluye de las zonas más concentradas a las menos concentradas y es proporcional al gradiente de la concentración. El flujo de convección (2.14) viene dado por la cantidad de la i -ésima especie química que es arrastrada dentro y fuera de la región Ω debido a un campo vectorial, el cual, en este caso, es la velocidad de un fluido $\mathbf{u}(\mathbf{r}, t)$.

$$\mathbf{J}_i = \mathbf{J}_i^{\text{dif}} + \mathbf{J}_i^{\text{conv}} \quad (2.12)$$

$$\mathbf{J}_i^{\text{dif}} = -D_i \nabla c_i(\mathbf{r}, t) \quad (2.13)$$

$$\mathbf{J}_i^{\text{conv}} = c_i(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t) \equiv c_i(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t) \quad (2.14)$$

donde D_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) es el coeficiente de difusividad de la i -ésima especie química. Sustituyendo las ecuaciones (2.11) a (2.14) en la ecuación (2.5) obtenemos la ecuación de transporte de especies (2.15)

$$\partial_t c_i(\mathbf{r}, t) - \nabla \cdot (D_i \nabla c_i(\mathbf{r}, t)) + \nabla \cdot (c_i(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t)) = \sum_j Q_j \quad (2.15)$$

Las fuentes (o sumideros) en esta ecuación representan una pérdida (o ganancia) de la concentración de la i -ésima especie química a través de reacciones químicas o de la adición (o remoción) manual de estas especies.

2.4 Ecuación de continuidad (mecánica de fluidos)

La ecuación de continuidad en mecánica de fluidos expresa la conservación de la masa. Para derivarla usamos nuevamente la ecuación (2.5) y la masa total del fluido en la región Ω es la cantidad física de interés $q(\Omega, t)$ (kg), por esto la densidad $q(\mathbf{r}, t) = \rho(\mathbf{r}, t)$ ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) representa la densidad del fluido en la región Ω (2.16) y \mathbf{J} ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}$) representa al vector de densidad de flujo de masa (2.17).

$$q(\mathbf{r}, t) = \rho(\mathbf{r}, t) \quad (2.16)$$

$$\mathbf{J} = q(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t) = \rho(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t) \quad (2.17)$$

Sustituyendo las ecuaciones (2.16) y (2.17) en la ecuación (2.5) obtenemos la ecuación de continuidad general para mecánica de fluidos (2.18).

$$\partial_t \rho(\mathbf{r}, t) + \nabla \cdot (\rho(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t)) = \sum_j Q_j \quad (2.18)$$

Las fuentes (o sumideros) en esta ecuación representan una pérdida (o ganancia) de la masa del fluido a través de la adición (o remoción) manual del fluido o debido a filtraciones.

2.5 Ecuaciones de Navier Stokes

Las ecuaciones de Navier-Stokes nos permiten modelar el comportamiento de los fluidos en múltiples situaciones, además expresan la conservación del momento. Estas ecuaciones son el equivalente a la segunda ley de Newton (2.19) para un medio continuo (2.20).

$$\sum \mathbf{F}_i = m\mathbf{a} \quad (2.19)$$

$$\sum \mathbf{f}_i = \rho\mathbf{a} \quad (2.20)$$

donde $\sum \mathbf{F}_i$ es la suma de fuerzas que actúa sobre el sistema, m es la masa, \mathbf{a} es el vector de aceleración, $\sum \mathbf{f}_i$ es la suma de densidades de fuerza (fuerza por unidad de volumen) y ρ es la densidad del medio. Primero empezamos por el cálculo de \mathbf{a} (2.21):

$$\mathbf{a}(\mathbf{r}, t) = D_t \mathbf{u}(\mathbf{r}, t) = \partial_t \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u} \partial_t \mathbf{r} = \partial_t \mathbf{u} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} \quad (2.21)$$

donde $(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u}$ es el término inercial de la densidad de fuerza $\rho\mathbf{a}$ y no lineal de las ecuaciones de Navier-Stokes. Las fuerzas que actúan sobre el sistema son la fuerza debida a la gravedad, la presión y la fricción (fuerzas viscosas), de la suma de estas fuerzas se deduce la suma de densidades de fuerza correspondiente en la Ec. (2.22).

$$\sum \mathbf{F}_i = \mathbf{F}_{\text{presión}} + \mathbf{F}_{\text{viscosas}} + \mathbf{F}_{\text{gravedad}} \Rightarrow \sum \mathbf{f}_i = \mathbf{f}_{\text{presión}} + \mathbf{f}_{\text{viscosas}} + \mathbf{f}_{\text{gravedad}} \quad (2.22)$$

Las fuerzas debidas a la gravedad y a la presión (y por lo tanto las densidades de fuerza correspondientes) son las que determinan la dirección en la que circulará el fluido. En sistemas de convección natural, la fuerza de gravedad es la que permite que se dé este fenómeno ya que, ante la presencia de diferencias de densidad en el medio, la gravedad permite que el fluido más denso desplace al menos denso.

2.5.1 Densidad de fuerza debida a la gravedad

La fuerza que ejerce la gravedad sobre el sistema es el producto entre el vector de aceleración de gravedad \mathbf{g} y la masa m de la partícula fluida sobre la cual está actuando, dividiendo entre el volumen V de esa partícula fluida se encuentra la densidad de fuerza de gravedad (2.23):

$$\mathbf{F}_{\text{gravedad}} = m\mathbf{g} \Rightarrow \mathbf{f}_{\text{gravedad}} = \rho\mathbf{g} \quad (2.23)$$

2.5.2 Densidad de fuerza debida a la presión

Para definir las fuerzas debidas a la presión definimos el tensor de estrés debido a la presión, para ello nos fijamos en un volumen diferencial (**Figura 2.2b** y **Figura 2.2c**) en el que se define un tensor de estrés que está compuesto por las contribuciones de la presión, la viscosidad y efectos de la compresibilidad (hipótesis de Stokes).

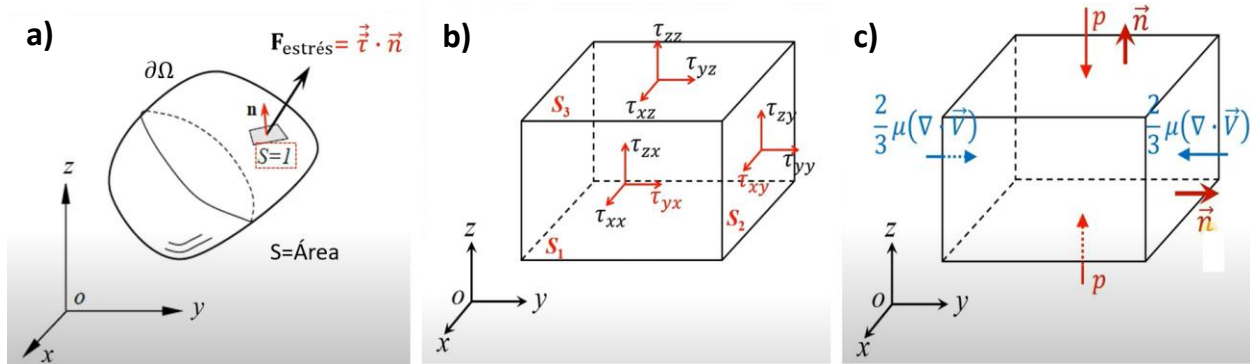


Figura 2.2: a) Fuerza causada por un estrés actuando sobre una superficie unitaria. b) Volumen diferencial en el que se definen las componentes del tensor de estrés viscoso. c) Cubo diferencial en el que se muestra las componentes de la presión y de los efectos de compresibilidad actuando perpendicularmente en la superficie del cubo.

Por definición la presión p actúa perpendicularmente a las superficies del cubo y el vector normal unitario \mathbf{n} de la superficie se encuentra apuntando en dirección opuesta en la que actúa la presión. Esto nos lleva a definir el tensor de estrés debida a la presión (2.24).

$$\tau_{\text{presión}} = - \begin{pmatrix} p & 0 & 0 \\ 0 & p & 0 \\ 0 & 0 & p \end{pmatrix} = -pI \quad (2.24)$$

Donde I es la matriz identidad. La fuerza ejercida por el tensor de estrés sobre el cubo diferencial es el producto de este tensor con el vector normal a la superficie del cubo (**Figura 2.2a**). Si consideramos nuevamente una región Ω encerrada por una superficie $\partial\Omega$ y un vector normal \mathbf{n} a esta superficie, la fuerza total ejercida por la presión p es la integral de superficie de $-pI\mathbf{n}$ o de volumen utilizando el teorema de la divergencia [26], esto es:

$$\mathbf{F}_{\text{presión}} = - \iint_{\partial\Omega} (pI)\mathbf{n} dA = - \iiint_{\Omega} \nabla \cdot (pI) dV \quad (2.25)$$

De la fuerza ejercida por la presión (2.25) se deduce la densidad de fuerza debida a la presión $\mathbf{f}_{\text{presión}}$ (2.26).

$$\mathbf{f}_{\text{presión}} = -\nabla \cdot (pI) = -\nabla p \quad (2.26)$$

2.5.3 Densidad de fuerza debida a la fricción (viscosidad)

Consideramos la misma región Ω del fluido, como en la sección anterior. Debido a la viscosidad del fluido, la región Ω va a ser sujeto a fuerzas de fricción en su superficie $\partial\Omega$ por el flujo del líquido que lo rodea. La fuerza de fricción $d\mathbf{F}$ en un elemento de superficie $\mathbf{n}da$ debe ser caracterizado por un tensor de rango de 2, debido a que se necesitan dos vectores para determinarlo: la fuerza y la superficie normal necesitan no estar dirigidos

en la misma dirección [27]. Este tensor es el tensor de estrés viscoso σ'_{ik} (2.28) (**Figura 2.2b**) y expresa que la componente F_i de la fuerza de fricción por área actuando en un elemento de área orientado con la superficie normal paralela al k ésimo vector unidad e_k [27]. Esto es:

$$dF_i = \sigma'_{ik} n_k da \quad (2.27)$$

De la **Figura 2.2b** las componentes del tensor de estrés viscoso (2.28) son:

$$\sigma' = \begin{pmatrix} \tau_{xx} & \tau_{xy} & \tau_{xz} \\ \tau_{yx} & \tau_{yy} & \tau_{yz} \\ \tau_{zx} & \tau_{zy} & \tau_{zz} \end{pmatrix} + \tau_{\text{compresibilidad}} \quad (2.28)$$

La fricción interna es diferente de 0 cuando las partículas fluídicas se mueven relativas unas a otras, por lo que σ'_{ik} únicamente depende de las derivadas espaciales de la velocidad. Para pequeños gradientes de velocidad se puede asumir que σ'_{ik} depende solo de las derivadas de primer orden de la velocidad (fluidos newtonianos, ley de la viscosidad de newton) [28], entonces σ'_{ik} debe depender linealmente de los gradientes de velocidad $\partial_i u_k$ [27] (el gradiente de la velocidad \mathbf{u} , es un tensor de rango 2 y describe como cambia el campo de velocidad en cualquier dirección), como ejemplo se muestra en la **Figura 2.3** y (2.29) el estrés en la dirección x [28].

$$\tau_{xy} = \mu \lim_{\Delta y \rightarrow 0} \frac{\Delta u_x}{\Delta y} = \mu \frac{\partial u_x}{\partial y} \quad (2.29)$$

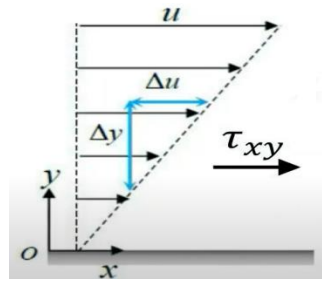


Figura 2.3: Estrés causado sobre en la dirección x .

La expresión para σ'_{ik} debe anularse cuando el líquido se encuentra rotando como un todo ($\mathbf{u} = \boldsymbol{\omega} \times \mathbf{r}$, donde $\boldsymbol{\omega}$ es el vector de velocidad angular). Para este campo de velocidad se tiene una relación antisimétrica $\delta_k u_i = -\delta_i u_k$, es por lo que σ' desaparece si solo contiene combinaciones simétricas $\delta_k u_i + \delta_i u_k$ y $\delta_j u_j$ de las primeras derivadas. El tensor más general que satisface estas condiciones es el mostrado en la (2.30) [27].

$$\sigma'_{ik} = \mu \left(\partial_k u_i + \partial_i u_k - \frac{2}{3} \delta_{ik} \partial_j u_j \right) + \zeta \delta_{ik} \partial_j u_j \quad (2.30)$$

donde μ es la viscosidad dinámica y ζ es viscosidad de volumen debido a la fricción interna que causa la presión, δ_{ik} es la delta de Kronecker. En el presente trabajo se consideran cambios de presión pequeños y un cambio de densidad independiente de la presión por lo que el término ζ se asume nulo, lo que nos deja con la siguiente expresión para σ'_{ik} (2.31):

$$\sigma'_{ik} = \mu \left(\partial_k u_i + \partial_i u_k - \frac{2}{3} \delta_{ik} \partial_j u_j \right) \quad (2.31)$$

donde el término $\mu(\partial_k u_i + \partial_i u_k)$ corresponde al tensor de estrés debido a las fuerzas viscosas y $\tau_{compresibilidad}^{ik} = \frac{2}{3} \delta_{ik} \partial_j u_j$ corresponde a las componentes que contribuyen a la compresibilidad del volumen diferencial (hipótesis de Stokes). De forma equivalente a la (2.31), se muestra la forma matricial del σ'_{ik} (2.32):

$$\sigma' = \mu \left(\nabla \mathbf{u} + \nabla^T \mathbf{u} - \frac{2}{3} I \nabla \cdot \mathbf{u} \right) \quad (2.32)$$

Las fuerzas viscosas $\mathbf{F}_{viscosas}$ se pueden escribir como la siguiente integral de superficie o de volumen mediante el teorema de la divergencia (2.33) [26]:

$$\mathbf{F}_{viscosas} = \iint_{\partial\Omega} \sigma' \mathbf{n} dA = \iiint_{\Omega} \nabla \cdot (\sigma') dV \quad (2.33)$$

Dividiendo (2.33) entre el volumen V se encuentra a $\mathbf{f}_{viscosas}$ (2.34):

$$\mathbf{f}_{viscosas} = \nabla \cdot (\sigma') = \nabla \cdot (\mu \nabla \mathbf{u} + \mu \nabla^T \mathbf{u}) - \nabla \cdot \left(\frac{2}{3} \mu I \nabla \cdot \mathbf{u} \right) \quad (2.34)$$

2.5.4 Ecuaciones de Navier-Stokes

Sustituyendo las ecuaciones (2.21) a (2.23), (2.26) y (2.34) en (2.20) nos deja con las ecuaciones de Navier-Stokes considerando los efectos de la densidad de la fuerza debida gravedad (2.36).

$$\nabla \cdot (\mu \nabla \mathbf{u} + \mu \nabla^T \mathbf{u}) - \nabla \cdot \left(\frac{2}{3} \mu I \nabla \cdot \mathbf{u} \right) - \nabla p + \rho \mathbf{g} = \rho (\partial_t \mathbf{u} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u}) \quad (2.35)$$

donde $\mathbf{u} = \mathbf{u}(\mathbf{r}, t)$, $p = p(\mathbf{r}, t)$ y $\rho = \rho(\mathbf{r}, t)$.

2.6 Modelo de la cinética de reacciones PCR

El modelo de la cinética de reacciones PCR utilizado Ecs. (2.36) a (2.50) fue tomado de [23], [24], el cual consiste en 5 pasos: 1) *desnaturalización* (2.36), (2.41) y (2.46), 2) *renaturalización* (2.36), (2.42) y (2.47), 3) *alineación* (2.37), (2.38), (2.43) y (2.48), 4) *alineación reversa* (2.40), (2.41), (2.47) y (2.52) y 5) *extensión* (2.39), (2.40), (2.45) y

(2.50) y utiliza 7 especies químicas (S_1S_2 , S_1 y S_2 , P_1 y P_2 , y S_1P_2 y S_2P_1) previamente descritas **Capítulo 1**.



Los coeficientes de reacción se definen en las Ecs. (2.41) a (2.45) en forma de funciones dependientes de la temperatura T ($^{\circ}\text{C}$) y los factores de proporción k_i se definen en las Ecs (2.46) a (2.50).

$$k_D^+(T) = \frac{k_0^+}{2} \left(1 + \tanh\left(\frac{T-88}{5}\right) \right) \quad (2.41)$$

$$k_D^-(T) = \frac{k_0^-}{2} \left(1 + \tanh\left(-\frac{T-75}{5}\right) \right) \quad (2.42)$$

$$k_A^+(T) = \frac{k_1^+}{2} \left(1 + \tanh\left(-\frac{T-62.5}{5}\right) \right) \quad (2.43)$$

$$k_A^-(T) = \frac{k_1^-}{2} \left(1 + \tanh\left(\frac{T-66}{5}\right) \right) \quad (2.44)$$

$$k_E(T) = k_2 \exp\left(-\left(\frac{T-70}{5}\right)^2\right) \quad (2.45)$$

$$k_0^+ = 12.5 \text{ s}^{-1} \quad (2.46)$$

$$k_0^- = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (2.47)$$

$$k_1^+ = 5 * 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (2.48)$$

$$k_1^- = 10^{-4} \text{ s}^{-1} \quad (2.49)$$

$$k_2 = 0.32 \text{ s}^{-1} \quad (2.50)$$

El coeficiente de reacción del proceso de extensión (2.45) es una gaussiana (**Figura 2.4**) que tiene su máximo a 70°C. Los coeficientes de reacción de los procesos de desnaturalización (2.41) y alineación reversa (2.44) tienen como puntos de inflexión los 88 °C y 66 °C, respectivamente, son tangentes hiperbólicas (**Figura 2.5a** y **Figura 2.5d**) e incrementan conforme incrementa la temperatura. Los coeficientes de reacción de los procesos de renaturalización (2.42) y alineación (2.43) tienen como puntos de inflexión los 75 °C y 62.5 °C respectivamente, son tangentes hiperbólicas reflejadas horizontalmente (**Figura 2.5b** y **Figura 2.5c**) e incrementan conforme decrecienta la temperatura. Todos los coeficientes de reacción (2.41) a (2.45) se encuentran acotados entre 0 y sus correspondientes factores de proporción (2.46) a (2.50) y (**Figs. 2.4** y **2.5**).

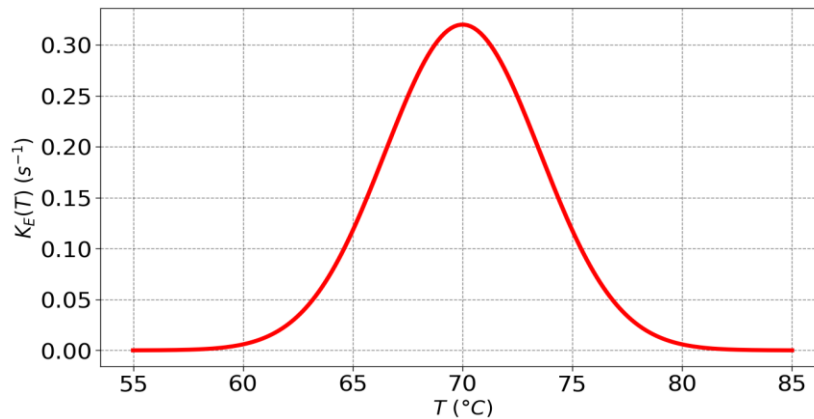


Figura 2.4: Tasa de reacción del proceso de extensión.

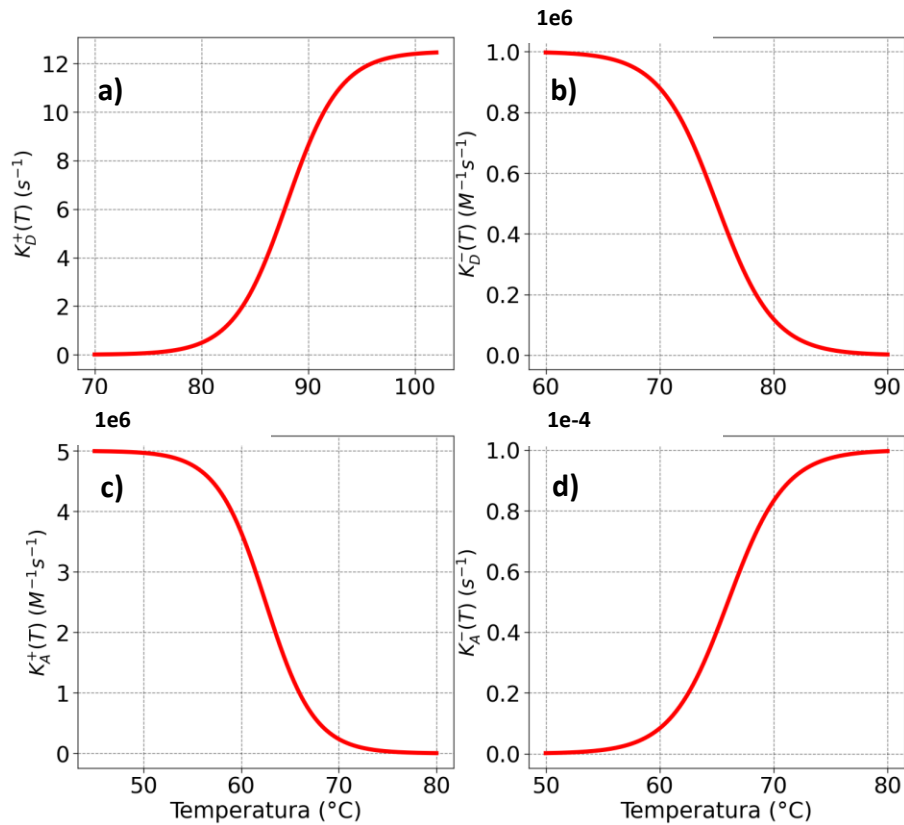


Figura 2.5: Tasas de reacción de los procesos de: **a)** desnaturalización, **b)** renaturalización, **c)** alineación y **d)** alineación reversa.

Las diferencias en las unidades de los coeficientes k_i de (2.46) a (2.50) se debe al orden de la reacción, las reacciones de primer orden dependen de la concentración de una especie y tienen en su coeficiente de reacción las unidades de s^{-1} , las reacciones de segundo orden dependen de la concentración de dos especies y su coeficiente de reacción tiene unidades de $M^{-1} s^{-1}$.

2.6.1 Teoría del método de elementos finitos

El método de elementos finitos es un método numérico ampliamente utilizado para la resolución de ecuaciones diferenciales. Con este método dado un dominio, este se subdivide en varios subdominios (elementos finitos) unidos entre sí por nodos.

Las ecuaciones diferenciales que modelan el problema a resolver tienen que ser transformadas a su forma débil y a partir de esta forma son discretizadas y transformadas en sistemas de ecuaciones algebraicas, estos sistemas algebraicos se solucionan en cada uno de los nodos y mediante métodos de interpolación se aproxima el comportamiento del sistema alrededor de los nodos usando polinomios de cierto orden especificado. Los polinomios resultantes de la interpolación deben ser continuos en los puntos adyacentes con otros subdominios o nodos al igual que sus derivadas (las derivadas pueden ser de 1 a n veces débilmente diferenciables) [8], [9].

Para transformar una ecuación diferencial $g(u)$ a su forma débil se tiene que multiplicar esta por una función escalar de prueba w e integrar sobre todo el dominio del sistema Ω (2.51), en el caso de los sistemas de ecuaciones diferenciales $\mathbf{g}(u)$ se multiplica por una función vectorial de prueba \mathbf{w} mediante el producto punto y se integra en todo el dominio del sistema (2.52) [29].

$$\iiint_{\Omega} g(u)w dV \quad (2.51)$$

$$\iiint_{\Omega} \mathbf{g}(u) \cdot \mathbf{w} dV \quad (2.52)$$

Teniendo la forma débil de las ecuaciones, se define que x y w son generadas por la misma base de funciones, esta base de funciones pertenece a los espacios de Sobolev [29], este espacio es un espacio de funciones, subconjunto de los espacios de Hilbert. Las funciones pertenecientes a los espacios de Sobolev se pueden restringir a admitir cierto número de derivadas débiles [29] (en una dimensión significa que se puede integrar por partes), además se pueden definir funciones definidas por partes que se anulen en ciertas regiones del espacio.

Una vez definida la base de funciones del espacio de funciones V^h con la que se aproximará la solución de la ecuación diferencial, se representará esta base como $\{\phi_i(x)\}_{i=1}^N$ donde N es la dimensionalidad del espacio V^h . Con esto se puede aproximar la solución continua u como una solución discreta u^h (2.53) [29].

$$u \approx u^h = \sum_j k_j \phi_j \quad (2.53)$$

En el caso de que la solución sea una función vectorial se tiene que (2.54):

$$\mathbf{u} \approx \mathbf{u}^h = \sum_j k_j \boldsymbol{\phi}_j \quad (2.54)$$

Esta formulación permite probar la formulación débil contra cada miembro de la base de funciones (2.55) [29].

$$\sum_j k_j A(\phi_j, \phi_i) = (f, \phi_i) \quad (2.55)$$

Donde $A(\phi_j, \phi_i)$ es una matriz formada por combinaciones de los elementos ϕ_j, ϕ_i, k_j son coeficientes que multiplican a la matriz A . Las funciones base deben ser simples y se escogen ser funciones lineales definidas por partes (2.56) [29].

$$\phi_i(x) = \begin{cases} \frac{x-x_{i-1}}{h}, & x \in [x_{i-1}, x], \quad h = \frac{1}{N} \\ \frac{x_{i+1}-x}{h}, & x \in [x, x_{i+1}], \quad i = N - 1 \\ 0, & \text{en cualquier otro lado} \end{cases} \quad (2.56)$$

Capítulo 3

Simulación y Métodos

En este capítulo se describe la metodología aplicada en la realización del presente trabajo de tesis, se describen las suposiciones utilizadas en las ecuaciones del modelo matemático deducidas en el capítulo 2 y las ecuaciones resultantes de estas suposiciones, se mencionan las condiciones iniciales y de frontera utilizadas, así como la derivación de la forma débil y discretización de las ecuaciones que utiliza COMSOL para la realización de las simulaciones FEM. Se describe brevemente los módulos utilizados para las simulaciones y como estas se llevaron a cabo, como se realizó el procesamiento y análisis de los resultados de las simulaciones a través de análisis gráfico y de regresión lineal.

3.1 Parámetros de Operación

El sistema PCR microfluídico consiste en tubos capilares de borosilicato que forman un circuito cerrado triangular (**Figura 3.1**). Se escogió como parámetros físicos de operación del sistema PCR, la temperatura de desnaturalización (TD), la temperatura de renaturalización (TA), la temperatura de extensión (TE) y el diámetro interno de los capilares (ID) (ver **Tabla 3.1**). Los valores TD, TA y TE escogieron de acuerdo con lo reportado en la literatura como parámetros experimentales óptimos para el proceso PCR [10], [11]. Debido a que los procesos de desnaturalización y renaturalización dependen de temperaturas específicas, éstas no pueden excederse de ciertos rangos. En el caso de ID de los capilares, se escogieron con los valores que se encuentran comercialmente disponibles [30].

Se utilizó un diseño experimental factorial 3^4 con los parámetros de operación TD, TA, TE e ID del sistema PCR definidos en la **Tabla 3.1**. Para la realización de las simulaciones y para poder medir el impacto de estos parámetros en la eficiencia del sistema mediante análisis de regresión lineal. El total de combinaciones de los parámetros de operación es de 81.

Tabla 3.1: Parámetros de operación. Temperaturas TD, TA y TE fueron basadas en [10], [11]. Diámetros internos ID fueron tomados de [30].

TD (°C)	TA (°C)	TE (°C)	ID (μm)
92	55	70	632.4
95	60	72	690.8
98	65	74	797.5

3.2 Geometría del Sistema PCR

Se modeló el sistema PCR mediante AutoCAD, los tres capilares de borosilicato con las siguientes características:

- Cada capilar tiene una longitud de 64 mm.
- Cada capilar forma un circuito cerrado triangular.
- ID es de 632.4, 690.8 y 797.5 μm de cada uno de los capilares (**Tabla 3.1**).

En la **Figura 3.1** se muestra el diseño del sistema microfluídico PCR. La **Figura 3.1a** se muestra marcado en azul las tres zonas TD, TA, TE que corresponden a condiciones de frontera de temperatura isothermas en la superficie del vidrio de borosilicato. Por su parte, **Figura 3.1b** muestra los dominios del fluido y el borosilicato. Dominio del fluido (interior del tubo, marcado en azul) y dominio de frontera (pared, marcado en color gris).

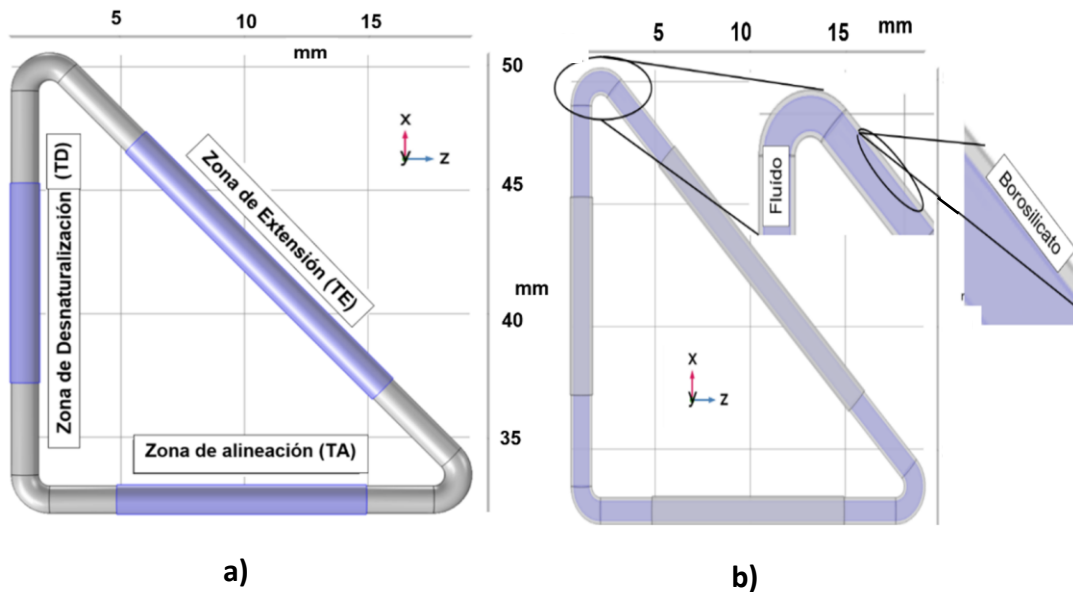


Figura 3.1: a) Fronteras de temperatura isothermas: zona de desnaturalización TD, zona de alineación TA y zona de extensión TE. b) Dominios del sistema PCR: fluido y frontera.

Una de las ventajas de la geometría escogida es su tamaño compacto, lo cual permitiría que para su futura construcción el dispositivo final cuente también con un tamaño compacto y ligero, a diferencia de la mayoría de los dispositivos PCR tradicionales que están diseñados para su uso en laboratorios de hospitales o académicos, por lo que son voluminosos y pesados, esto dificulta su portabilidad y uso en lugares apartados (**Tabla 3.2**). Otro factor para tomar en cuenta es el precio de los dispositivos, ya que al ser importados su precio puede incrementar hasta 3 más veces de su precio original.

Tabla 3.2: Marcas, masa, medidas, precio, costo y tiempo aproximado para llevar a cabo la síntesis de amplicones de la PCR de algunos dispositivos [31].

Dispositivo	Masa (kg)	Medidas (cm)	Precio lab (US\$)	Tiempo aproximado (min)
Biomark HD de Fluidgim	140	75x75x100	23,000	30
Quantstudio 12k de ThermoFisher	69	74x51x67	39,500	20
Cobas 4800 System	180	167x120x91	45,000	20~30

3.3 Software FEM utilizado y Mallado

Para la realización de las simulaciones se utilizó COMSOL Multiphysics ver. 5.3 (software de análisis FEM). Los modelos de los sistemas capilares con ID de 632.4, 690.8 y 797.5 μm (**Figura 3.1**) se exportaron a este software y se realizó un mallado libre automático “más fino” sobre cada uno de los modelos (**Figura 3.2**). Las propiedades resultantes de cada mallado en función de ID del capilar se encuentran resumidas en la **Tabla 3.3**.

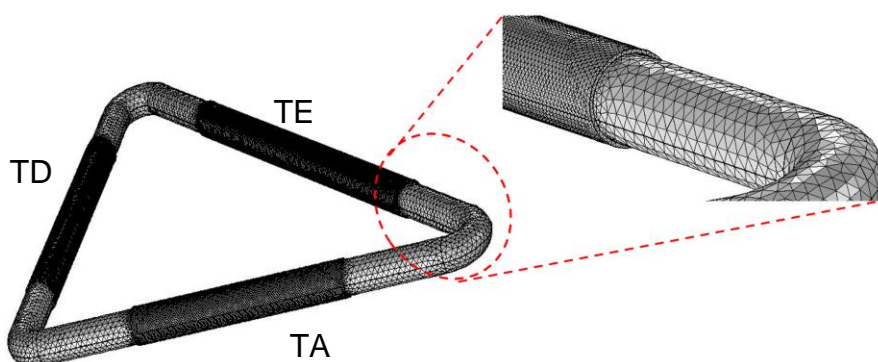


Figura 3.2: Mallado más fino del sistema capilar microfluídico PCR usando COMSOL Multiphysics.

Tabla 3.3: Propiedades del mallado más fino de los distintos capilares correspondientes a diámetros internos diferentes.

Propiedad	Valor		
ID del capilar (μm)	632.4	690.8	797.5
Número de elementos de dominio	428,492	164,770	519,643
Número de elementos de vértice	60	60	60
Número de elementos de borde	3,694	2,136	3,600
Número de elementos de frontera	108,786	33,136	122,760
Número de elementos	411,358	148,873	502,855
Tiempo de mallado libre (s)	11.88	6.14	13.59
Calidad mínima del elemento (ua)	0.1937	0.228	0.1749

Es de notar que el capilar con ID de 690.8 μm presenta un menor número de elementos que los otros dos capilares, esto es debido a la calidad mínima del elemento es más grande que la de los otros dos capilares, esto puede deberse a los recursos del sistema disponibles a la hora de realizar el mallado o que al momento de exportar el modelo CAD del capilar, el software haya realizado algún tipo de modificación (en este trabajo no se usó el software CAD ya integrado en COMSOL).

3.4 Modelos utilizados en la simulación

Las ecuaciones de Navier-Stokes, de continuidad en mecánica de fluidos, transporte de masa y de calor fueron previamente deducidas en el **capítulo 2**. Y de acuerdo con las constricciones impuestas por el software de simulación COMSOL Multiphysics (Ver. 5.3 sin módulo de termodinámica), a las condiciones y simplificaciones utilizadas se deducirá la forma resultante de estas ecuaciones que se utilizaron para la realización de las simulaciones, así como su formulación débil las cuales utiliza el software.

3.4.1 Ecuación de continuidad

La ecuación de continuidad deducida en el **capítulo 2** es,

$$\partial_t \rho(\mathbf{r}, t) + \nabla \cdot (\rho(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t)) = \sum_j Q_j \quad (3.1)$$

Para el cálculo del campo de velocidad en las simulaciones en COMSOL se utilizó un modelo en estado estacionario, esto es $\rho(t) = \text{const}$ y $\mathbf{u}(t) = \text{const}$ ya que $\partial_t \rho(\mathbf{r}, t) = 0$ y $\partial_t \mathbf{u}(\mathbf{r}, t) = 0$. Además, no se considerarán fuentes o sumideros de masa. Con estas consideraciones se obtiene la ecuación de continuidad utilizada para las simulaciones del presente trabajo (3.2).

$$\nabla \cdot (\rho(\mathbf{r}) \mathbf{u}(\mathbf{r})) = 0 \quad (3.2)$$

Además, se consideran paredes rígidas, que el sistema se encuentra en un marco inercial en reposo y la condición de frontera de no deslizamiento en las paredes. La temperatura T_{ref} y presión p_{ref} de referencia corresponden a 24 °C y 1 atm, respectivamente. Como condiciones iniciales se considera al fluido en reposo, la temperatura T_0 y presión p_0 iniciales corresponden a las de referencia. Se consideran cambios de densidad dependientes de la temperatura e independientes de la presión $\rho(T)$.

En los experimentos PCR las disoluciones buffer utilizadas consisten en una disolución acuosa y como soluto se encuentran sales como el cloruro de magnesio (MgCl_2). Comúnmente, estas sales se encuentran en concentraciones de entre 1 a 25 mM. Los demás reactivos necesarios también se encuentran en pequeñas concentraciones en la mayoría de las aplicaciones, tanto que el agua normalmente representa más del 90% de

la disolución (**Tabla 3.4**) [32]. Debido a las pequeñas concentraciones de las sales y de los reactivos, la densidad del fluido apenas varía con respecto a la del agua pura, es por lo que para este trabajo se utilizó como fluido a simular el agua pura.

Tabla 3.4: Protocolo común de la disolución usada en las reacciones PCR. Tomada de [32].

Volumen (μL)	Componente	Concentración final
5	10X PCR Buffer	1X
1	dNTPs (10 mM)	200 (mM)
1-2	Primer P_1	50-100 (pmol)
1-2	Primer reverso P_2	50-100 (pmol)
0.5-1	ADN Taq polimerasa (5U/ μL)	2.5-5 (U)
1-5	Muestra de ADN	1-200 (ng)
1	MgCl_2 (50 mM)	1 (mM)
Variable	Agua	Añadir hasta 50 (μL)
50	Volumen total	

3.4.1.1 Forma débil de la ecuación de continuidad

Para obtener la forma débil de la ecuación de continuidad (3.2) se multiplica esta por una función escalar de prueba w y se integra sobre todo el dominio Ω del sistema a simular (3.3).

$$\iiint_{\Omega} w \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) dV = 0 \quad (3.3)$$

La integral (3.3) se realiza usando la primera identidad de Green [26] (3.4).

$$\iiint_{\Omega} w \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) dV = - \iiint_{\Omega} \rho (\nabla w \cdot \mathbf{u}) dV + \iint_{\partial\Omega} \rho w (\mathbf{u} \cdot \mathbf{n}) dA = 0 \quad (3.4)$$

Donde las integrales de superficie corresponden a los valores en las fronteras. Como se considera la condición de no deslizamiento en las paredes, es decir, la velocidad $\mathbf{u}_{\text{paredes}} = \mathbf{0}$, esto nos deja con la forma débil de la ecuación de continuidad utilizada por COMSOL (3.5).

$$\iiint_{\Omega} \rho (\nabla w \cdot \mathbf{u}) dV = 0 \quad (3.5)$$

3.4.1.2 Discretización de la formulación débil de la ecuación de continuidad

Para obtener la discretización de la formulación débil de la ecuación de continuidad, se sustituye \mathbf{u} y w por funciones pertenecientes a un espacio finito y discreto (3.6) y (3.7) en (3.5), donde j corre de 1 al número total de puntos nodales en el dominio Ω .

$$\mathbf{u} \approx \mathbf{u}^h = \sum_j k_j \phi_j \quad (3.6)$$

$$w \approx w^h = \phi_i \quad (3.7)$$

$$\iiint_{\Omega} \rho \nabla w^h \cdot \mathbf{u}^h dV = 0 \quad (3.8)$$

3.4.2 Ecuaciones de Navier-Stokes

Las ecuaciones de Navier-Stokes (3.9), fueron deducidas en el **capítulo 2**.

$$\nabla \cdot (\mu \nabla \mathbf{u} + \mu \nabla^T \mathbf{u}) - \nabla \cdot \left(\frac{2}{3} \mu I \nabla \cdot \mathbf{u} \right) - \nabla p + \rho(\mathbf{r}, t) \mathbf{g} = \rho(\partial_t \mathbf{u} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u}) \quad (3.9)$$

El sistema PCR por convección requiere de flujos causados por convección natural, la convección es provocada por cambios de densidad, por diferencias de temperatura en el fluido, por lo que es necesario considerar el efecto de la densidad de fuerza de gravedad ($\rho \mathbf{g}$) para que el fluido más denso pueda desplazar al fluido menos denso. Como se mencionó en la sección anterior únicamente se consideran cambios en la densidad del fluido debido a los cambios en la temperatura (se utiliza la presión de referencia de 1atm para el cálculo de la densidad).

Las condiciones y consideraciones utilizadas para la deducción de la ecuación de continuidad se utilizarán para las ecuaciones de Navier-Stokes. Se considera el término inercial nulo $(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} \approx \mathbf{0}$ (3.9) debido a la escala del sistema. Todas estas condiciones nos permiten simplificar con las ecuaciones de Navier-Stokes utilizadas para la realización de las simulaciones.

$$\nabla \cdot (\mu \nabla \mathbf{u} + \mu \nabla^T \mathbf{u}) - \nabla \cdot \left(\frac{2}{3} \mu I \nabla \cdot \mathbf{u} \right) - \nabla p + \rho \mathbf{g} = \mathbf{0} \quad (3.10)$$

3.4.2.1 Forma débil de las ecuaciones de Navier-Stokes

Para obtener las ecuaciones de Navier-Stokes en su forma débil, se multiplica por una función vectorial de prueba \mathbf{w} y se integra sobre todo el dominio Ω del sistema a simular (3.11):

$$\iiint_{\Omega} \left[\nabla \cdot (\mu \nabla \mathbf{u} + \mu \nabla^T \mathbf{u}) - \nabla \cdot \left(\frac{2}{3} \mu I \nabla \cdot \mathbf{u} \right) - \nabla p \right] \cdot \mathbf{w} dV = - \iiint_{\Omega} [\rho \mathbf{g}] \cdot \mathbf{w} dV \quad (3.11)$$

Los 3 primeros términos de la integral de la izquierda de (3.11) se integran utilizando la primera identidad de Green [26], [29] (3.12) a (3.14), obtenemos:

$$\iiint_{\Omega} \{ \nabla \cdot [\mu (\nabla \mathbf{u} + \nabla^T \mathbf{u})] \} \cdot \mathbf{w} dV = - \iiint_{\Omega} \mu [(\nabla \mathbf{u} + \nabla^T \mathbf{u}) : \nabla \mathbf{w}] dV \quad (3.12)$$

$$+ \iint_{\partial \Omega} \mu [(\nabla \mathbf{u} + \nabla^T \mathbf{u}) \cdot \mathbf{n}] \cdot \mathbf{w} dA$$

$$- \iiint_{\Omega} \nabla \cdot \left(\frac{2}{3} \mu I \nabla \cdot \mathbf{u} \right) \cdot \mathbf{w} dV = \iiint_{\Omega} \frac{2}{3} \mu [(I \nabla \cdot \mathbf{u}) : \nabla \mathbf{w}] dV - \iint_{\partial \Omega} \frac{2}{3} \mu [(I \nabla \cdot \mathbf{u}) \cdot \mathbf{n}] \cdot \mathbf{w} dA \quad (3.13)$$

$$- \iiint_{\Omega} \nabla p \cdot \mathbf{w} dV = - \iint_{\partial\Omega} p(\mathbf{w} \cdot \mathbf{n}) dA + \iiint_{\Omega} p \nabla \cdot \mathbf{w} dV \quad (3.14)$$

Sustituyendo las ecuaciones (3.12) a (3.14) en (3.11), llegamos a las ecuaciones de Navier-Stokes en su forma débil

$$\begin{aligned} & - \iint_{\partial\Omega} p(\mathbf{w} \cdot \mathbf{n}) dA + \iiint_{\Omega} p \nabla \cdot \mathbf{w} dV - \iiint_{\Omega} \mu [(\nabla \mathbf{u} + \nabla^T \mathbf{u}) : \nabla \mathbf{w}] dV \\ & + \iint_{\partial\Omega} \mu [(\nabla \mathbf{u} + \nabla^T \mathbf{u}) \cdot \mathbf{n}] \cdot \mathbf{w} dA + \iiint_{\Omega} \frac{2}{3} \mu [(\nabla \cdot \mathbf{u}) : \nabla \mathbf{w}] dV \\ & - \iint_{\partial\Omega} \frac{2}{3} \mu [(\nabla \cdot \mathbf{u}) \cdot \mathbf{n}] \cdot \mathbf{w} dA = - \iiint_{\Omega} \rho(\mathbf{g} \cdot \mathbf{w}) dV \end{aligned} \quad (3.15)$$

Donde las integrales de superficie corresponden a los valores en las fronteras. Como se considera la condición de no deslizamiento en las paredes la velocidad $\mathbf{u}_{\text{paredes}} = \mathbf{0}$, esto nos deja con la forma débil de la ecuación de continuidad utilizada por COMSOL (3.16).

$$\begin{aligned} & - \iint_{\partial\Omega} p(\mathbf{w} \cdot \mathbf{n}) dA + \iiint_{\Omega} p \nabla \cdot \mathbf{w} dV - \iiint_{\Omega} \mu [(\nabla \mathbf{u} + \nabla^T \mathbf{u}) : \nabla \mathbf{w}] dV \\ & + \iiint_{\Omega} \frac{2}{3} \mu [(\nabla \cdot \mathbf{u}) : \nabla \mathbf{w}] dV = - \iiint_{\Omega} \rho(\mathbf{g} \cdot \mathbf{w}) dV \end{aligned} \quad (3.16)$$

3.4.2.2 Discretización de la formulación débil de las ecuaciones de Navier-Stokes

Para obtener la discretización de la formulación débil de las ecuaciones de Navier-Stokes, se sustituye \mathbf{u} , p y \mathbf{w} por funciones pertenecientes a un espacio finito y discreto (3.17) a (3.19) en (3.16) y obtenemos la discretización de la formulación débil de las ecuaciones de Navier-Stokes (3.20), donde j corre de 1 al número total de puntos nodales en el dominio Ω .

$$\mathbf{u} \approx \mathbf{u}^h = \sum_j l_j \Phi_j \quad (3.17)$$

$$p \approx p^h = \sum_j m_j \psi_j \quad (3.18)$$

$$\mathbf{w} \approx \mathbf{w}^h = \Phi_i \quad (3.19)$$

$$\begin{aligned} & - \iint_{\partial\Omega} p^h(\mathbf{w}^h \cdot \mathbf{n}) dA + \iiint_{\Omega} p^h \nabla \cdot \mathbf{w}^h dV - \iiint_{\Omega} \mu [(\nabla \mathbf{u}^h + \nabla^T \mathbf{u}^h) : \nabla \mathbf{w}^h] dV \\ & + \iiint_{\Omega} \frac{2}{3} \mu [(\nabla \cdot \mathbf{u}^h) : \nabla \mathbf{w}^h] dV = - \iiint_{\Omega} \rho(\mathbf{g} \cdot \mathbf{w}^h) dV \end{aligned} \quad (3.20)$$

3.4.3 Ecuación de calor

La ecuación de calor deducida en el **capítulo 2** (3.21).

$$\partial_t[\rho(\mathbf{r}, t)C_p(\mathbf{r})T(\mathbf{r}, t)] - \nabla \cdot (\kappa(\mathbf{r})\nabla T(\mathbf{r}, t)) + \nabla \cdot (\rho(\mathbf{r}, t)C_p(\mathbf{r})T(\mathbf{r}, t)\mathbf{u}(\mathbf{r}, t)) = \sum_j Q_j \quad (3.21)$$

Las condiciones y consideraciones utilizadas para la deducción de la ecuación de continuidad se utilizarán para la ecuación de calor. Además, para el cálculo del campo de temperatura en las simulaciones se utilizó un modelo en estado estacionario, esto es $\partial_t \rho(\mathbf{r}, t) = 0$. COMSOL considera que $C_p(T)$ y $\kappa(\mathbf{r})$ son constantes. Se consideran a los términos de fuentes-sumideros, que corresponden a tres condiciones de frontera isothermas en tres distintas zonas del dispositivo (**Figura 3.1a**) correspondientes a las temperaturas de desnaturalización (TD), extensión (TE) y alineación (TA) del sistema PCR. Por lo que los valores de Q_j son nulos en todo el dispositivo a excepción de las tres fronteras isothermas ya mencionadas, donde COMSOL se encarga de definir estas funciones en las tres zonas ya mencionadas (**Tabla 3.1**). Estas consideraciones nos permiten simplificar la ecuación de calor (3.22).

$$-\kappa \nabla^2 T(\mathbf{r}) + \nabla \cdot (\rho(\mathbf{r})C_p T(\mathbf{r})\mathbf{u}(\mathbf{r})) = \sum_j Q_j \quad (3.22)$$

La ecuación de continuidad (3.2) nos permite calcular el segundo término de la ecuación de calor (3.22).

$$\begin{aligned} \nabla \cdot (\rho(\mathbf{r})C_p T(\mathbf{r})\mathbf{u}(\mathbf{r})) &= C_p T(\mathbf{r})\nabla \cdot (\rho(\mathbf{r})\mathbf{u}(\mathbf{r})) + \rho(\mathbf{r})\mathbf{u}(\mathbf{r}) \cdot \nabla (C_p T(\mathbf{r})) \\ &= \rho(\mathbf{r})\mathbf{u}(\mathbf{r}) \cdot \nabla (C_p T(\mathbf{r})) \end{aligned} \quad (3.23)$$

Sustituyendo (3.23) en (3.22) se obtiene la ecuación de transporte de calor utilizada en las simulaciones (3.24).

$$-\kappa \nabla^2 T(\mathbf{r}) + C_p \rho(\mathbf{r})\mathbf{u}(\mathbf{r}) \cdot \nabla (T(\mathbf{r})) = \sum_j Q_j \quad (3.24)$$

La ecuación de calor (3.24) y los términos de densidades de fuerzas debidas a la presión ($-\nabla \cdot (p\mathbf{I})$) y a la gravedad ($\rho\mathbf{g}$) de las ecuaciones de Navier-Stokes (3.10) son las que determinan la dirección en la que circulará el fluido. Esto es debido a que las fronteras de temperatura isothermas obligan a que la distribución de temperatura en el fluido varíe en el espacio (dominio del fluido, **Figura 3.1b**), COMSOL calcula la densidad del agua en cada una de esas zonas del espacio (utiliza un modelo interno dependiente de la temperatura), estas diferencias de densidad provocan que el fluido se desplace ya que por efecto de la fuerza de gravedad, el fluido más denso va a ejercer una presión mayor

sobre el fluido menos denso y esto va a obligar a que se generen flujos de convección natural, estos mismos flujos también contribuyen a la distribución de temperaturas.

3.4.3.1 Forma débil de la ecuación de calor

Para obtener la ecuación de calor en su forma débil, se multiplica por una función de prueba w y se integra sobre todo el dominio Ω del sistema a simular (3.25).

$$\iiint_{\Omega} [-\kappa \nabla^2 T + C_p \rho \mathbf{u} \cdot \nabla(T)] w dV = \iiint_{\Omega} [\sum_j Q_j] w dV \quad (3.25)$$

El segundo término se integra recordando que $\mathbf{J}_{dif} = -\kappa \nabla T$ y se utiliza la primera identidad de Green [26] para obtener (3.26):

$$\iiint_{\Omega} w \nabla \cdot \mathbf{J}_{dif} dV = - \iiint_{\Omega} \nabla w \cdot \mathbf{J}_{dif} dV + \iint_{\partial\Omega} w \mathbf{J}_{dif} \cdot \mathbf{n} dA \quad (3.26)$$

Sustituyendo (3.26) en (3.25) obtenemos la forma débil de la ecuación de calor (3.27).

$$\iiint_{\Omega} w \rho C_p (\mathbf{u} \cdot \nabla T) dV + \iiint_{\Omega} \kappa (\nabla w \cdot \nabla T) dV - \iint_{\partial\Omega} \kappa w (\nabla T \cdot \mathbf{n}) dA = \iiint_{\Omega} w \sum_j Q_j dV \quad (3.27)$$

Donde las integrales de superficie corresponden a los valores en las fronteras.

3.4.3.2 Discretización de la ecuación de calor

Ahora se sustituye T y w por funciones pertenecientes a un espacio finito y discreto (3.28) y (3.29) en (3.27).

$$T \approx T^h = \sum_j k_j \phi_j \quad (3.28)$$

$$w \approx w^h = \phi_i \quad (3.29)$$

$$\begin{aligned} \iiint_{\Omega} w^h \rho C_p (\mathbf{u} \cdot \nabla T^h) dV + \iiint_{\Omega} \kappa (\nabla w^h \cdot \nabla T^h) dV - \iint_{\partial\Omega} \kappa w^h (\nabla T^h \cdot \mathbf{n}) dA \\ = \iiint_{\Omega} w^h \sum_j Q_j dV \end{aligned} \quad (3.30)$$

esto nos deja con un sistema de ecuaciones de la siguiente forma (3.31) a (3.34), donde los subíndices i y j corren de 1 al número total de puntos nodales en el dominio Ω

$$A \mathbf{k} = \mathbf{f} \quad (3.31)$$

donde

$$A_{ij} = \iiint_{\Omega} \phi_i \rho C_p (\mathbf{u} \cdot \nabla \phi_j) dV + \iiint_{\Omega} \kappa (\nabla \phi_i \cdot \nabla \phi_j) dV - \iint_{\partial\Omega} \kappa \phi_i (\nabla \phi_j \cdot \mathbf{n}) dA \quad (3.32)$$

$$f_i = \iiint_{\Omega} \phi_i \sum_j Q_j dV \quad (3.33)$$

$$\mathbf{k} = (k_1 \ k_2 \ k_3 \ \dots)^T \quad (3.34)$$

3.5 Modelo de Transporte de Especies Diluidas

La ecuación de transporte de especies fue deducida en el **capítulo 2** (3.35).

$$\partial_t c_i(\mathbf{r}, t) - \nabla \cdot (D_i \nabla c_i(\mathbf{r}, t)) + \nabla \cdot (c_i(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t)) = \sum_j Q_j \quad (3.35)$$

Los subíndices i representan las diferentes especies químicas que se utilizaron para las simulaciones (**Tabla 3.5**). Las propiedades de las especies como la concentración molar inicial (M) y el coeficiente de difusividad D_i [23] se muestran en la **Tabla 3.5**.

El software COMSOL realiza una simplificación de la ecuación de transporte de especies (3.35), donde asume que el campo de velocidad \mathbf{u} es incompresible (3.36), esto nos deja con la ecuación (3.37) para el término $\nabla \cdot (c_i(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r}, t))$ y la ecuación resultante para el transporte de especies químicas (3.38).

$$\nabla \cdot (\mathbf{u}(\mathbf{r})) = 0 \quad (3.36)$$

$$\nabla \cdot (c_i(\mathbf{r}, t) \mathbf{u}(\mathbf{r})) = c_i(\mathbf{r}, t) \nabla \cdot (\mathbf{u}(\mathbf{r})) + \mathbf{u}(\mathbf{r}) \cdot \nabla c_i(\mathbf{r}, t) = \mathbf{u}(\mathbf{r}) \cdot \nabla c_i(\mathbf{r}, t) \quad (3.37)$$

$$\partial_t c_i(\mathbf{r}, t) - D_i \nabla^2 c_i(\mathbf{r}, t) + \mathbf{u}(\mathbf{r}) \cdot \nabla c_i(\mathbf{r}, t) = \sum_j Q_j \quad (3.38)$$

Las fuentes y sumideros de las especies químicas Q_j son causados por reacciones químicas, estas funciones son calculadas automáticamente con base al modelo de cinética de reacciones PCR que se le suministre a COMSOL (**sección 2.6**). La ecuación de transporte de especies (3.38) describe como cambia el campo de concentración para cada especie química ($S_1 S_2$, S_1 y S_2 , P_1 y P_2 , y $S_1 P_2$ y $S_2 P_1$) a través del tiempo.

Tabla 3.5: Parámetros de las especies químicas ($S_1 S_2$, S_1 y S_2 , P_1 y P_2 , y $S_1 P_2$ y $S_2 P_1$) y sus coeficientes de difusividad tomados de la referencia [23].

Especies	Parámetros	
	Coeficiente de Difusividad D_i ($m^2 s^{-1}$)	Concentración c_i inicial (M)
S_1 y S_2	$1e^9$	0
P_1 y P_2	$1e^{10}$	$3e^{-5}$
$S_1 P_2$ y $S_2 P_1$	$1e^{10}$	0
$S_1 S_2$	$1e^{10}$	$5.71e^{-10}$

3.5.1 Forma débil de la ecuación de transporte de especies diluidas

Para obtener la forma débil de la ecuación de transporte de especies simplificada (3.38), se multiplica por una función de prueba w y se integra sobre todo el dominio Ω del sistema a simular (3.39), donde hemos ignorado el subíndice i para simplificar la notación (recordando que esta ecuación se aplica para cada una de las especies químicas):

$$\iiint_{\Omega} [\partial_t c - D \nabla^2 c + \mathbf{u} \cdot \nabla c] w dV = \iiint_{\Omega} [\sum_j Q_j] w dV \quad (3.39)$$

El tercer término del lado izquierdo se integra recordando que el vector de concentración molar de difusión es $\mathbf{J}_{dif} = -D \nabla c$ y aplicando la primera identidad de Green [26] para obtener (3.40):

$$\iiint_{\Omega} w \nabla \cdot \mathbf{J}_{dif} dV = - \iiint_{\Omega} \nabla w \cdot \mathbf{J}_{dif} dV + \iint_{\partial \Omega} w \mathbf{J}_{dif} \cdot \mathbf{n} dA \quad (3.40)$$

Sustituyendo (3.40) en (3.39) obtenemos la forma débil de la ecuación para el transporte de especies diluidas (3.41).

$$\begin{aligned} \iiint_{\Omega} w [\partial_t c] dV + \iiint_{\Omega} w (\mathbf{u} \cdot \nabla c) dV + \iiint_{\Omega} D (\nabla w \cdot \nabla c) dV - \iint_{\partial \Omega} D w (\nabla c \cdot \mathbf{n}) dA \\ = \iiint_{\Omega} w \sum_j Q_j dV \end{aligned} \quad (3.41)$$

donde las integrales de superficie corresponden a los valores en las fronteras.

3.5.2 Discretización de la ecuación de transporte de especies diluidas

Ahora se sustituye c y w por funciones pertenecientes a un espacio finito y discreto,

$$c \approx c^h = \sum_j k_j(t) \phi_j \quad (3.42)$$

$$w \approx w^h = \phi_i \quad (3.43)$$

Sustituyendo (3.42) y (3.43) en (3.41) obtenemos la discretización de transporte de especies diluidas

$$\begin{aligned} \iiint_{\Omega} w^h [\partial_t c^h] dV + \iiint_{\Omega} w^h (\mathbf{u} \cdot \nabla c^h) dV + \iiint_{\Omega} D (\nabla w^h \cdot \nabla c^h) dV \\ - \iint_{\partial \Omega} D w^h (\nabla c^h \cdot \mathbf{n}) dA = \iiint_{\Omega} w^h \sum_{j'} Q_{j'} dV \end{aligned} \quad (3.44)$$

Dado que los coeficientes de k_j dependen del tiempo [29] (3.42), la Ec. (3.44) se expresa como (3.45).

$$\sum_j k_j'(t) \iiint_{\Omega} \phi_i \phi_j dV + \sum_j k_j(t) \iiint_{\Omega} \phi_i (\mathbf{u} \cdot \nabla \phi_j) dV + \sum_j k_j(t) \iiint_{\Omega} D(\nabla \phi_i \cdot \nabla \phi_j) dV \quad (3.45)$$

$$- \sum_j k_j(t) \iint_{\partial\Omega} D\phi_i (\nabla \phi_j \cdot \mathbf{n}) dA = \iiint_{\Omega} \phi_i \sum_{j'} Q_{j'} dV$$

La Ec. (3.44) se aproxima también usando la derivada temporal como el cociente de una diferencia finita, esto nos deja con la ecuación (3.46), donde c_n es la aproximación de c en un tiempo t_n .

$$\iiint_{\Omega} w^h \frac{c_n^h - c_{n-1}^h}{\Delta t} dV + \iiint_{\Omega} w^h (\mathbf{u} \cdot \nabla c_n^h) dV + \iiint_{\Omega} D(\nabla w^h \cdot \nabla c_n^h) dV \quad (3.46)$$

$$- \iint_{\partial\Omega} D w^h (\nabla c_n^h \cdot \mathbf{n}) dA = \iiint_{\Omega} w^h \sum_j Q_j dV$$

Combinando (3.45) y (3.46) obtenemos el siguiente sistema de ecuaciones (3.47) donde los subíndices i y j corren de 1 al número total de puntos nodales en el dominio Ω .

$$\begin{aligned} & \sum_j k_j(t_n) \iiint_{\Omega} \phi_i \frac{\phi_j}{\Delta t} dV + \sum_j k_j(t_n) \iiint_{\Omega} \phi_i (\mathbf{u} \cdot \nabla \phi_j) dV \quad (3.47) \\ & + \sum_j k_j(t_n) \iiint_{\Omega} D(\nabla \phi_i \cdot \nabla \phi_j) dV - \sum_j k_j(t_n) \iint_{\partial\Omega} D\phi_i (\nabla \phi_j \cdot \mathbf{n}) dA \\ & = \iiint_{\Omega} \phi_i \sum_{j'} Q_{j'} dV + \sum_j k_j(t_{n-1}) \iiint_{\Omega} \phi_i \frac{\phi_j}{\Delta t} dV \end{aligned}$$

3.6 Análisis de Elementos Finitos (Simulación)

Para el análisis de elementos finitos de los sistemas de tubos capilares se utilizó el software COMSOL Multiphysics (la versión 5.3 sin el módulo de termodinámica). Los modelos CAD de los capilares (**Figura 3.1**) fueron exportados a COMSOL con el módulo LiveLink for AutoCAD y se realizó un mallado “más fino” sobre estos (**sección 3.3**).

Se utilizaron los módulos de Flujo Rastrero y de Transferencia de Calor en Fluidos, estos fueron acoplados con el módulo multi-física de Flujo No-Isotermo, se configuraron los módulos con las ecuaciones (3.2), (3.10) y (3.24) y condiciones ya vistas en esta sección y se realizó un estudio “estacionario” con estos módulos. Un Barrido Paramétrico fue configurado para correr múltiples simulaciones variando la temperatura de las condiciones de frontera isotermas (**sección 3.1**) en cada nueva simulación para cada uno de los capilares.

Se configuraron 2 “sondas” que calculan la velocidad V_{PR}OM y temperatura T_{PR}OM promedio del fluido para cada simulación, estos datos fueron guardados en archivos CSV para cada uno de los capilares. El estudio “estacionario” calcula las siguientes variables de interés: el campo de velocidades y temperaturas en el fluido.

Se utilizaron los módulos de Química y de Transporte de Especies Diluidas, se configuraron los módulos con las condiciones y ecuaciones (3.36) a (2.50) y (3.38) ya vistas en esta sección y la anterior (**sección 2.6**), fueron acoplados y se realizó un estudio “dependiente del tiempo” utilizando el campo de velocidades y temperaturas en el fluido calculados en el estudio estacionario.

Las simulaciones se realizaron para cada una de las combinaciones de los parámetros de operación TD, TA, TE e ID de los capilares (**sección 3.1**) y el tiempo de simulación se definió de 0 a 60 minutos con pasos en el tiempo de 1 minuto.

Se configuraron 7 “sondas” que calculan la concentración promedio de las 7 distintas especies químicas (S_1S_2 , S_1 y S_2 , P_1 y P_2 , y S_1P_2 y S_2P_1) durante todo el tiempo de simulación, para cada una de las 81 simulaciones, estos datos fueron guardados en archivos CSV. La variable de interés que calcula el estudio dependiente del tiempo es la concentración de las cadenas bicatenarias a través del tiempo.

Los grados de libertad generados para cada capilar ID se muestran en la **Tabla 3.6** el número de grados de libertad corresponden a las variables ID de 632.4, 690.8 y 797.5 μm . En general, mientras más fino es el mallado, más puntos nodales habrá para los cuales se encuentre la solución “exacta”.

Tabla 3.6: Número de grados de libertad resueltos para cada uno de los capilares de diámetro interno ID distinto.

Estudio	ID Capilar (μm)					
	632.4		690.8		797.5	
	Estacionario	Dependiente del tiempo	Estacionario	Dependiente del tiempo	Estacionario	Dependiente del tiempo
Grados de libertad	209,312	207,445	144,322	189,651	226,013	207,165
Grados de libertad internos	89,078	67,263	31,052	61,775	98,871	65,107

Las simulaciones fueron separadas en dos tipos de estudios por tres razones principales: 1) por la escala del sistema, 2) ahorrar recursos computacionales y 3) para realizar de forma más rápida las simulaciones. Si se realiza un estudio dependiente del tiempo con todos los módulos acoplados, debido a la escala del sistema, la distribución de temperaturas dejará de variar a través del tiempo (en consecuencia, el campo de

velocidades del fluido deja de variar) en un período bastante corto, entre 1 a 3 minutos de tiempo de simulación, por lo que se utilizaría tiempo y recursos computacionales calculando las mismas cantidades múltiples veces (considerando que no se toman en cuenta cambios en la densidad del fluido por la concentración de las especies).

El proceso general de simulación mediante FEM en COMSOL de un sistema microfluídico PCR consiste en los siguientes pasos (ver **Apéndice 2**):

1. Se diseñó en AutoCad los sistemas PCR capilares con diferentes diámetros internos ($ID = 632, 690$ y $797 \mu\text{m}$). Se exportaron a COMSOL 5.3 y se seleccionaron los dominios correspondientes (fluido y frontera).
2. Se realizó un mallado “más fino” y se configuró COMSOL con los modelos matemáticos (2.36) a (2.50), (3.2), (3.10), (3.24) y (3.38) y condiciones iniciales.
3. Se realizó un “estudio estacionario” donde se calculó los campos de temperatura y velocidad en el dispositivo y la VPRM y TPRM del fluido.
4. Se realizó un estudio “dependiente del tiempo” donde se calculó las reacciones PCR a través del tiempo utilizando los resultados del estudio estacionario.
5. Se calcularon distintas variables de interés: 1) Slope-Log-dsDNA: pendiente del logaritmo de la concentración normalizada de S_1S_2 durante la fase exponencial. 2) EXPTIME: tiempo que le llevó a la fase exponencial finalizar. 3) RTIME: Fase que le llevó a la fase lineal finalizar.
6. Comprobar gráficamente la relación existente entre las distintas variables de interés. Se calculó la curtosis y sesgo de estas variables y se graficaron histogramas de estas. Se escogió como respuesta del sistema la variable con un mayor parecido a una distribución constante.
7. Se realizaron 2 análisis gráfico: a) VPRM vs TD, TA, TE, ID, (TD-TA), (TE-TA), (TD-TE), (TD-TA)/(TE-TA) y TPRM. b) EXPTIME vs TD, TA, TE, ID, (TD-TA), (TE-TA), (TD-TE), (TD-TA)/(TE-TA), VPRM y TPRM.
8. Los datos fueron estandarizados y se realizaron 3 regresiones lineales: a) EXPTIME vs TD, TA, TE e ID b) EXPTIME vs (TD-TA), (TE-TA) e ID; y c) EXPTIME vs VPRM.
9. Se validaron los modelos mediante validación cruzada de 4 iteraciones y con distintas gráficas de distribución de residuos.

3.7 Procesamiento de los Resultados de las Simulaciones

Es de esperar que el comportamiento de la concentración a través del tiempo de todas las simulaciones sea igual o similar al presentado por el incremento de la intensidad de la fluorescencia en las pruebas qPCR (**Figura 1.5**), teniendo en cuenta esto, existen diferentes variables de interés (respuestas del sistema) que se pueden obtener de las simulaciones.

Las diferentes variables de interés que se pueden obtener de las simulaciones son:

- **EXPTIME.** Es el tiempo que le toma a las reacciones PCR generar amplicones y finalizar la fase exponencial: Esta es la fase en que más rápido se dan las reacciones, esto significa que mientras más rápido se den las reacciones, más rápido debería terminar la fase exponencial y las demás fases, hasta que las reacciones se detengan.
- **Slope – Log – dsDNA.** Representa la pendiente del logaritmo de la concentración normalizada de las cadenas bicatenarias durante la fase exponencial. El logaritmo de la concentración normalizada de la fase exponencial presenta un comportamiento lineal y mientras más rápido se den las reacciones, mayor será la pendiente de la recta.
- **RTIME.** Es el tiempo que le toma a las reacciones PCR finalizar la fase lineal. El momento en el que finaliza la fase lineal es el momento en el que empieza la fase de meseta (la fase de meseta carece de importancia debido a que las reacciones decaen rápidamente hasta parar). Así que podemos considerar que las reacciones han terminado y mientras más rápido se hayan dado las reacciones, menor será el tiempo en que estas finalicen.

Las variables de interés EXPTIME, Slope – Log – dsDNA y RTIME se escogieron para medir la eficiencia de las reacciones, debido a que al tratarse de simulaciones, el comportamiento a través del tiempo de la concentración es ideal, si se buscara calcular la eficiencia de las formas tradicionales, se multiplicaría varias veces el número de simulaciones por realizar (usando el método de curvas estándar) o no sería lo mejor, debido al mismo comportamiento ideal de las simulaciones (método Delta-Delta-CT).

Las distintas variables de interés se desprenden de la concentración de S_1S_2 , esto debido a que, por un constante proceso de desnaturalización y renaturalización, la concentración de S_1 y S_2 es proporcional a la de S_1S_2 , además las concentraciones de S_1 y S_2 son idénticas a lo largo del tiempo.

Las variables EXPTIME, Slope – Log – dsDNA y RTIME se calcularon usando el lenguaje de programación Python y las librerías NumPy, Pandas, StatsModels y Matplotlib. Específicamente, la variable de interés Slope – Log – dsDNA fue calculada mediante el uso de regresión lineal con la librería StatsModels utilizando la función statsmodels.OLS (ver **Apéndice 3**).

También se calcularon las diferencias de temperatura (TD – TA), (TD – TE) y (TE – TA) y las razones entre estas temperaturas correspondientes a cada simulación.

3.8 Selección de la Variable de Respuesta

Al existir varias variables de interés EXPTIME, Slope – Log – dsDNA y RTIME (**sección 3.7**) para medir la eficiencia del sistema se tiene que escoger una, para su posterior análisis. Para escoger la variable de interés del sistema (respuesta del sistema) primero

se realizó un análisis gráfico entre las distintas variables de respuesta, para mostrar la relación que existe entre estas, posteriormente, con base en la distribución con la que aparecen las variables de interés, se escogió una (la distribución escogida debe tener un sesgo ~ 0 y curtosis ~ 3).

El análisis gráfico realizado con las variables de interés fue realizado con el lenguaje de programación Python y las librerías Matplotlib, Seaborn y Pandas. Los histogramas se realizaron con la función `seaborn.histplot`, los gráficos de dispersión junto con sus líneas de tendencia se hicieron con la función `seaborn.regplot` (**Apéndice 4**).

3.9 Análisis Exploratorio de Datos (AED)

Se realizaron 2 análisis gráficos:

- Análisis gráfico 1: Se analizó los gráficos generados de la variable de interés elegida contra los distintos parámetros de operación, diferencias entre las temperaturas, razones entre las diferencias de temperaturas, VPRM y TPRM.
- Análisis gráfico 2: Se analizó los gráficos generados de la variable VPRM contra los distintos parámetros de operación, diferencias entre las temperaturas, razones entre las diferencias de temperaturas y TPRM.

Los análisis gráficos fueron realizados con el lenguaje de programación Python y las librerías Matplotlib, Seaborn y Pandas. Los gráficos de dispersión junto con sus líneas de tendencia se hicieron con la función `seaborn.regplot` (**Apéndice 4**).

3.10 Teoría de Análisis de Regresión Lineal

La regresión lineal es un modelo de análisis matemático usado para aproximar la relación entre la respuesta de un sistema (variable dependiente) y n predictores (variables independientes). En (3.48) se muestra la ecuación del modelo lineal donde \mathbf{Y} y ϵ son vectores aleatorios, X es una matriz con constantes definidas y β es un vector de parámetros por ser estimados. Se asume que los errores ϵ_i deben tener una distribución normal centrada en 0 y varianza constante $N(0, \sigma^2)$ [33].

$$\mathbf{Y} = X\beta + \epsilon \quad (3.48)$$

Las ecuaciones normales de un modelo lineal se muestran en la (3.49) (se tomó el valor esperado de 3.46) y al ser β el vector de parámetros a estimar podemos observar que el producto de matrices $X'X$ debe ser invertible, en donde X' es la transpuesta de la matriz, para ello las columnas de este producto deben ser linealmente independientes.

$$X'X\beta = X'Y \quad (3.49)$$

Donde β está definido como.

$$\beta = (X'X)^{-1}(X'Y) \quad (3.50)$$

La magnitud de los coeficientes β_i indican el impacto o peso de cada predictor en la respuesta de un sistema, mientras mayor sea la magnitud de β_i mayor será el impacto de la variable. El signo de los coeficientes β_i indica si la correlación entre la respuesta del sistema es positiva (signo +) o negativa (signo -).

3.10.1 Análisis de Regresión Lineal

Se realizaron 3 regresiones lineales:

- Regresión 1: Se realizó un análisis de regresión lineal entre la variable de interés elegida y los distintos parámetros de operación.
- Regresión 2: Se realizó un análisis de regresión lineal entre la variable de interés elegida y las diferencias de temperaturas.
- Regresión 3: Se realizó un análisis de regresión lineal entre la variable de interés elegida y VPR0M.

La razón por la cual se separaron las regresiones de esta forma es para medir el impacto de cada una de las variables en la respuesta del sistema y para evitar el problema de la multicolinealidad [33]. Para los análisis de regresión se estandarizaron los datos para evitar que algunos parámetros tengan más peso que otros, se estandarizaron con la función `sklearn.preprocessing.StandardScaler` (**Apéndice 5**).

Los análisis de regresión lineal fueron realizados con el lenguaje de programación Python y las librerías Matplotlib, Seaborn, Pandas, Numpy y Scikit-Learn. Las regresiones se realizaron utilizando la función `sklearn.linear_model.LinearRegression` (**Apéndice 5**). La validación de las regresiones se realizó mediante el método de validación cruzada de 4 iteraciones con una semilla = 12345 usando las funciones `sklearn.model_selection.KFold` y `sklearn.model_selection.cross_val_score` (**Apéndice 5**). Los gráficos de residuales y su distribución se realizaron con las funciones `seaborn.histplot`, `statsmodels.graphics.gofplots.ProbPlot` y `seaborn.scatterplot` (**Apéndice 5**).

Capítulo 4

Resultados y Discusión

En este capítulo se muestran y discuten los resultados obtenidos por las simulaciones mediante el análisis gráfico de estas y los resultados de los análisis de regresión lineal. Se analiza y mide el impacto de distintos factores en la eficiencia de las reacciones PCR.

4.1 Simulación

La implementación numérica de FEM en COMSOL Multiphysics permite predecir los gradientes de temperatura que se forman en sistemas de convección natural, y como estos impactan en la velocidad del fluido y la rapidez con la que se dan las distintas reacciones químicas de la PCR a lo largo del tiempo. Esta metodología se puede aplicar a cualquier otra geometría (**Figura 4.1**) donde se muestra el perfil de velocidades calculado para un circuito cuadrado (8 mm de largo y ancho e ID=100 μm) y donde se registra un máximo de velocidad de 0.15 mm/s en el centro del tubo capilar.

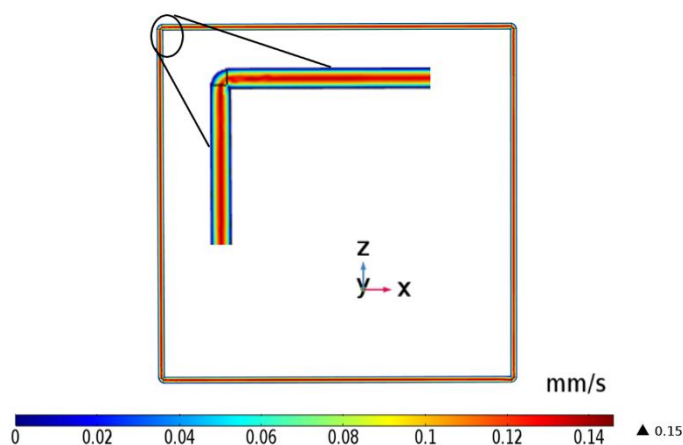


Figura 4.1: Ejemplo del cálculo del perfil de velocidades en una geometría cuadrada (8 mm de largo y ancho e ID=100 μm), se registró una velocidad máxima de 0.15 mm/s en el centro del tubo capilar.

En nuestro caso el sistema PCR microfluídico a simular en COMSOL consiste en tubos capilares que forman un circuito cerrado triangular. En total se realizaron 81 simulaciones variando los distintos parámetros de operación TD, TA, TE e ID, de las 81 simulaciones solo 50 convergieron. Los parámetros y resultados obtenidos VPROM, TPROM, Slope-Log-dsDNA (SLOPE), EXPTIME, RTIME y concentración de las cadenas monocatenarias S_1 y S_2 (C y C_{S_2} , respectivamente) por las simulaciones que convergieron se resumen en la **Tabla 4.1**. En general, todos los estudios estacionarios convergieron

(sección 3.6). Mientras que, el problema se presentó en los estudios dependientes del tiempo (sección 3.6) donde en algún punto de la simulación la concentración de alguna de las especies químicas se volvía negativa (algo imposible) y tendían hacia $-\infty$ (ver Apéndice 6). Este comportamiento divergente de la concentración en algunas simulaciones se puede deber a que el paso en el tiempo o el tamaño del mallado debería de ser más pequeño o algún error interno en los cálculos de COMSOL.

Tabla 4.1: Parámetros TD, TA, TE e ID y resultados VPROM, TPROM, SLOPE, EXPTIME, RTIME y concentración de las cadenas monocatenarias S_1 y S_2 (C_{S1} y C_{S2}) de las simulaciones del sistema PCR que convergieron.

SIM	TD (°C)	TA (°C)	TE (°C)	ID (μm)	VPROM (mm/s)	TPROM (°C)	SLOPE (1/min)	EXPTIME (min)	RTIME (min)	C_{S1} y C_{S2} (M) e-05 a 30min.
Sim 2	92	55	70	690.8	0.928	72.131	0.174	21.463	28.831	2.31
Sim 3	92	55	70	797.5	1.248	72.127	0.216	15.622	22.975	2.42
Sim 5	92	55	72	690.8	1	72.91	0.195	18.783	24.876	2.42
Sim 6	92	55	72	797.5	1.341	72.906	0.229	16.527	22.89	2.51
Sim 7	92	55	74	632.4	0.901	73.688	0.204	17.83	23.981	2.51
Sim 8	92	55	74	690.8	1.074	73.69	0.226	16.52	22.971	2.55
Sim 12	92	60	70	797.5	1.018	73.652	0.185	18.787	26.873	2.35
Sim 15	92	60	72	797.5	1.114	74.432	0.203	18.382	25.979	2.46
Sim 17	92	60	74	690.8	0.903	75.216	0.203	18.747	24.877	2.52
Sim 18	92	60	74	797.5	1.212	75.212	0.231	15.718	22.818	2.58
Sim 19	92	65	70	632.4	0.447	75.18	0.13	27.209	45.565	0.49
Sim 20	92	65	70	690.8	0.545	75.182	0.135	25.936	41.994	0.87
Sim 22	92	65	72	632.4	0.518	75.96	0.131	25.264	42.668	1.20
Sim 23	92	65	72	690.8	0.625	75.962	0.137	26.861	42.653	1.31
Sim 25	92	65	74	632.4	0.587	76.74	0.136	27.281	42.755	1.14
Sim 30	95	55	70	797.5	1.328	73.041	0.243	13.717	20.963	2.45
Sim 32	95	55	72	690.8	1.059	73.826	0.2	17.577	24.964	2.44
Sim 33	95	55	72	797.5	1.423	73.821	0.266	14.617	20.922	2.53
Sim 34	95	55	74	632.4	0.95	74.603	0.22	15.655	21.892	2.53
Sim 35	95	55	74	690.8	1.134	74.605	0.251	14.591	20.892	2.57
Sim 39	95	60	70	797.5	1.098	74.567	0.201	19.671	26.998	2.38
Sim 42	95	60	72	797.5	1.196	75.347	0.207	16.776	23.791	2.48
Sim 45	95	60	74	797.5	1.295	76.127	0.254	13.966	20.901	2.60
Sim 46	95	65	70	632.4	0.495	76.096	0.138	22.765	40.884	1.32
Sim 47	95	65	70	690.8	0.602	76.098	0.142	26.11	40.823	1.17
Sim 48	95	65	70	797.5	0.829	76.093	0.16	21.347	35.813	1.88
Sim 49	95	65	72	632.4	0.565	76.876	0.132	26.518	41.72	1.23
Sim 50	95	65	72	690.8	0.683	76.877	0.146	24.497	41.806	1.37
Sim 51	95	65	72	797.5	0.931	76.873	0.17	21.701	36.567	1.89
Sim 52	95	65	74	632.4	0.635	77.655	0.139	24.77	39.844	1.78
Sim 53	95	65	74	690.8	0.763	77.657	0.15	26.562	39.795	1.72
Sim 57	98	55	70	797.5	1.411	73.956	0.226	15.947	21.864	2.47
Sim 59	98	55	72	690.8	1.12	74.741	0.204	18.733	24.856	2.46
Sim 60	98	55	72	797.5	1.508	74.736	0.251	12.917	19.986	2.55

Sim 61	98	55	74	632.4	1.001	75.518	0.215	16.713	22.981	2.54
Sim 62	98	55	74	690.8	1.196	75.52	0.238	14.491	20.88	2.58
Sim 63	98	55	74	797.5	1.606	75.516	0.282	13.756	18.998	2.65
Sim 64	98	60	70	632.4	0.722	75.485	0.15	24.592	32.849	1.86
Sim 66	98	60	70	797.5	1.182	75.481	0.212	17.886	25.82	2.41
Sim 69	98	60	72	797.5	1.281	76.262	0.217	15.787	23.867	2.50
Sim 72	98	60	74	797.5	1.381	77.042	0.245	13.784	20.995	2.62
Sim 73	98	65	70	632.4	0.544	77.011	0.135	25.489	41.428	1.23
Sim 74	98	65	70	690.8	0.662	77.013	0.153	24.586	41.596	1.08
Sim 75	98	65	70	797.5	0.912	77.007	0.177	20.846	34.946	1.95
Sim 76	98	65	72	632.4	0.615	77.791	0.14	24.512	41.656	1.57
Sim 77	98	65	72	690.8	0.743	77.793	0.15	21.913	36.409	2.03
Sim 78	98	65	72	797.5	1.016	77.787	0.167	21.592	37.828	1.78
Sim 79	98	65	74	632.4	0.686	78.57	0.148	22.29	37.499	2.07
Sim 80	98	65	74	690.8	0.825	78.572	0.147	26.648	39.512	1.65
Sim 81	98	65	74	797.5	1.12	78.568	0.161	21.626	33.887	2.32

En la **Tabla 4.2** se muestran los promedios de las distintas variables de la **Tabla 4.1** de acuerdo con los distintos diámetros internos del capilar. Podemos fácilmente observar que mientras mayor es el diámetro del capilar mayor es la velocidad del fluido y más rápido se están dando las reacciones químicas caracterizada por las variables SLOPE, EXPTIME y RTIME, esto a su vez se traduce en una mayor concentración de cadenas monocatenarias (S_1 y S_2) (o bicatenarias S_1S_2) para un tiempo dado.

Tabla 4.2: Promedios de distintas variables: VPROM, SLOPE EXPTIME, RTIME y concentración de las cadenas monocatenarias (C_{S1} y C_{S2}) de la **Tabla 4.1**.

ID (μm)	Promedio (VPROM)	Promedio (SLOPE)	Promedio (EXPTIME)	Promedio (RTIME)	Promedio C_{S1} y C_{S2} (M) e-05 a 30min.
632.4	0.66	0.15	23.14	36.59	1.65
690.8	0.86	0.17	21.50	32.35	1.94
797.5	1.21	0.21	17.18	25.98	2.37

La **Figura 4.2** y la **Figura 4.3** muestran un ejemplo del perfil de velocidades y la distribución de temperaturas, respectivamente generado por la implementación en COMSOL para el sistema capilar PCR, para la simulación del sistema 78 (SIM 78) con parámetros $TD = 98\text{ }^\circ\text{C}$, $TA = 65\text{ }^\circ\text{C}$, $TA = 74\text{ }^\circ\text{C}$ e $ID = 797.5\text{ }\mu\text{m}$. En el perfil de velocidades (**Figura 4.2**) se aprecia que se cumple la condición de no deslizamiento en las fronteras (región azul), el comportamiento de la velocidad es similar al parabólico (esto se cumple para todas las simulaciones) y se alcanzó una velocidad máxima de ~ 2.5 mm/s en el centro del capilar. En la distribución de temperaturas (**Figura 4.3**) se aprecia la dirección en la que circula el fluido es en sentido anti-horario, por lo que las diferentes especies químicas circulan desde el área de desnaturalización al de extensión, luego al

área de alineación y nuevamente a la de desnaturalización y a la zona de extensión, repitiéndose este ciclo múltiples veces (esto sucedió en todas las simulaciones), lo cual es un problema debido a que una parte de las especies químicas S_1P_2 y S_2P_1 se deshibrida antes de llegar al área de extensión y parte de las especies S_1 y S_2 se renaturaliza (hibrida).

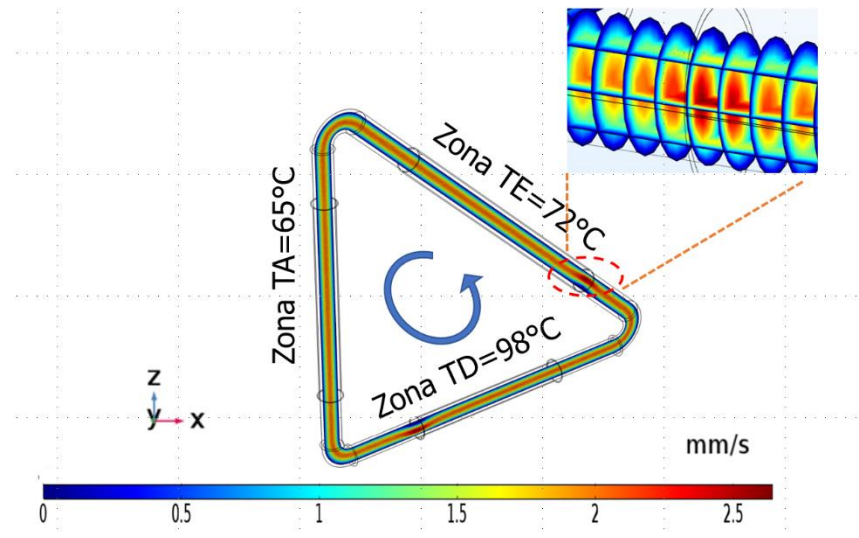


Figura 4.2: Perfil de velocidad de la simulación del sistema (**SIM78**) con parámetros ID del capilar de 797.5 μm , TD=98°C, TA=65°C y TE=72°C.

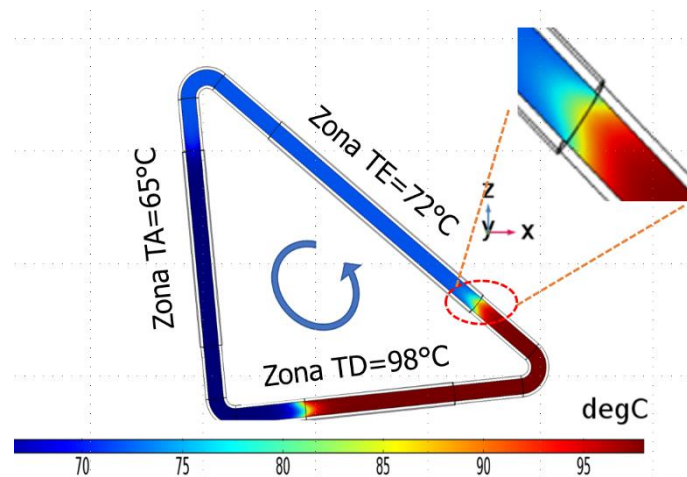


Figura 4.3: Perfil de temperatura de la simulación del sistema (**SIM78**) con parámetros ID del capilar de 797.5 μm , TD=98°C, TA=65°C y TE=72°C.

La **Figura 4.4** muestra dos ejemplos de la cinética de reacciones PCR a lo largo del tiempo generados por las simulaciones del sistema 3 (**SIM3**) con parámetros ID = 797.5 μm , TD = 92 °C, TA = 55 °C y TE = 70 °C y 78 (**SIM78**) con parámetros ID = 797.5 μm , TD = 98 °C, TA = 65 °C y TE = 72 °C, se aprecia que en todo momento suceden las reacciones de desnaturalización y renaturalización, también se observa la

conservación de la masa cuando las reacciones PCR se detienen, ya que la suma de las concentraciones de S_1S_2 , S_1 y S_2 debe tender a $6e^{-6}$ M (debido a que existe un cierto error en el redondeo de decimales durante las simulaciones causado por las capacidades del equipo usado).

En la **Figura 4.4a** se observa el comportamiento de la cinética de reacciones PCR de las concentraciones de las cadenas bicatenarias S_1S_2 , y monocatenarias S_1 y S_2 a través del tiempo para la simulación 3 (**SIM3**), alcanzando sus valores estables de 0.5 M y 2.4 M, respectivamente, en un tiempo de 22 minutos. Con la diferencia de que en cierto intervalo en el tiempo (15 min) se incrementa la tasa de desnaturalización. En la **Figura 4.4b** se observa el comportamiento de la cinética de reacciones PCR de las concentraciones de S_1S_2 , S_1 y S_2 a través del tiempo para la simulación 78 (**SIM78**), alcanzando sus valores estables de 0.5 M y 2.4 M, respectivamente, en un tiempo de 35 minutos. Ambas simulaciones muestran un comportamiento similar al de la intensidad de la fluorescencia a través del tiempo en las pruebas qPCR **Figura 1.5**.

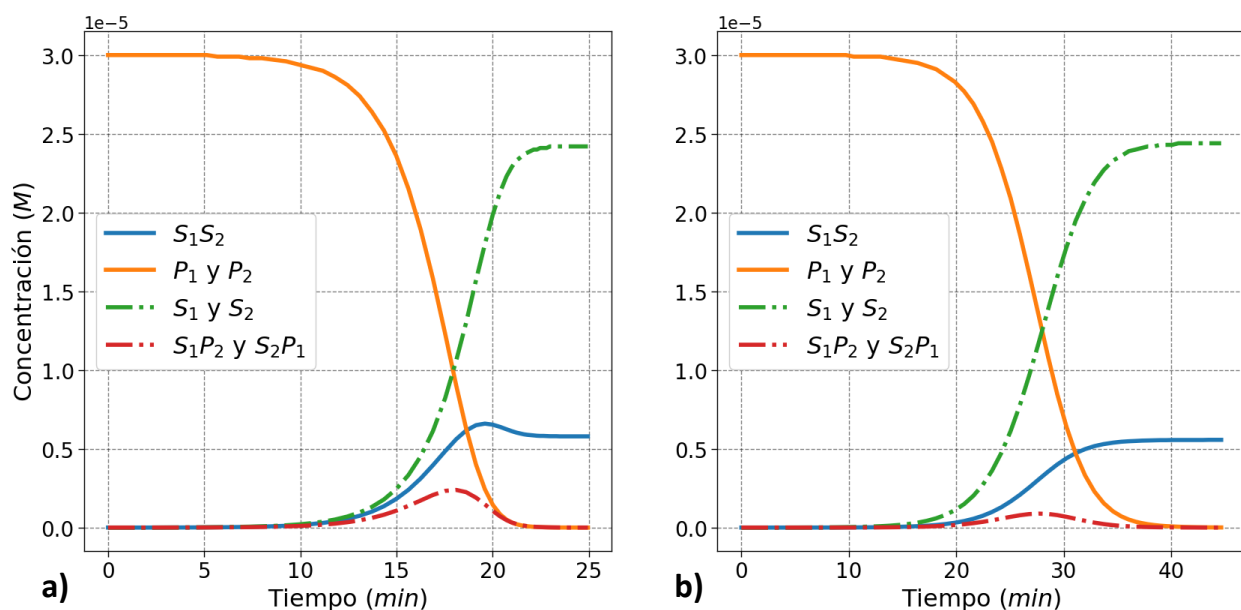


Figura 4.4: Cinética de las reacciones PCR de las especies químicas de las simulaciones: **a)** SIM3 con parámetros $ID = 797.5 \mu m$, $TD = 92^\circ C$, $TA = 55^\circ C$ y $TE = 70^\circ C$ y **b)** SIM78 con parámetros $ID = 797.5 \mu m$, $TD = 98^\circ C$, $TA = 65^\circ C$ y $TE = 72^\circ C$.

Por su parte, en la **Figura 4.5** se ilustra la cinética de reacciones PCR normalizada de las simulaciones **SIM3** y **SIM78** (**Figura 4.4**). La **Figura 4.5b** muestra que el comportamiento de las concentraciones de S_1S_2 , S_1 y S_2 son equivalentes para la **SIM78**, mientras que en la **Figura 4.5a** son parecidas para **SIM3**, con la diferencia de que en cierto intervalo en el tiempo se incrementa la tasa de desnaturalización y se encuentran desfasadas.

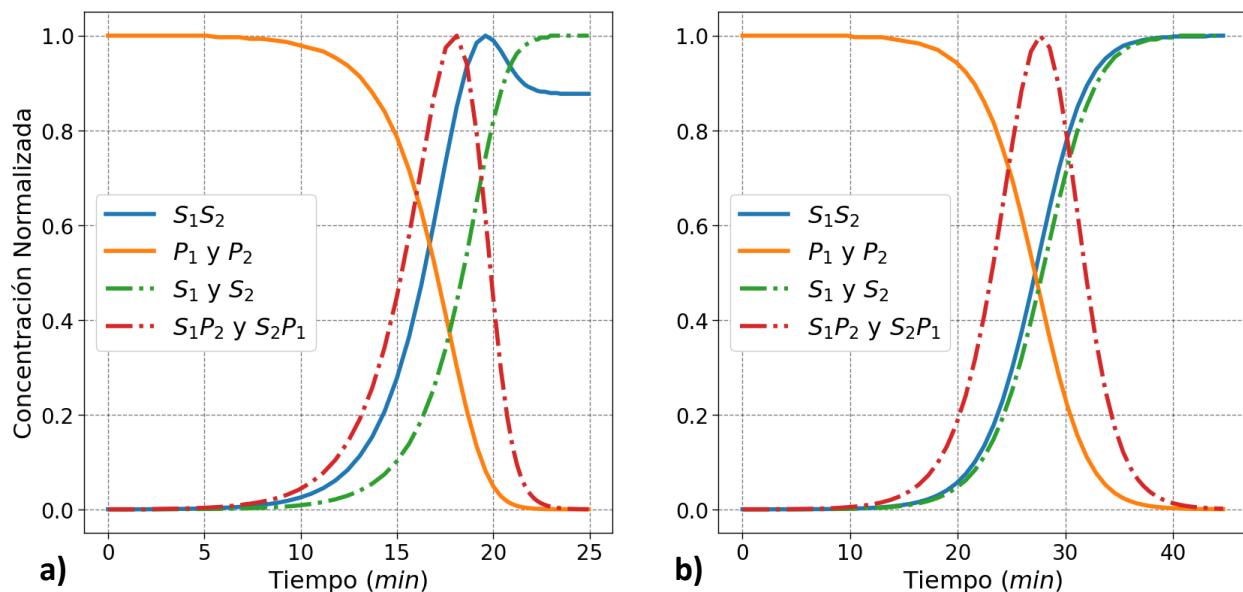


Figura 4.5: Cinética de reacción normalizada de las reacciones PCR de las especies químicas de las simulaciones: a) **SIM3** y b) **SIM78**.

La **Figura 4.6** muestra la cinética de reacciones de las concentraciones S_1S_2 en función del tiempo de las mejores cinco simulaciones (**SIM30**, **SIM45**, **SIM60**, **SIM63** y **SIM72**) de entre las 50 que convergieron, estas 5 simulaciones corresponden al capilar con ID de $797.5 \mu\text{m}$. Se observa que los amplicones para estas simulaciones van desde 3.5 a 5.7 M. Estas mostraron un tiempo de reacción de ~ 18 a 21 minutos, el cual es un tiempo menor al de la mayoría de los dispositivos PCR comerciales, los cuales demoran entre 30 y 40 minutos en terminar la PCR.

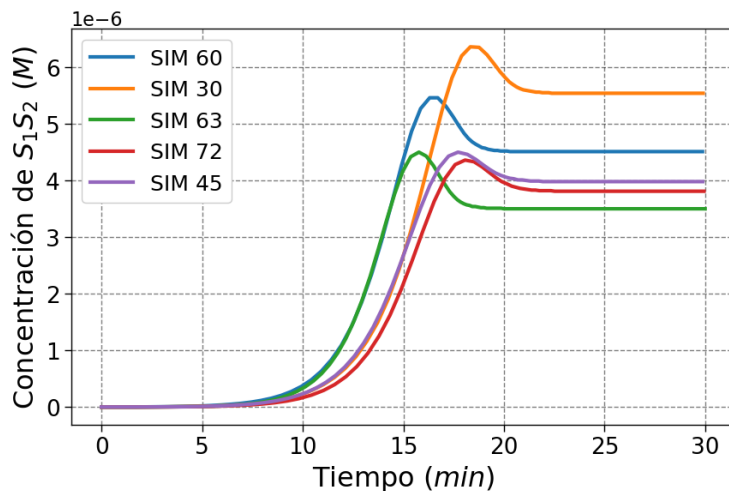


Figura 4.6: Cinética de reacciones de las concentraciones de los amplicones S_1S_2 vs tiempo de las mejores cinco simulaciones (SIM 30, SIM 45, SIM 60, SIM 63 y SIM 72), todas corresponden a un valor $ID = 797.5 \mu\text{m}$ del capilar.

La **Figura 4.7a**, **Figura 4.8a** y **Figura 4.9a** muestran el comportamiento de la concentración de amplicones S_1S_2 y la **Figura 4.7b**, **Figura 4.8b** y **Figura 4.9b** muestran el logaritmo de la concentración normalizada de S_1S_2 a lo largo del tiempo para cada uno de los distintos capilares con diferentes valores de ID. Encontramos que el capilar con ID de $797.5 \mu\text{m}$ **Figura 4.9**, fue el que mejor desempeño obtuvo al llevar a cabo las reacciones de forma más rápida (~ 20 - 25 min las mejores simulaciones, **SIM60**, **SIM30**, **SIM63**, **SIM72**, **SIM45**, **SIM33**, **SIM3**, **SIM18**, **SIM69**, **SIM57**, **SIM6**, **SIM42**, **SIM66**). De manera general, se puede observar de las figuras mencionadas, que entre mayor sea el diámetro interno más rápido se dan las reacciones de las especies químicas. Las gráficas del logaritmo de la concentración de S_1S_2 mientras más inclinadas hacia arriba se encuentren (**Figura 4.7b**, **Figura 4.8b** y **Figura 4.9b**), mayor es la rapidez en que se dan las reacciones, mientras que las gráficas de la concentración de S_1S_2 se aprecia lo mismo, al ver que las reacciones terminan en periodos de tiempo más cortos, en promedio, el tiempo que le llevo realizar las reacciones a cada capilar fue de 36.59 min para el capilar de $632.4 \mu\text{m}$, 32.35 min para el capilar de $690.8 \mu\text{m}$ y 25.98 min para el capilar de $797.5 \mu\text{m}$.

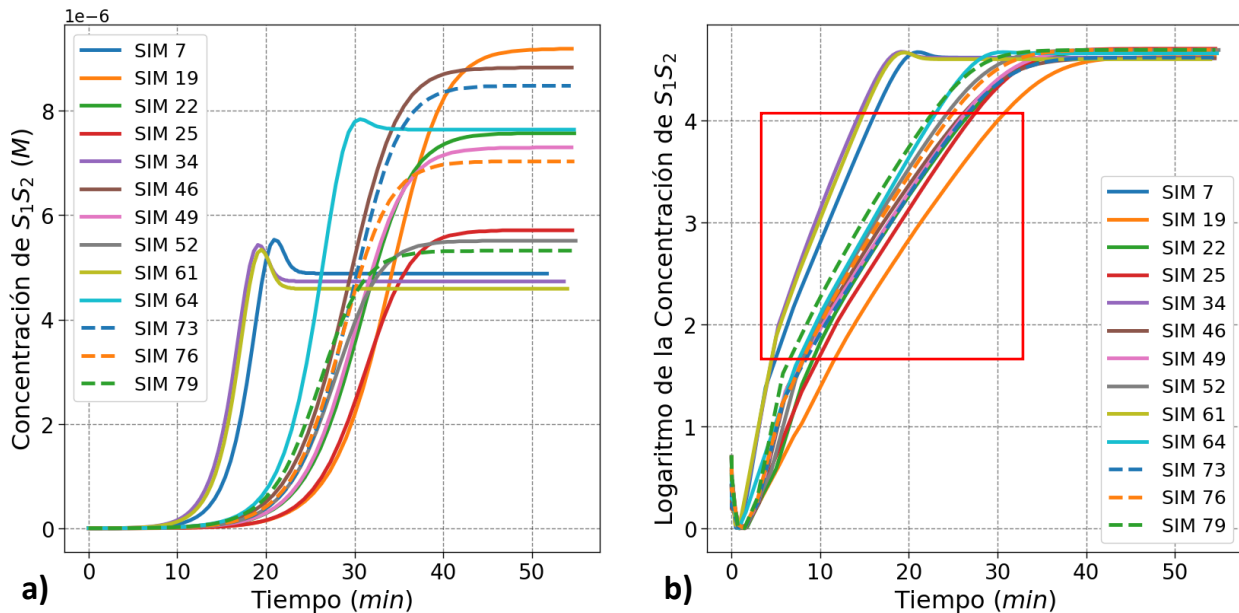


Figura 4.7: Cinética de **a)** concentración S_1S_2 y **b)** logaritmo de la concentración normalizada de S_1S_2 en función del tiempo para un $ID = 632.4 \mu\text{m}$ del capilar. Encerrado en cuadro rojo se muestra la recta donde se calcula la pendiente Slope-Log-dsDNA.

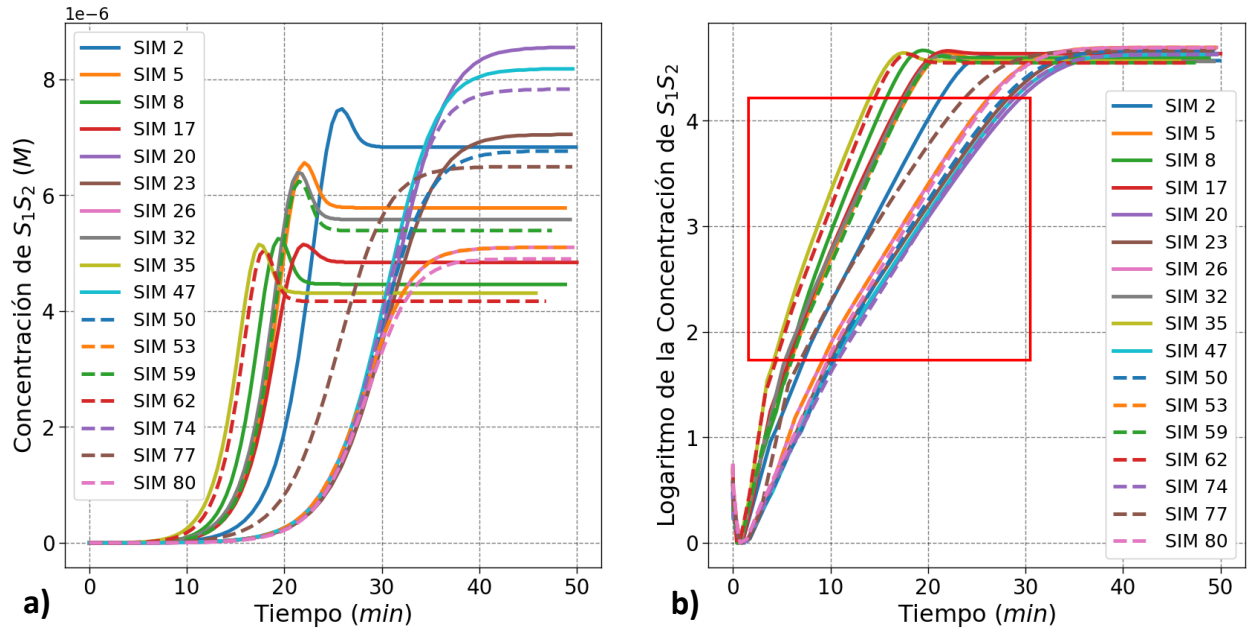


Figura 4.8: Cinética de **a)** concentración S_1S_2 y **b)** logaritmo de la concentración normalizada de S_1S_2 en función del tiempo para un $ID = 690.8 \mu m$ del capilar. Encerrado en cuadro rojo se muestra la recta donde se calcula la pendiente Slope-Log-dsDNA.

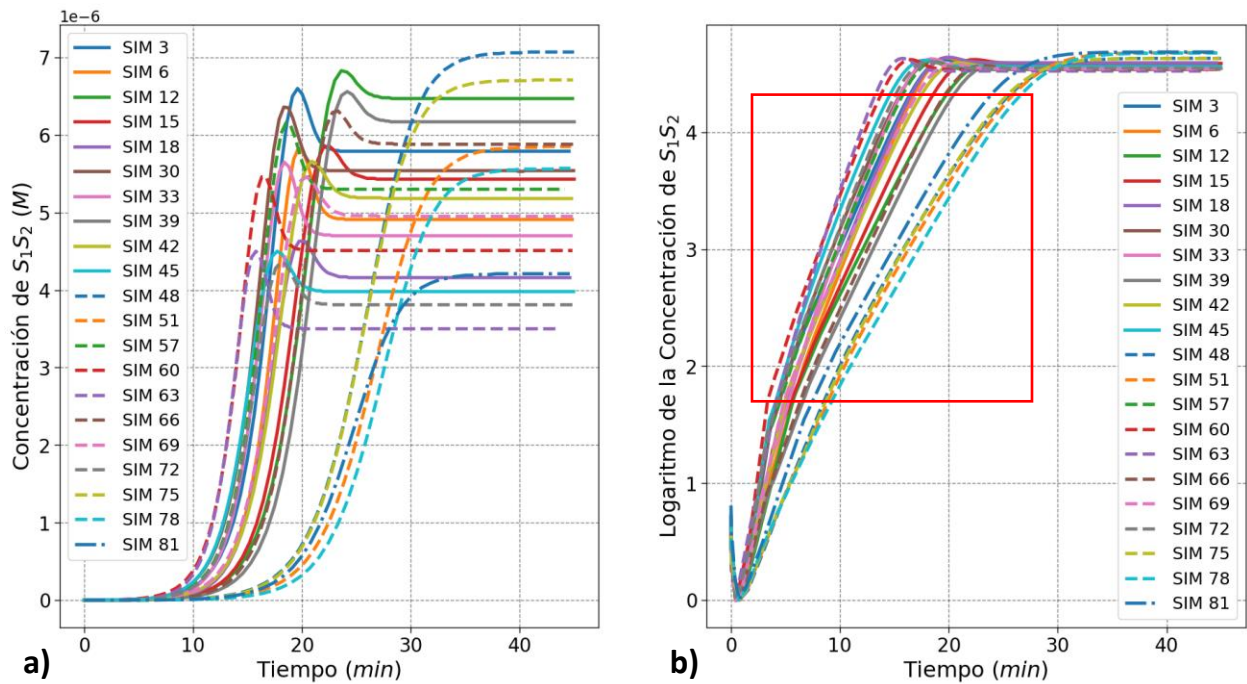


Figura 4.9: Cinética de **a)** concentración S_1S_2 y **b)** logaritmo de la concentración normalizada de S_1S_2 en función del tiempo para un $ID = 797.5 \mu m$ del capilar. Encerrado en cuadro rojo se muestra la recta donde se calcula la pendiente Slope-Log-dsDNA.

4.2 Selección de Respuesta del Sistema

En la **Figura 4.10** se aprecian distintas variables de interés que son: 1) tiempo que le llevó a fase exponencial finalizar (EXPTIME), 2) pendiente del logaritmo de la concentración normalizada de S_1S_2 (Slope – Log – dsDNA) y 3) tiempo que le llevó a fase lineal finalizar (RTIME), se muestran las gráficas de EXPTIME contra las otras dos para visualmente comprobar la relación que existe entre estas, además se muestra una recta de tendencia para cada gráfica.

En la gráfica de la **Figura 4.10a** se observa que existe una correlación negativa entre EXPTIME vs Slope – Log – dsDNA, por su parte en la gráfica **Figura 4.10b** se puede observar una correlación positiva entre EXPTIME vs RTIME, esto significa que la correlación entre Slope – Log – dsDNA vs RTIME debe ser una correlación negativa. Es decir, que mientras mayor sea la cantidad Slope – Log – dsDNA (**sección 3.7**), más rápido se están dando las diferentes reacciones químicas del sistema PCR por lo que en un tiempo menor deberían terminar la fase exponencial (**Figura 4.10a**), al ser ideales las condiciones para que la fase exponencial se dé más rápido, también lo debe de ser para las demás fases, tal como lo es el caso de la fase lineal (**Figura 4.10b**). Lo que se busca es incrementar la magnitud de Slope – Log – dsDNA y al hacer esto, también estamos buscando minimizar las variables EXPTIME y RTIME.

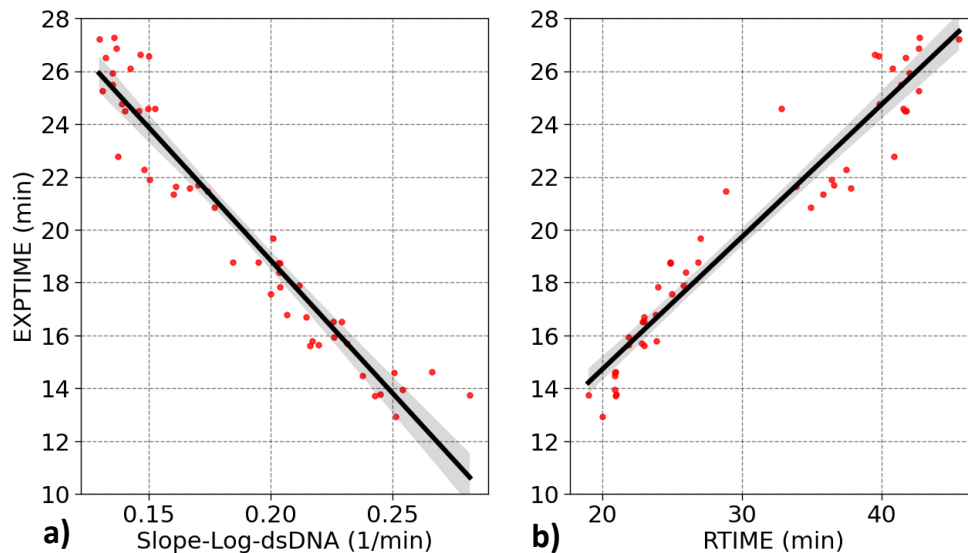


Figura 4.10: Correlación entre variables de respuesta: **a)** EXPTIME vs Slope-Log-dsDNA y **b)** EXPTIME vs RTIME del sistema PCR.

En la **Figura 4.11** se muestra la distribución de las distintas variables de interés Slope – Log – dsDNA, EXPTIME y RTIME, ninguna de las distribuciones tiene parecido a una distribución normal, esto podría deberse a la falta de información debido a las 31 simulaciones que no convergieron. Además, la distribución de EXPTIME (**Figura 4.11b**)

posee cierto parecido a una distribución constante (los datos faltantes debido a las simulaciones que no convergieron afectan la forma de la distribución), por lo que se escoge esta distribución como respuesta del sistema PCR. Los valores de sesgo y curtosis de todas las variables de interés se encuentran entre -2 a 2 y -7 a 7 respectivamente (**Tabla 4.3**) los cuales son valores permitidos para estas variables. Se descartó las variables Slope-Log-dsDNA y RTIME debido a sus distribuciones (**Figura 4.11a** y **Figura 4.11c**), las cuales pueden afectar negativamente el análisis de regresión lineal.

Tabla 4.3: Sesgo y curtosis de las variables de interés del sistema PCR.

Variable de interés	Sesgo	Curtosis
Slope-Log-dsDNA	0.273	-1.144
EXPTIME	0.113	-1.345
RTIME	0.218	-1.619

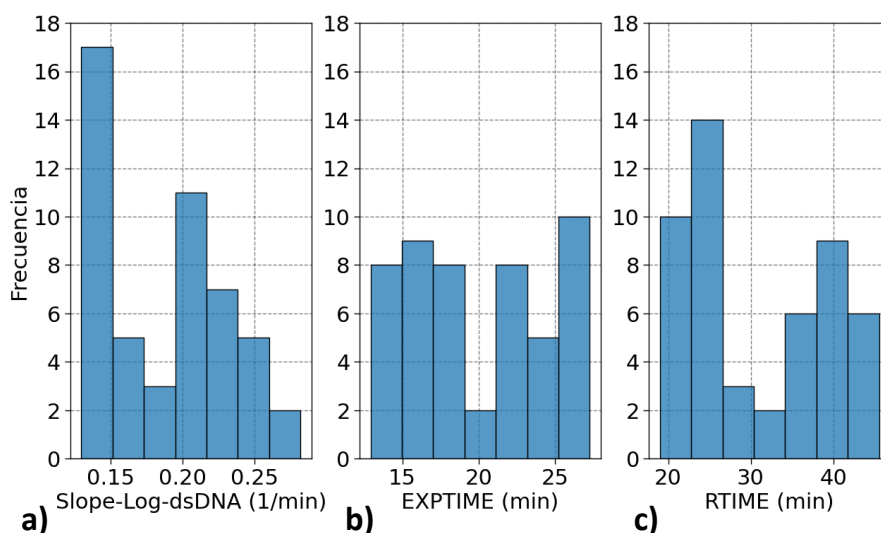


Figura 4.11: Distribución de la frecuencia de las variables de interés **a)** Slope-Log-dsDNA, **b)** EXPTIME y **c)** RTIME del sistema PCR.

Estas distintas variables Slope-Log-dsDNA, EXPTIME y RTIME están relacionadas con la rapidez a la que se están dando las reacciones en el sistema PCR, esto se muestra en la (**Figura 4.12**) donde se toma como punto en el tiempo el minuto 30 y se mide la concentración molar de las cadenas monocatenarias (S_1 y S_2) y se compara contra la variable Slope-Log-dsDNA que, recordemos, es la pendiente del logaritmo de la concentración normalizada de las cadenas bicatenarias (S_1S_2) durante la fase exponencial. Mientras más grande es esta pendiente, significa que las reacciones PCR se están llevando a cabo de forma más rápida ya que las condiciones son ideales para ello, y si las condiciones son ideales para que la fase exponencial se dé más rápido, también deben de serlo para la lineal (**Figura 4.10b**). Se utilizó la concentración de las

especies monocatenarias debido a que en las bicatenarias, hay un intervalo en el tiempo en el que se incrementa la tasa de desnaturalización, de igual forma siempre se están dando los fenómenos de desnaturalización y renaturalización (**Figura 4.4** y **Figura 4.5**) y conforme crece la concentración de cadenas bicatenarias (S_1 y S_2) también crece la concentración de las cadenas monocatenarias (S_1S_2).

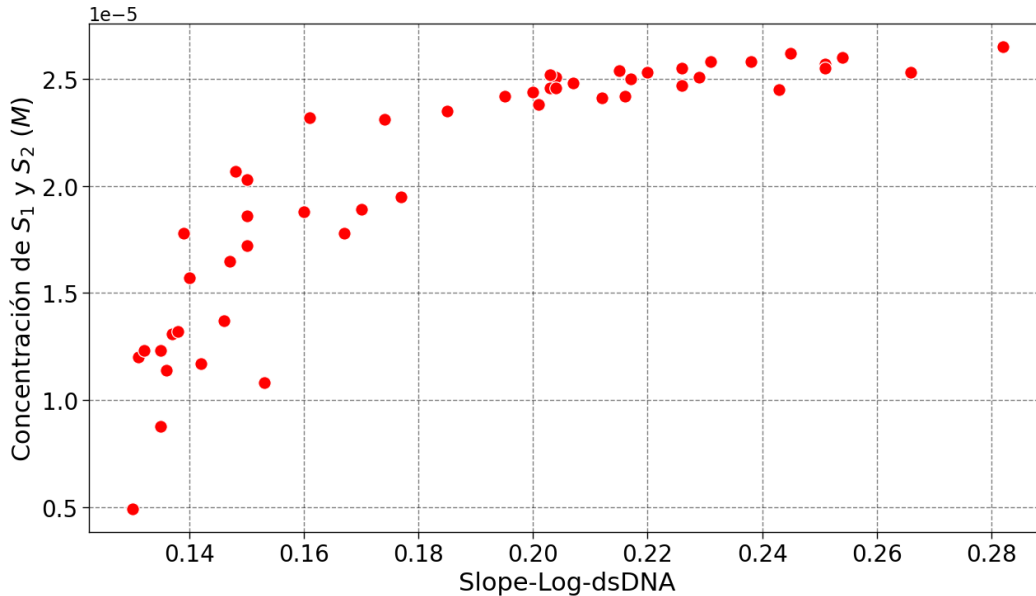


Figura 4.12: Gráfica de los valores de la concentración de las cadenas monocatenarias (S_1 y S_2) a los 30 min vs Slope-Log-dsDNA.

4.3 Análisis Exploratorio de Datos (AED)

Esta sección consiste en la realización de dos análisis gráficos, el primero de ellos se compara la velocidad promedio del fluido (VPRM) contra distintas variables TD, TA, TE e ID (**sección 3.9**) y el segundo de los análisis se compara la respuesta del sistema escogida EXPTIME (**sección 4.2**) contra distintas variables TD, TA, TE e ID (**sección 3.9**).

4.3.1 Velocidad promedio del fluido

En la **Figura 4.13** se observa la relación que existe entre la VPRM y los distintos parámetros de operación (TD, TA, TE e ID), siendo ID y TA los parámetros que mayor impacto tienen en VPRM (**Figura 4.13d** y **Figura 4.13b**). Encontramos que VPRM vs ID (**Figura 4.13d**), VPRM vs TD (**Figura 4.13a**) y VPRM vs TE (**Figura 4.13c**), presentan una correlación positiva, mientras que VPRM vs TA (**Figura 4.13b**) presenta una correlación negativa, esto implica que ID y las diferencias de temperaturas ($TD - TA$) y ($TE - TA$) deben ser maximizadas para incrementar la magnitud de VPRM o disminuidas para disminuir la magnitud de esta variable.

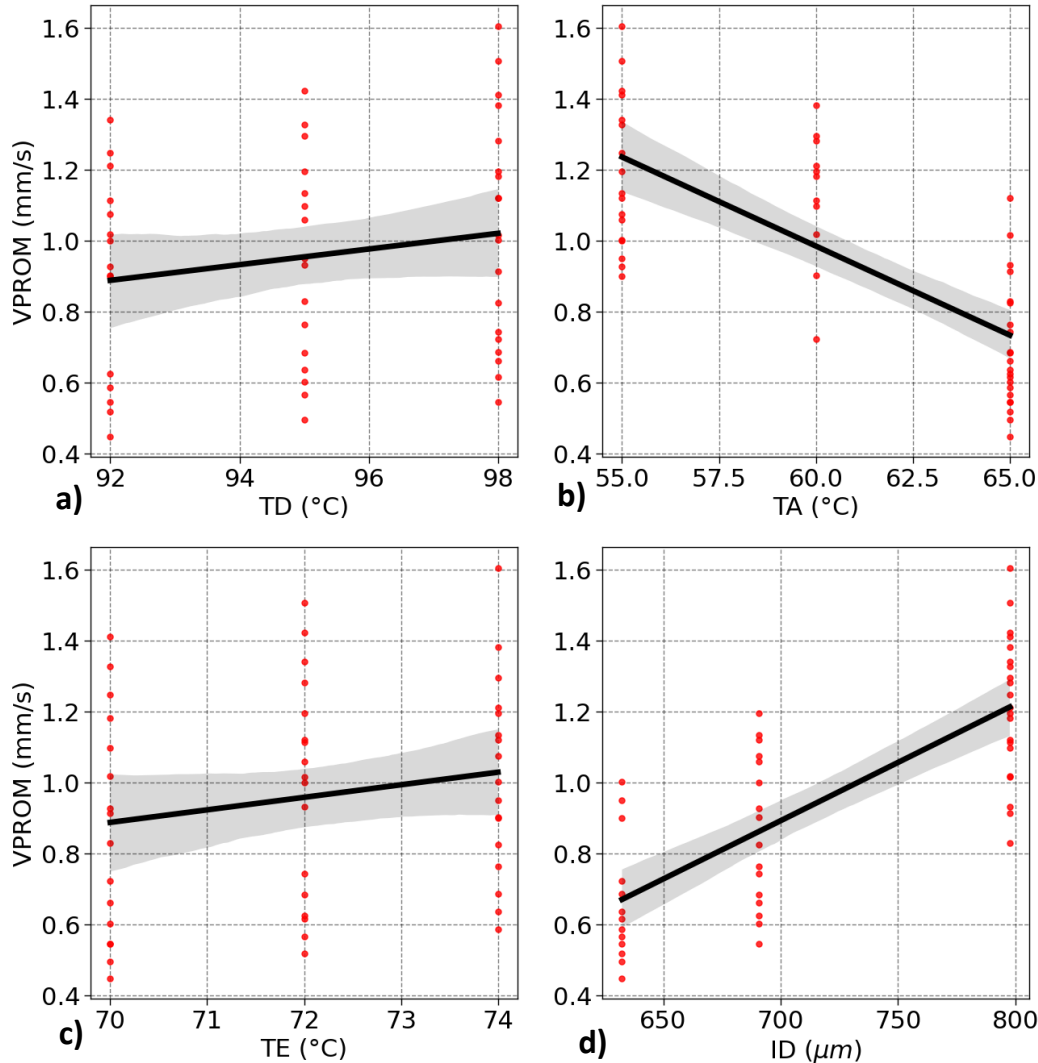


Figura 4.13: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: **a)** V PROM vs TD, **b)** V PROM vs TA, **c)** V PROM vs TE y **d)** V PROM vs ID.

Lo mencionado en el párrafo anterior se comprueba al observar la **Figura 4.14** donde las diferencias de temperatura ($TD - TA$) y ($TE - TA$) tienen una correlación positiva con V PROM (**Figura 4.14a** y **Figura 4.14b**) y además tienen un gran impacto en esta, mientras que la diferencia de temperaturas ($TD - TE$) presenta una correlación nula con V PROM (**Figura 4.14c**). Esto se debe a que al ser un sistema donde se presentan flujos de convección natural, las diferencias de temperatura de mayor magnitud tendrán más impacto, ya que las diferencias de densidades en el fluido serán más grandes (mientras más caliente menos denso es el fluido o viceversa), esto a su vez incrementa las fuerzas debido a que las columnas de agua más fría (más densa), van a ejercer una mayor fuerza sobre la columna de agua de mayor temperatura (menos densa), aquí la gravedad juega un papel importante, mientras más pequeño es el sistema (diámetros internos más pequeños), menor impacto tiene, es por esto que mientras más grande es el sistema (por

ejemplo, mayor diámetro interno), mayor impacto tiene la fuerza de gravedad, la cual es la que obliga a los fluidos más densos a desplazar a los menos densos.

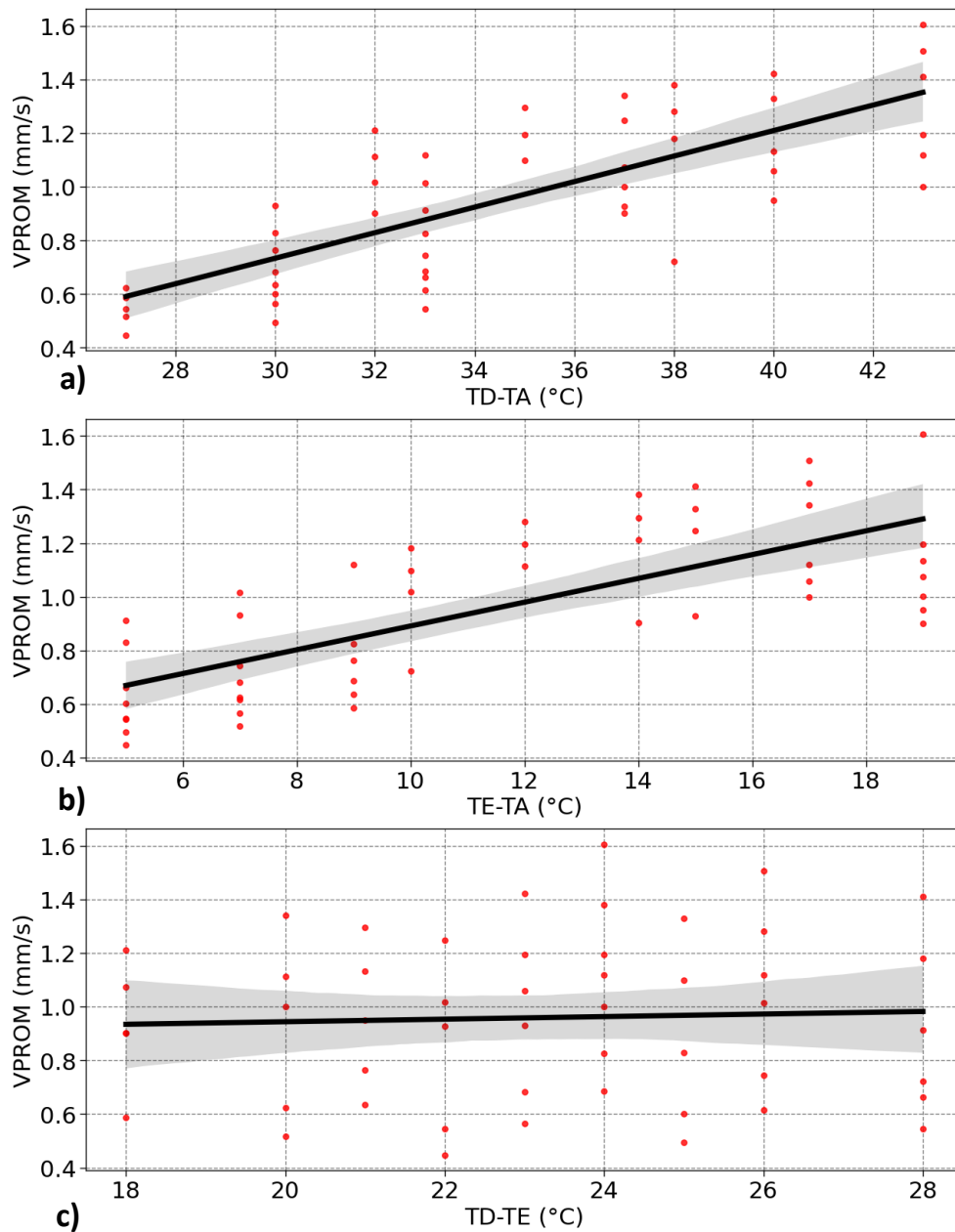


Figura 4.14: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: a) VPRM vs (TD-TA), b) VPRM vs (TE-TA) y c) (VPRM vs TD-TE).

En la **Figura 4.15a** se observa que VPRM vs el cociente de las diferencias de temperaturas $\frac{TD-TA}{TE-TA}$ muestra una correlación negativa, y mientras menor es este cociente mayor es la velocidad del fluido, esto puede indicar que la diferencia de temperaturas (TE – TA) tenga un mayor impacto sobre VPRM en comparación de (TD – TA) (esto

se observa en que los valores que maximizan VPRM están agrupados en la esquina superior izquierda).

En la **Figura 4.15b** se observa que VPRM vs TPRM presenta una correlación negativa, esto puede deberse principalmente a la correlación negativa que hay entre TA y VPRM (**Figura 4.13b**), también se observa una varianza muy grande (esto se observa en que para algunas temperatura promedio dadas la separación entre los puntos es demasiado grande), debido a esto, se descarta su uso en el análisis de regresión lineal.

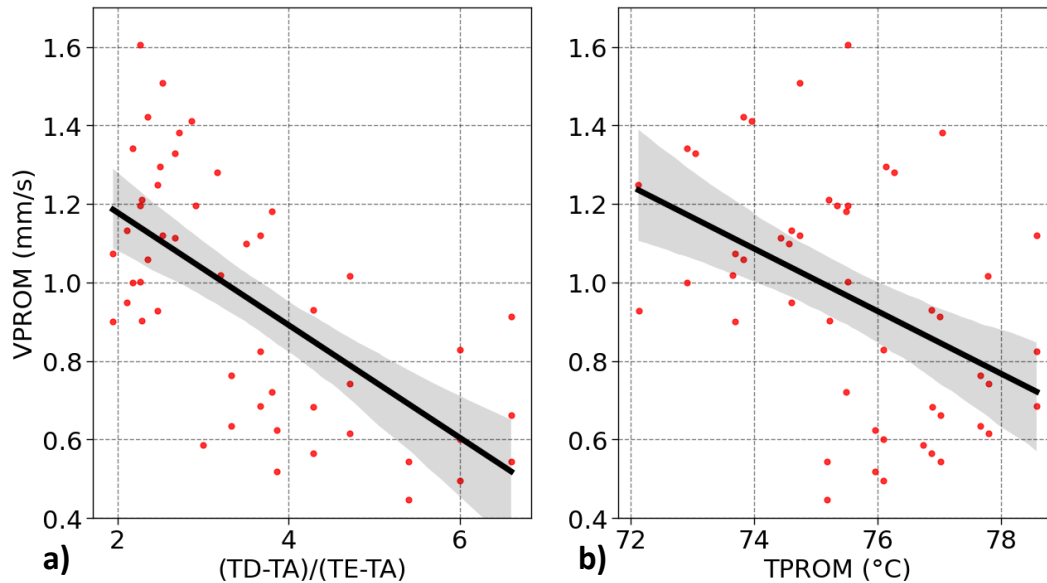


Figura 4.15: Correlación entre distintas variables de las simulaciones PCR: a) VPRM vs (TD-TA)/(TE-TA) y b) VPRM vs TPRM.

4.3.2 Respuesta del Sistema (EXPTIME)

En la **Figura 4.16** se observa la relación que existe entre la EXPTIME y los distintos parámetros de operación TD, TA, TE e ID del sistema PCR, siendo nuevamente ID y TA los parámetros que mayor impacto tienen en EXPTIME (**Figura 4.16d** y **Figura 4.16b**). Las relaciones EXPTIME vs ID (**Figura 4.16d**), EXPTIME vs TD (**Figura 4.16a**) y EXPTIME vs TE (**Figura 4.16c**) presentan una correlación negativa, mientras que EXPTIME vs TA (**Figura 4.16b**) presenta una correlación positiva, esto implica que ID y que las diferencias de temperaturas (TD – TA) y (TE – TA) deben ser maximizadas para decrementar la magnitud de EXPTIME o disminuidas para aumentar la magnitud de esta variable. Las relaciones mencionadas son opuestas a las que presentan con VPRM. Por ejemplo, podemos notar que, si TA tiene una correlación positiva con EXPTIME, esta primera variable tendrá una correlación negativa con VPRM.

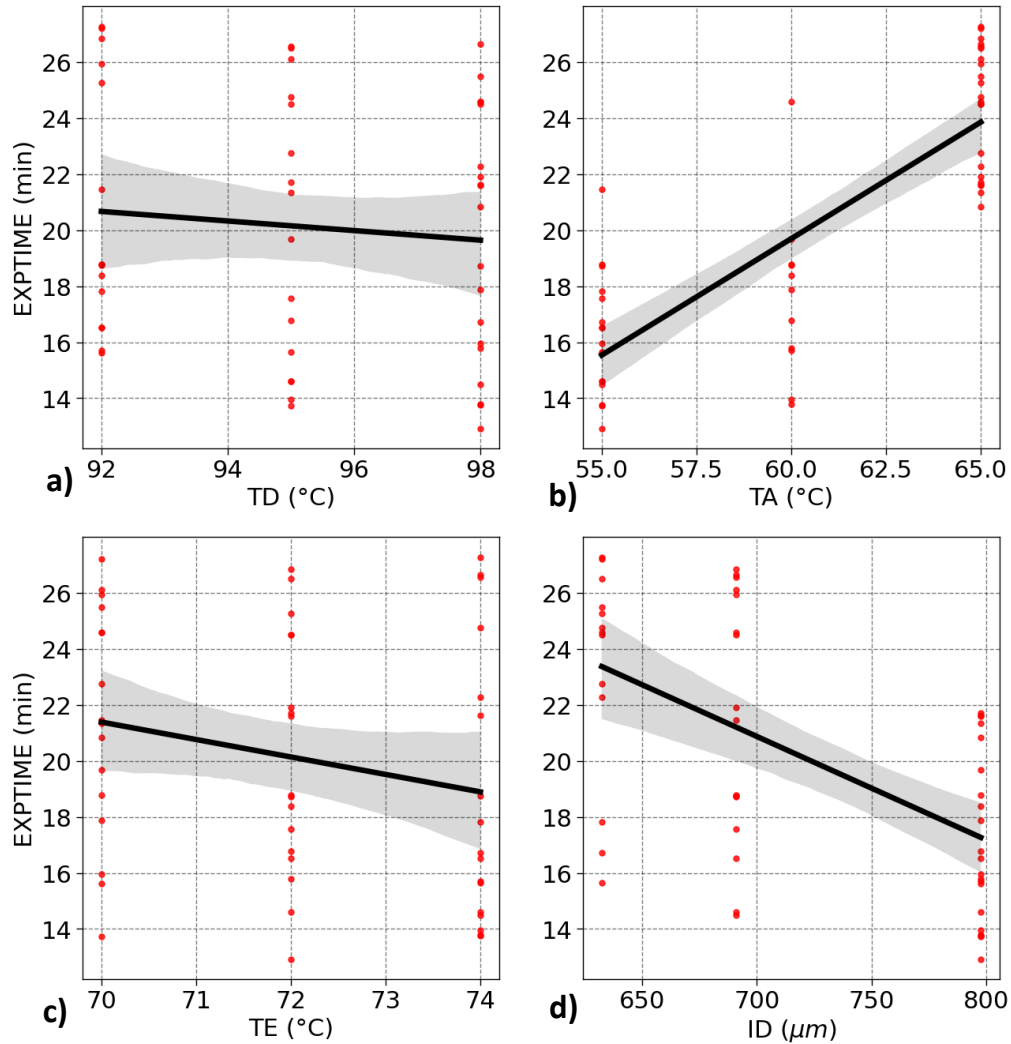


Figura 4.16: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: **a)** EXPTIME vs TD, **b)** EXPTIME vs TA, **c)** EXPTIME vs TE y **d)** EXPTIME vs ID.

Lo mencionado anteriormente se comprueba al observar la **Figura 4.17** donde las diferencias de temperatura ($TD - TA$) y ($TE - TA$) tienen una correlación negativa con EXPTIME (**Figura 4.17a** y **Figura 4.17b**) y además tienen un gran impacto en esta, mientras que la diferencia de temperaturas ($TD - TE$) presenta una correlación nula con EXPTIME (**Figura 4.17c**) al igual que con VPROM (**Figura 4.14c**). Las relaciones mencionadas son opuestas a las que presentan con VPROM.

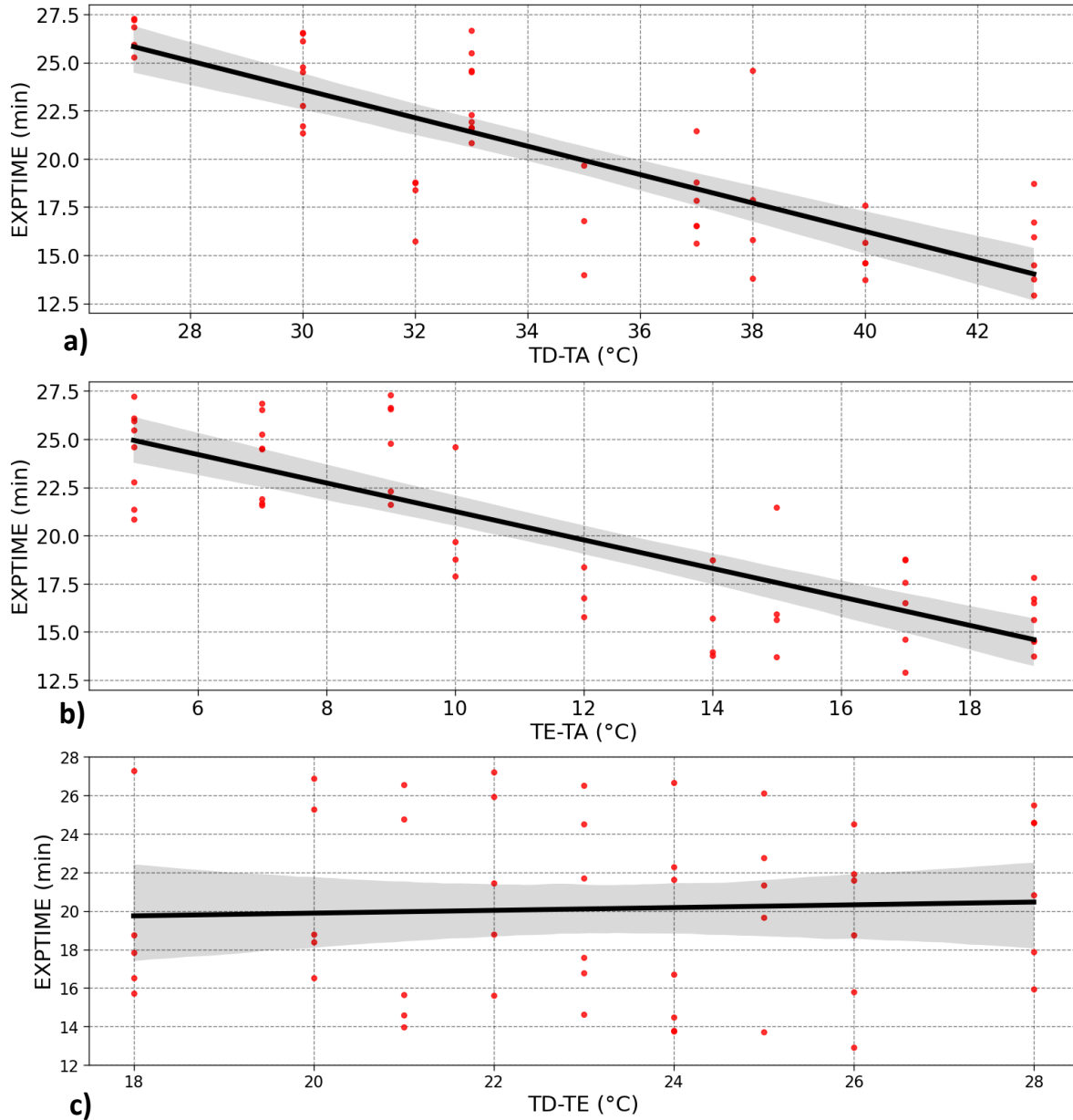


Figura 4.17: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: **a)** EXPTIME vs (TD-TA), **b)** EXPTIME vs (TE-TA) y **c)** EXPTIME vs (TD-TE).

En la **Figura 4.18** se observa que $EXPTIME$ vs $\frac{TD-TA}{TE-TA}$ presenta una correlación positiva, además mientras mayor es este cociente, menor es la magnitud de $EXPTIME$ (esto se observa en que los valores que minimizan $EXPTIME$ están agrupados en la esquina inferior izquierda), esto parece indicar que la diferencia de temperaturas ($TE - TA$) tiene mayor impacto que la diferencia de temperaturas ($TD - TA$) en la respuesta del sistema $EXPTIME$.

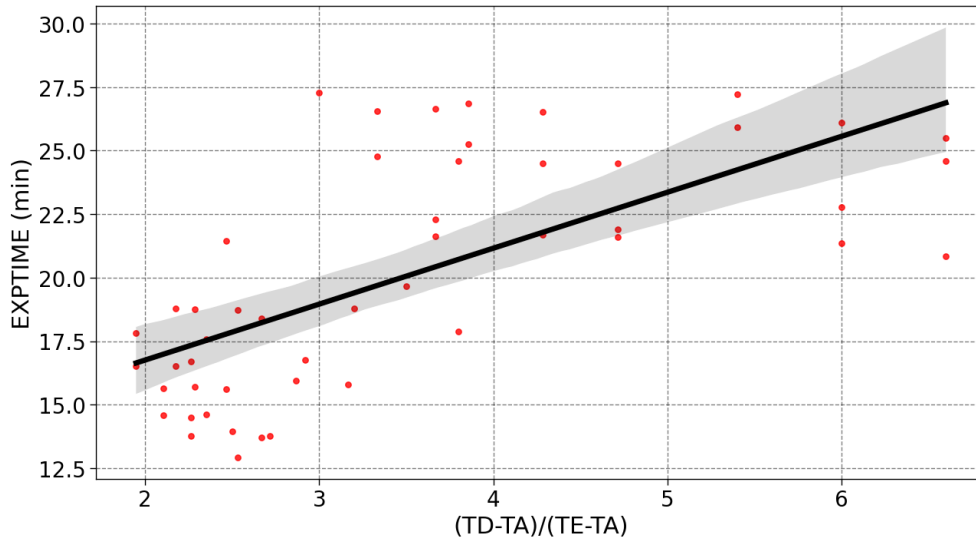


Figura 4.18: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: EXPTIME vs $(TD-TA)/(TE-TA)$.

En la **Figura 4.19b** se observa que EXPTIME vs TPRM presenta una correlación positiva, esto puede deberse principalmente a la correlación positiva que hay entre TA y EXPTIME (**Figura 4.13b**), además esta gráfica presenta una varianza bastante grande (para algunas temperatura promedio dadas la separación entre los puntos es demasiado grande), motivo suficiente para descartar esta variable para su uso en el análisis de regresión lineal. En la **Figura 4.19a** se observa que EXPTIME vs VPRM presenta una correlación negativa, esta es una relación muy importante ya que esto nos explica por qué las correlaciones entre las distintas variables vistas TD, TA, TE, ID, $(TD-TA)$, etc., con EXPTIME son opuestas a su correlación con VPRM, ya que a pesar de estar relacionadas con la cinética de reacciones, estas también se encuentran directamente relacionadas con la velocidad del fluido y mientras mayor es la velocidad del fluido, menor es la magnitud de la respuesta del sistema.

El hecho de que las variables ID, $(TD - TA)$ y $(TE - TA)$ (**Figura 4.16d**, **Figura 4.17a** y **Figura 4.17b**) tengan un gran impacto en el sistema PCR, se relaciona directamente con la velocidad del fluido (**sección 4.3.1**) en donde mientras mayor sea la magnitud de estas cantidades, mayor será la velocidad del fluido y menor será EXPTIME (**Figura 4.19a**), por lo cual menor será el tiempo que le lleva a la reacción terminar (**sección 3.8** y **Figura 4.10**) ya que las reacciones químicas se están llevando a cabo con más rapidez (**Figura 4.7**, **Figura 4.8** y **Figura 4.9**). Nuevamente EXPTIME vs TPRM muestra una gran varianza (esto se observa en que para algunas temperatura promedio dadas la separación entre los puntos es demasiado grande) (**Figura 4.19b**).

La velocidad del fluido determina el tiempo en que las diferentes especies químicas se encuentran en cada una de las zonas de temperatura en el dispositivo (TD, TA, TE) (**Figura 3.1**), si la velocidad es lo suficientemente baja, las diferentes especies químicas

involucradas en las reacciones van a tardar más en llegar a las otras zonas de temperatura y por lo tanto la rapidez de las reacciones disminuye.

Otro punto para tomar en cuenta y que afecta en gran medida la respuesta del sistema, es la dirección del flujo (**sección 4.1** y **Figura 4.3**) ya que las especies químicas están viajando desde la zona de desnaturalización a la zona de extensión para luego ir a la zona de alineación y nuevamente a la de extensión, repitiendo el ciclo varias veces, esto es un problema debido a que en el modelo de la cinética de reacciones que se está utilizando, se considera el proceso de renaturalización y alineación reversa, lo que provoca que una menor cantidad de las especies químicas S_1P_2 y S_2P_1 llegue a la zona de extensión y que cierta cantidad de las especies químicas S_1 y S_2 se hibriden. Para solventar este problema se requiere incrementar la velocidad del fluido para que las especies químicas S_1P_2 y S_2P_1 tengan menos tiempo para deshibridarse cuando pasan por la zona de desnaturalización y que las especies S_1 y S_2 no tengan tiempo suficiente de hibridarse, debido a esto, la velocidad promedio del fluido tiene un gran impacto en la respuesta del sistema (**Figura 4.19**).

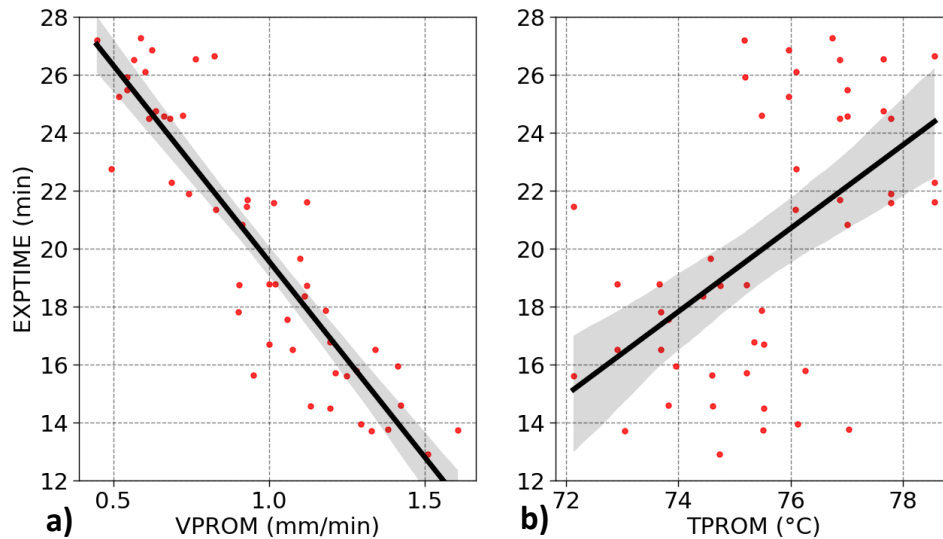


Figura 4.19: Correlación entre distintas variables de las simulaciones del sistema PCR: **a)** EXPTIME vs VPROM y **b)** EXPTIME vs TPROM.

4.4 Análisis de Regresión del sistema PCR

Se realizaron 3 análisis de regresión lineal entre la respuesta del sistema EXPTIME y distintas variables TD, TA, TE, ID, VPROM, (TD-TA), (TE-TA) y (TD-TA) para poder medir el impacto de estas últimas y así poder utilizar los modelos generados para optimizar la respuesta del sistema y conocer el impacto que tiene cada variable sobre el sistema.

Esto se hizo debido a que las simulaciones son un “caso idealizado” de las reacciones PCR, para cierta concentración en específico (**Tabla 3.5**) y debido a esta misma idealidad del sistema trabajado, el hallar las condiciones que mejoren la rapidez con la que se dan las reacciones químicas debería de funcionar para otras concentraciones diferentes. Además de que, si las condiciones son las ideales, para que alguna de las distintas fases PCR se complete más rápido, también lo será para las demás fases.

4.4.1 Estandarización de los datos

Los datos fueron escalados con el método de estandarización, mostrado en (4.1) para evitar que algunos parámetros tengan una mayor influencia que otros durante la regresión. La estandarización es un proceso común a la hora de realizar una regresión, otra transformación parecida es la normalización. Además, el proceso de estandarización permite que la media de la distribución de errores se encuentre en 0 y esto facilite la validación del modelo mediante gráficas de residuales y de distribución de residuales.

$$x_{estandarizada} = \frac{x - media(x)}{desviación_estandar(x)} \quad (4.1)$$

4.4.2 Regresión lineal 1

El primer análisis de regresión realizado en Ec. (4.2) fue entre la respuesta del sistema EXPTIME y los distintos parámetros de operación TD, TA, TE e ID, previamente definidos (**sección 3.1**). En (4.2) se aprecia que la magnitud (valor absoluto) de los coeficientes que multiplican a TA e ID son las más grandes, esto significa que los dos factores con más influencia en la respuesta del sistema son TA e ID, tal y como se había observado en el análisis gráfico realizado (**Figura 4.16**), que el parámetro ID tenga un gran impacto en el sistema se debe a que está relacionada directamente con la velocidad del fluido (**Figura 4.13**). La diferencia en los signos entre las variables TA, TE y TD en el modelo (4.2) parecen indicar que la diferencia de temperaturas (TD – TA) y (TE – TA) deben ser maximizadas. En la **Figura 4.20** se muestra una gráfica de superficie de respuesta donde se aprecia la correlación positiva de TA con EXPTIME y una correlación negativa de ID con EXPTIME.

El modelo generado obtuvo un valor del coeficiente de determinación $R^2 = 0.810$ lo que significa que el modelo predice 81% de la variabilidad del sistema, este se considera un valor R^2 aceptable ya que no se tienen los datos completos (31 simulaciones divergieron). La raíz del error cuadrático medio del modelo es $RMSE = 1.734$ min.

$$EXPTIME = -0.541TD + 3.132TA - 0.869TE - 1.923ID + 20.118 \quad (4.2)$$

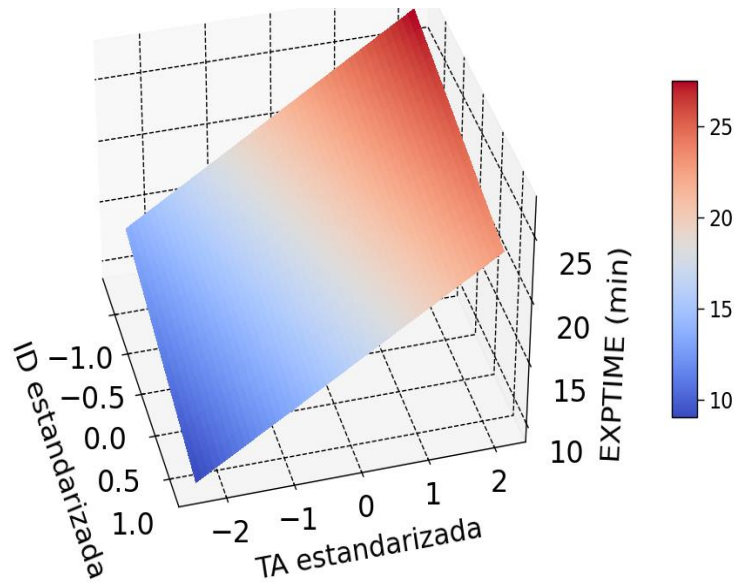


Figura 4.20: Superficie de respuesta: EXPTIME vs TA e ID estandarizadas, manteniendo TD=98°C y TE=74°C.

En la **Figura 4.21** se ilustra que la distribución de los residuos sigue una distribución normal (ambas gráficas), en la **Figura 4.21a** se aprecia que la distribución es más ancha del lado izquierdo que del derecho esto indica que la distribución cuenta con cierto grado de sesgo hacia la izquierda (sesgo de 0.23). La **Figura 4.21b** es equivalente a la **Figura 4.21a**, donde los puntos al seguir la recta generada indica la normalidad en la distribución

de los datos. La **Figura 4.21c** es una gráfica de residuales donde no se puede observar algún patrón a simple vista que indique que el modelo generado es incorrecto.

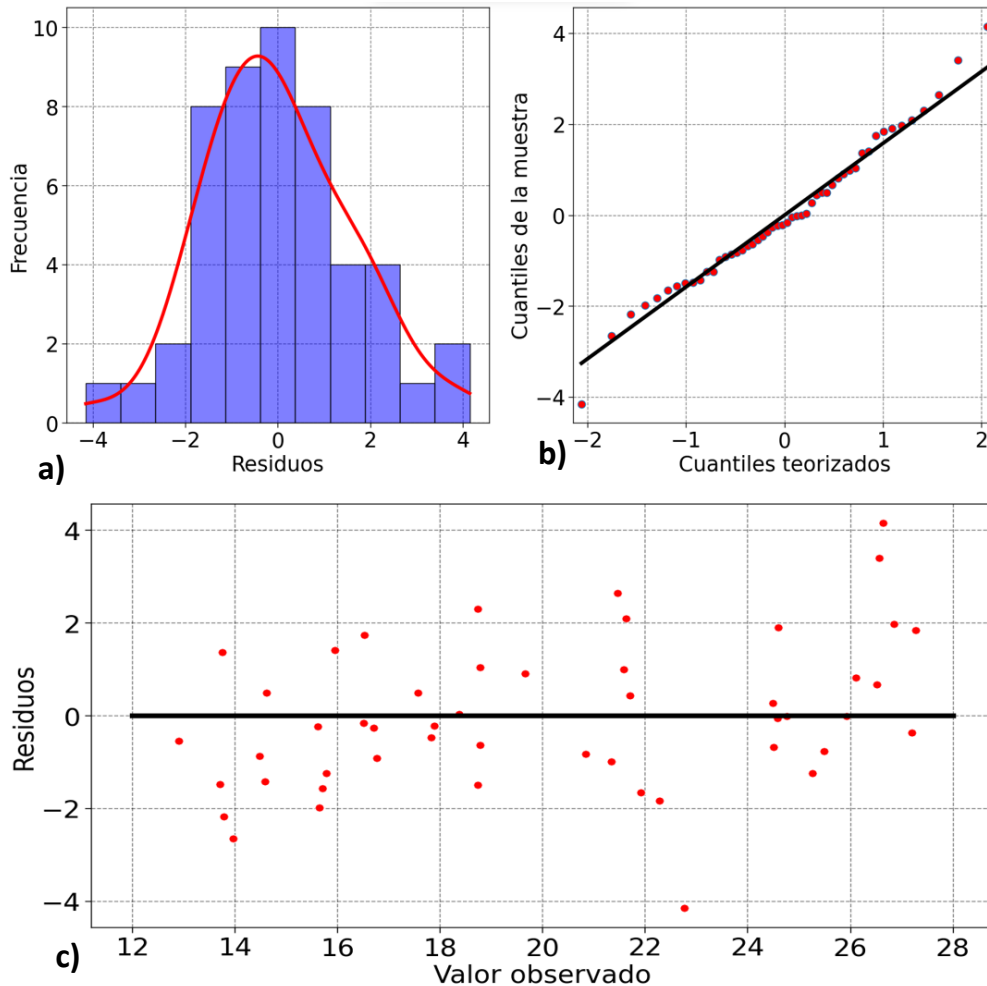


Figura 4.21: Distribución de los residuos de la regresión lineal 1 (EXPTIME vs TD, TA, TE e ID): **a)** histograma de la frecuencia de los residuos, **b)** gráfica de probabilidad normal de los residuos y **c)** residuos de la regresión.

4.4.3 Regresión lineal 2

El segundo análisis de regresión realizado en Ec. (4.3) fue entre la respuesta del sistema EXPTIME, ID y diferencias de temperatura (**sección 3.7**). En (4.3) se aprecia que ID vuelve a ser uno de los factores con más influencia en la respuesta del sistema. La magnitud (valor absoluto) del coeficiente que multiplica a la diferencia de temperaturas (TE – TA) es más grande que la magnitud (valor absoluto) del coeficiente que multiplica la diferencia (TD – TA) lo que significa que la primera diferencia tiene un mayor impacto que la segunda, ~2.4 veces más grande.

Para el análisis de regresión lineal de esta sección se descartó la diferencia de temperaturas ($TD - TE$), debido a que en el análisis gráfico (**Figura 4.17**) ésta diferencia mostró no tener correlación alguna con la respuesta del sistema. El modelo generado (4.3) es equivalente o al menos bastante parecido al primer modelo generado (4.2). En la **Figura 4.22** se aprecia una gráfica de superficie de respuesta en la cual se observa la correlación negativa de EXPTIME con la diferencia de temperaturas ($TD-TE$) y el diámetro interno del capilar (ID) ya que, si estas incrementan, la magnitud de EXPTIME decrementa.

El modelo generado obtuvo un valor del coeficiente de determinación $R^2 = 0.833$, por lo que el modelo predice 83% de la variabilidad del sistema. La raíz del error cuadrático medio del modelo es $RMSE = 1.639$. Que el modelo generado (4.3) prediga con mayor exactitud la respuesta EXPTIME a comparación del modelo anterior (4.2) se debe a que las diferencias de temperaturas están aún más relacionadas con la velocidad del fluido que las temperaturas en sí, ya que mientras mayores sean las diferencias de temperaturas en el dispositivo capilar, mayores van a ser las diferencias de densidad en el fluido, esto a su vez provoca que el fluido más frío (más denso) desplace con mayor facilidad el fluido más caliente (menos denso) y por lo tanto se obtengan velocidades más grandes dentro del dispositivo (por lo tanto la velocidad promedio V_{PROM} también incrementa).

$$EXPTIME = -1.015(TD - TA) - 2.484(TE - TA) - 1.912ID + 20.118 \quad (4.3)$$

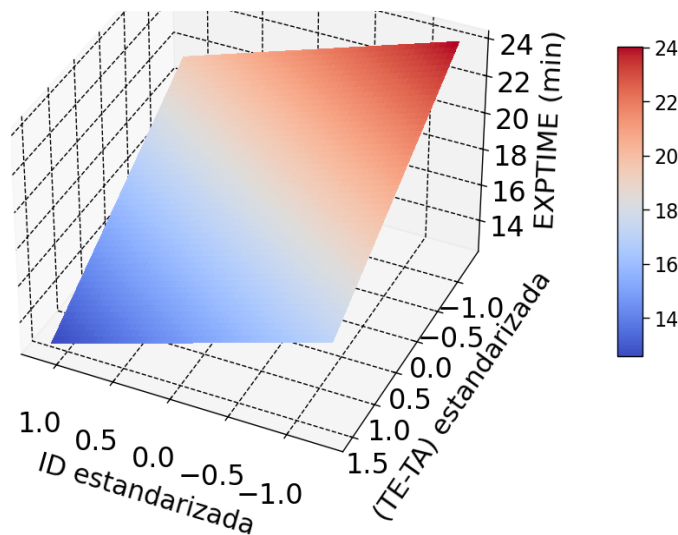


Figura 4.22: Superficie de respuesta: EXPTIME vs $(TE-TE)$ e ID estandarizadas, haciendo $(TD-TE)=43^{\circ}C$.

En la **Figura 4.23** se ilustra que la distribución de los residuos sigue una distribución normal (ambas gráficas), en la **Figura 4.23a** se aprecia que la distribución es más ancha del lado izquierdo que del derecho esto indica que la distribución cuenta con cierto grado de sesgo hacia la izquierda (sesgo de 0.19). La **Figura 4.23b** es equivalente a la **Figura**

4.23a, donde los puntos al seguir la recta generada indica la normalidad en la distribución de los datos. La **Figura 4.23c** es una gráfica de residuales donde no se puede observar algún patrón a simple vista que indique que el modelo generado es incorrecto.

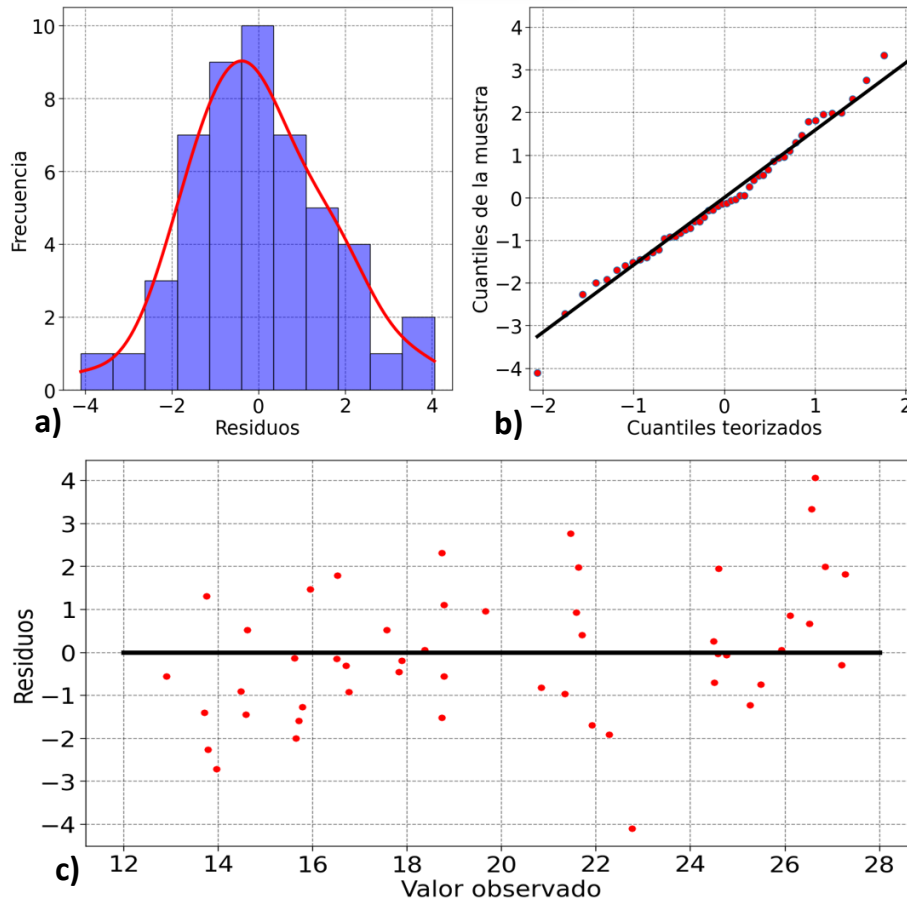


Figura 4.23: Distribución de los residuos de la regresión 2 (EXPTIME vs TD-TA, TE-TA e ID): **a)** histograma de la frecuencia de los residuos, **b)** gráfica de probabilidad normal de los residuos y **c)** residuos de la regresión.

4.4.4 Regresión lineal 3

El tercer análisis de regresión realizado en Ec. (4.4) fue entre la respuesta del sistema EXPTIME y la velocidad promedio del fluido VPRM. Los diferentes parámetros de operación y las diferencias de temperaturas están altamente relacionadas con la velocidad del fluido (más las segundas) y, además EXPTIME y VPRM están altamente relacionados (**Figura 4.24**), es por esto por lo que se realizó un modelo de regresión únicamente con VPRM.

Como se había mencionado en la **sección 4.3.2** la velocidad del fluido tiene un gran impacto en la respuesta del sistema, debido a la dirección en la que fluye y al tiempo en

que las diferentes especies químicas permanecen en las distintas regiones de temperatura (**Figura 3.1**), además en la **Figura 4.24** podemos observar que mientras mayor es la velocidad del fluido menor es la magnitud de EXPTIME.

Se puede predecir EXPTIME con solo controlar la velocidad del fluido, teniendo solo en cuenta los rangos de temperaturas utilizados, ya que dentro de estos rangos se encontró que mientras mayor es la velocidad del fluido, menor es EXPTIME y por lo tanto la eficiencia es mayor.

El modelo generado obtuvo un valor del coeficiente de determinación $R^2 = 0.758$ por lo que el modelo predice 75% de la variabilidad del sistema. La raíz del error cuadrático medio del modelo es $RMSE = 1.918$.

$$EXPTIME = -4.052VPROM + 20.118 \quad (4.4)$$

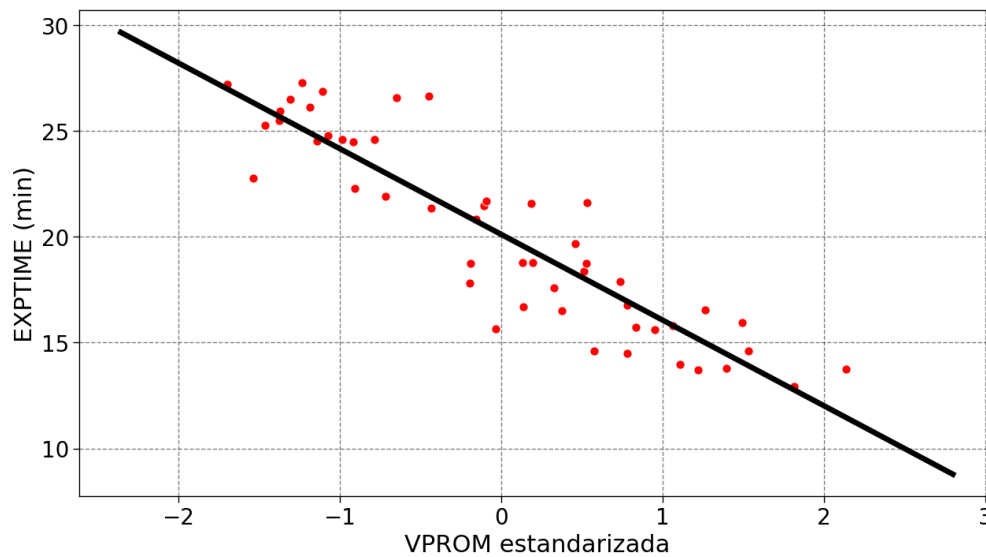


Figura 4.24: Línea de tendencia entre: EXPTIME vs VPROM estandarizada.

En la **Figura 4.25** se ilustra que la distribución de los residuos sigue una distribución normal (ambas gráficas). La **Figura 4.25b** es equivalente a la **Figura 4.25a** y ambas indican que los datos siguen una distribución normal (sesgo de ~ 0). La **Figura 4.25c** es

una gráfica de residuales donde no se puede observar algún patrón a simple vista que indique que el modelo generado es incorrecto.

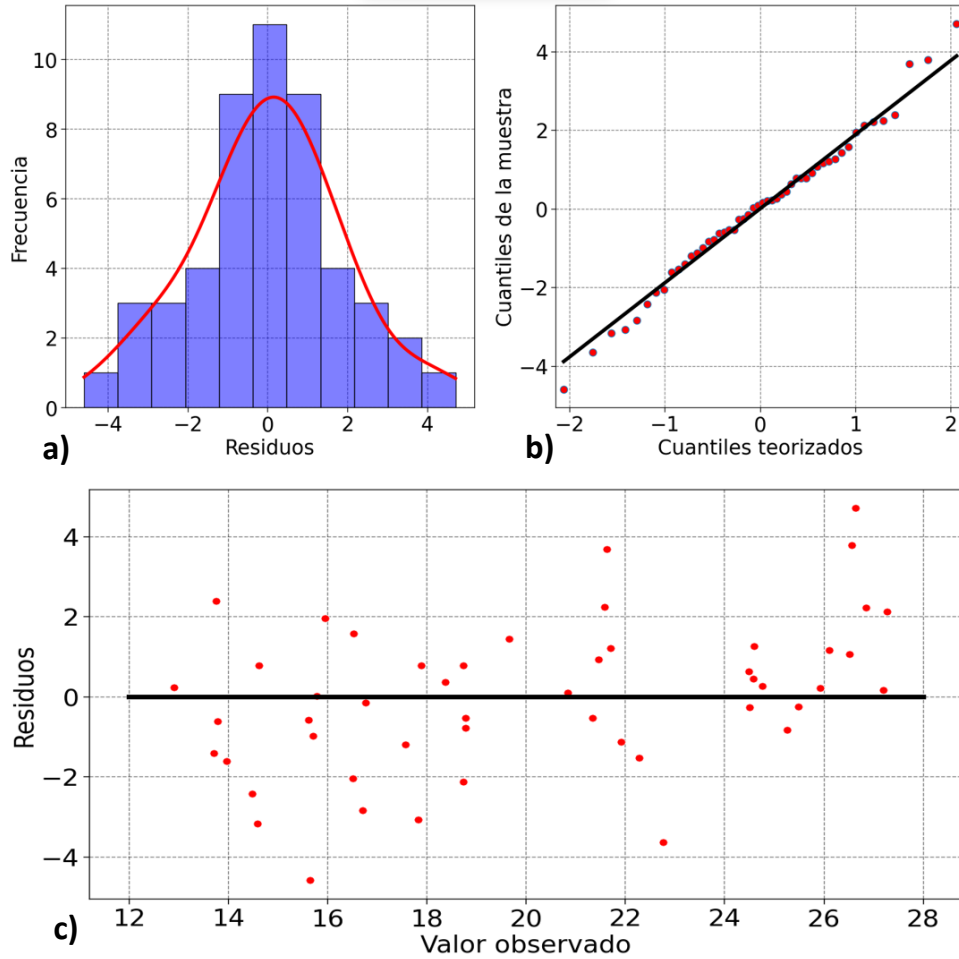


Figura 4.25: Distribución de los residuos de la regresión 3 (EXPTIME vs VPRM): **a)** histograma de la frecuencia de los residuos, **b)** gráfica de probabilidad normal de los residuos y **c)** residuos de la regresión.

4.5 Optimización

Los distintos parámetros de operación TD, TA, TE e ID del sistema microfluídico PCR (**sección 3.1**) tienen impacto en la respuesta del sistema EXPTIME (**sección 4.3.2**) y en la velocidad promedio del fluido VPRM (**sección 4.3.1**), a su vez estas dos últimas variables se encuentran estrechamente relacionadas y presentan una correlación positiva (**sección 4.3.1**). Sin embargo, las diferencias de temperaturas (TD-TA) y (TE-TA) tienen un mayor impacto en EXPTIME y VPRM, a comparación de las temperaturas en sí, debido a su estrecha relación con la velocidad del fluido.

Todas las simulaciones realizadas en el sistema elegido presentaron un flujo en sentido antihorario (**sección 4.1**) lo cual significa que parte de las especies químicas S_1P_2 y S_2P_1 ,

serán desnaturalizadas antes de que se presente la fase de extensión, además, la dirección del flujo causa que las especies químicas S_1 y S_2 se hibriden debido a que se está considerando el proceso de renaturalización, lo cual es un grave problema que provoca que las reacciones tomen más tiempo del debido, para solventar esto, se puede incrementar la velocidad del fluido, para ello se puede incrementar el diámetro interno de los capilares y las diferencias de temperaturas.

Las 3 mejores simulaciones se encontraron entre los 18-20 minutos de RTIME (**Tabla 4.1**), lo cual puede verse mejorado incrementando ID y la diferencia de temperaturas ($TE - TA$) o ($TD - TA$), ya sea incrementando TE o disminuyendo TA, más allá de los rangos utilizados en este trabajo, a excepción de TD (temperatura de desnaturalización), ya que esto dañaría las enzimas y las cadenas de ADN en un experimento real.

Los modelos de regresión generados son para una concentración en específico de los distintos reactivos (**Tabla 3.5**) pero debido a la idealidad del sistema, el encontrar los parámetros que hagan más eficiente la reacción, deberían de funcionar de forma igual o parecida para otras concentraciones, además se encontró que el segundo parámetro con mayor influencia en la respuesta del sistema, fue el diámetro interno de los capilares (debido a su relación directa con la velocidad del fluido). Las temperaturas TE y TD por si solas, no tienen un gran impacto en comparación, a pesar de ser parte importante en el modelo de reacciones escogido.

Conclusiones

Se implementó un modelo de simulación en elemento finito en COMSOL Multiphysics, esta implementación permite predecir la influencia termo-fluídica de los flujos por convección natural en la eficiencia de las reacciones PCR en un sistema microfluídico. En el cálculo de dinámica de fluidos, se agregó las ecuaciones de Navier-Stokes, ecuación de continuidad para mecánica de fluidos, ecuación de transporte de calor y transporte de especies diluidas.

El análisis gráfico y de regresión realizado (modelo de regresión lineal 2), muestran que mientras mayor es el diámetro interno del capilar ID y las diferencias de temperatura (TD-TA) y (TE-TA) más rápido se dan las reacciones en el sistema PCR, es por esto que las distintas fases del comportamiento de la concentración de los amplicones tardan menos tiempo en finalizar.

Se encontró que las variables (TD-TA), (TE-TA) e ID están relacionadas directamente con la velocidad del fluido y mientras mayor sean estas cantidades, mayor será la velocidad promedio del fluido (V_{PROM}), este incremento en V_{PROM} ayuda a mitigar el efecto de la alineación reversa y de la renaturalización, fenómenos que provocan que las reacciones del sistema PCR terminen en un mayor tiempo.

A pesar del inconveniente de la dirección obtenida los mejores tiempos en los que se llevó a cabo el proceso de la PCR fue de 18-21 minutos, el cual corresponde a un 52-60% menor al tiempo menor en que la mayoría de los dispositivos PCR llevan a cabo la amplificación (30-40 minutos). Además, el diseño compacto del dispositivo propuesto lo hacen viable para su fabricación, la cual debería resultar en bajos costos de fabricación.

Trabajo Futuro

1. Se buscarán otras geometrías que sean más eficientes para llevar a cabo la PCR.
2. Se simplificará la construcción de 3 temperaturas a 2.
3. Se importará la implementación de COMSOL MultiPhysics a ANSYS.
4. Se construirán los prototipos que mejores resultados hayan obtenido en las simulaciones.

Productos

2022 19th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control (CCE). Mexico City, Mexico. November 9-11, 2022

Simulation of PCR Kinetics in Convective Flow Systems

1st Luis C. Olivares-Rueda
*Facultad de Ciencias Físico-
Matemáticas
BUAP*
Puebla, México
luisolivares1001@outlook.com

2nd Aldo Y. Tenorio-Barajas
*Facultad de Ciencias Físico-
Matemáticas
BUAP*
Puebla, México
aytenorio@cinestav.mx

3rd Claudia O. Mendoza-Barrera
*Facultad de Ciencias Físico-
Matemáticas
BUAP*
Puebla, México
cmendoza@fcfm.buap.mx

4th Víctor M. Altúzar-Aguilar
*Facultad de Ciencias Físico-
Matemáticas
BUAP*
Puebla, México
valtuzar@gmail.com

Abstract—PCR analysis is one of the most widely used techniques for molecular diagnosis due to its high specificity and sensitivity. This technique subjects a mixture of enzymes and nucleic acids to thermal cycling to amplify DNA fragments. However, one of the main limitations is the development time of new and better devices which can be expensive. Computer simulation is required for a faster and cheaper way to design, test, and optimize new devices. We present a numerical analysis of a microfluidic device that generates convection flows through constant temperature gradients in capillary tubes. This model can predict the temperature gradients, flow velocity, pressure, species transport, species concentration and the PCR reactions in the device. We observed that thermal gradients affect the PCR amplification speed due to the generated flow rates which determine the time that the sample is in the different temperature zones.

- Extension: At approximately 75°C DNA polymerases extend the primer DNA in the presence of dNTPs to synthesize the complementary DNA sequence.

Microfluidic devices for PCR have a significant advantage over traditional devices due to their small size, smaller volumes are used which makes changes in temperature faster and easier to perform and maintain [3], [4]. Multiple designs have been developed such as continuous flow PCR [4], [5] and convective flow PCR [3], [6], [7] devices.

Efficient design of this kind of devices is necessary but it takes a lot of time and efforts to accomplish. Given that, computer simulation is needed to accelerate the process of designing and optimizing microfluidic devices. In this work we

Bibliografía

- [1] R. K. Saiki *et al.*, “Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia”. [En línea]. Disponible en: www.sciencemag.org
- [2] T. Han, H. Cong, Y. Shen, y B. Yu, “Recent advances in detection technologies for COVID-19”, *Talanta*, vol. 233. Elsevier B.V., el 1 de octubre de 2021. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122609.
- [3] D. Sidransky, “Nucleic acid-based methods for the detection of cancer”, *Science*, vol. 278, núm. 5340. pp. 1054–1058, el 7 de noviembre de 1997. doi: 10.1126/science.278.5340.1054.
- [4] C. Toma *et al.*, “Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*”, *J Clin Microbiol*, vol. 41, núm. 6, pp. 2669–2671, jun. 2003, doi: 10.1128/JCM.41.6.2669-2671.2003.
- [5] J. Beige *et al.*, “Clinical Evaluation of a Mycobacterium tuberculosis PCR Assay”, 1995. [En línea]. Disponible en: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
- [6] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, y R. Watson, “Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions”, *Bio/Technology*, vol. 11, núm. 9, pp. 1026–1030, 1993, doi: 10.1038/nbt0993-1026.
- [7] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, y P. M. Williams, “Real Time Quantitative PCR”.
- [8] K.-J. Bathe, “FINITE ELEMENT METHOD”, *Wiley Encyclopedia of Computer Science and Engineering*, jun. 2008, doi: <https://doi.org/10.1002/9780470050118.ecse159>.
- [9] J. N. Reddy, *Introduction to the Finite Element Method*, 4a ed. MC Graw Hill Education. [En línea]. Disponible en: <http://mechanics.tamu.edu>.
- [10] J. M. S. Bartlett y D. Stirling, “Methods in Molecular Biology TM Methods in Molecular Biology TM PCR Protocols SECOND EDITION Edited by PCR Protocols SECOND EDITION”.
- [11] M. A. Innis, *PCR protocols : a guide to methods and applications*. Academic Press, 1990.
- [12] P. Turnpenny y S. Ellard, *Emery’s ELEMENTS of MEDICAL GENETICS*, 15a ed. ELSEVIER, 2017.
- [13] “1024px-DNA_Structure+Key+Labelled.pn_NoBB.png (1024×1016)”. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4c/DNA_Structure%2BKey%2BLabelled.pn_NoBB.png/1024px-

DNA_Structure%2BKey%2BLabelled.pn_NoBB.png?1671748315694 (consultado el 21 de diciembre de 2022).

- [14] "Gallery". <https://app.biorender.com/> (consultado el 25 de octubre de 2022).
- [15] J. A. Kim *et al.*, "Fabrication and characterization of a PDMS-glass hybrid continuous-flow PCR chip", en *Biochemical Engineering Journal*, abr. 2006, vol. 29, núm. 1–2, pp. 91–97. doi: 10.1016/j.bej.2005.02.032.
- [16] B. C. Giordano, J. Ferrance, S. Swedberg, A. F. R. Hühmer, y J. P. Landers, "Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds", *Anal Biochem*, vol. 291, núm. 1, pp. 124–132, abr. 2001, doi: 10.1006/abio.2000.4974.
- [17] N. Agrawal, Y. A. Hassan, y V. M. Ugaz, "A Pocket-Sized Convective PCR Thermocycler", *Angewandte Chemie*, vol. 119, núm. 23, pp. 4394–4397, jun. 2007, doi: 10.1002/ange.200700306.
- [18] M. Krishnan, N. Agrawal, M. A. Burns, y V. M. Ugaz, "Reactions and fluidics in miniaturized natural convection systems", *Anal Chem*, vol. 76, núm. 21, pp. 6254–6265, nov. 2004, doi: 10.1021/ac049323u.
- [19] P. Neuzil, L. Novak, J. Pipper, S. Lee, L. F. P. Ng, y C. Zhang, "Rapid detection of viral RNA by a pocket-size real-time PCR system", *Lab Chip*, vol. 10, núm. 19, pp. 2632–2634, oct. 2010, doi: 10.1039/c004921b.
- [20] L. He, B. Sang, y W. Wu, "Battery-powered portable rotary real-time fluorescent qPCR with low energy consumption, low cost, and high throughput", *Biosensors (Basel)*, vol. 10, núm. 5, 2020, doi: 10.3390/BIOS10050049.
- [21] M. U. Kopp, A. J. de Mello, y A. Manz, "Continuous-Flow PCR on a Chip concept of a chemical amplifier for DNA", 1998. [En línea]. Disponible en: www.sciencemag.org
- [22] B. L. Fernández-Carballo *et al.*, "Low-cost, real-time, continuous flow PCR system for pathogen detection", *Biomed Microdevices*, vol. 18, núm. 2, abr. 2016, doi: 10.1007/s10544-016-0060-4.
- [23] Matthew. Laudon, B. F. Romanowicz, y Nano Science and Technology Institute., *Multi-physics Simulational Analysis of a Novel PCR Micro-Device*. Nano Science and Technology Institute, 2007.
- [24] V. E. Papadopoulos, G. Kokkoris, I. N. Kefala, y A. Tserepi, "Comparison of continuous-flow and static-chamber μ PCR devices through a computational study: the potential of flexible polymeric substrates", *Microfluid Nanofluidics*, vol. 19, núm. 4, pp. 867–882, oct. 2015, doi: 10.1007/s10404-015-1613-1.
- [25] H. D. (Hans D. Baehr y K. (Karl) Stephan, *Heat and mass-transfer*. Springer, 2006.

- [26] G. B. Arfken, H. J. Weber, y F. E. Harris, "MATHEMATICAL METHODS FOR PHYSICISTS SEVENTH EDITION".
- [27] H. Bruus, "Theoretical microfluidics".
- [28] "R. Byron Bird, Warren E. Stewart, Edwin N. Lightfoot - Transport phenomena-J. Wiley (2002)".
- [29] N. Forinash, "Solution of the Navier-Stokes Equations by the Finite Element Method Using Reduced Order Modeling", 2012.
- [30] "KIMBLE® MICROCAPS® Capillary Tube | DWK Life Sciences".
<https://www.dwk.com/na/kimble-microcaps-capillary-tube> (consultado el 1 de noviembre de 2022).
- [31] "New and Used Laboratory Equipment for Sale, Auctions, Wanted | LabX".
<https://www.labx.com/> (consultado el 21 de enero de 2023).
- [32] "PCR Master Mix". <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/pcr-master-mix> (consultado el 20 de febrero de 2023).
- [33] J. O. Rawlings, S. G. Pantula, y D. A. D. Springer, "Applied Regression Analysis: A Research Tool, Second Edition".

Apéndices

Apéndice 1

Dos identidades importantes fueron utilizadas para la deducción de las ecuaciones utilizadas en este trabajo, estas ecuaciones son: el teorema de la divergencia de Gauss Ec. (A1.1) [26] y la primera identidad de Green Ecs. (A1.2 y A1.3) [26], [29].

$$\iiint_{\Omega} (\nabla \cdot \mathbf{F}) dV = \iint_{\partial\Omega} (\mathbf{F} \cdot \mathbf{n}) dA \quad (\text{A1.1})$$

$$\iiint_{\Omega} \psi \Delta \phi + \nabla \psi \cdot \nabla \phi dV = \iint_{\partial\Omega} \psi (\nabla \phi \cdot \mathbf{n}) dA \quad (\text{A1.2})$$

$$\iiint_{\Omega} \Delta \boldsymbol{\phi} \cdot \boldsymbol{\psi} + \nabla \boldsymbol{\phi} : \nabla \boldsymbol{\psi} dV = \iint_{\partial\Omega} (\nabla \boldsymbol{\phi} \cdot \mathbf{n}) \cdot \boldsymbol{\psi} dA \quad (\text{A1.3})$$

De las Ecs. (A1.1) a (A1.3), \mathbf{F} , $\boldsymbol{\phi}$, $\boldsymbol{\psi}$ son funciones vectoriales y ψ , ϕ son funciones escalares, Ω es un dominio dado, $\partial\Omega$ es la superficie que encierra el dominio dado y \mathbf{n} es el vector normal unitario a la superficie $\partial\Omega$.

La definición del doble producto punto es la siguiente (A1.4) [29]:

$$\nabla \boldsymbol{\phi} : \nabla \boldsymbol{\psi} = \sum_{i,j} \partial_j \phi_i \partial_j \psi_i \quad (\text{A1.4})$$

Apéndice 2

2.1 Construcción detallada de la simulación en COMSOL Multiphysics

A continuación, se mostrará el desarrollo de la implementación en COMSOL Multiphysics de un sistema simplificado, cabe aclarar que el proceso seguido en este ejemplo fue el mismo que el usado para la geometría del sistema PCR microfluídico del presente trabajo, solo cambia la geometría. Los modelos matemáticos y condiciones vistos en las secciones anteriores se configuran en COMSOL.

El software utilizado fue en su versión en idioma inglés, además de que la mayor parte de la documentación de este software se encuentra en ese mismo idioma, es por esto que esta sección mezcla cosas de ambos idiomas, ya que lo que se busca es guiar al lector en el proceso de construcción de la implementación del problema en la versión en inglés del software utilizado.

2.1.1 Inicialización, geometría, materiales y mallado

Primero se inicializa el software de simulación multi-física el cual cuenta con una interfaz gráfica (**Figura A2.1** y **Figura A2.2**).

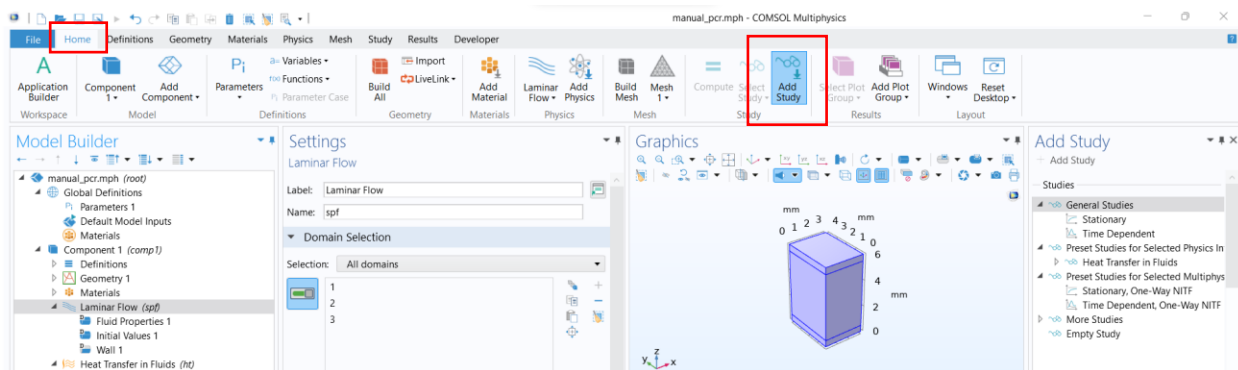


Figura A2.1: Captura 1 de pantalla del proceso de la implementación en COMSOL 13. Geometría generada para el ejemplo de este apéndice.

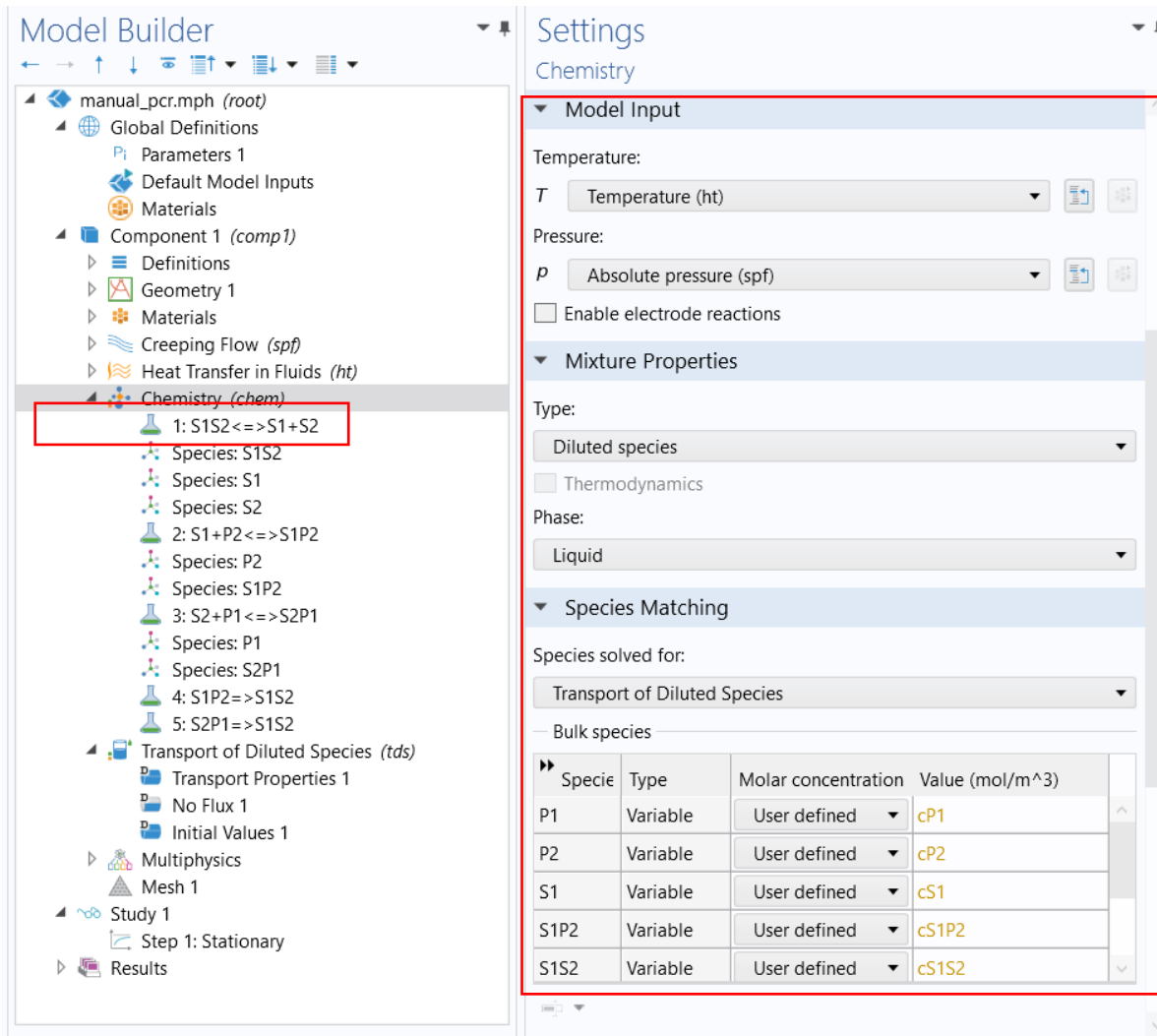


Figura A2.2: Captura 2 de pantalla del proceso de la implementación en COMSOL.

1. Abrir COMSOL Multiphysics
2. Seleccionar Blank Model
3. Model Builder → Click derecho en Untitled.mph (root) → Add Component → 3D.

Lo siguiente es construir la geometría del sistema, para este apartado se utiliza una geometría simplificada.

4. Model Builder → Click en Geometry 1
 - i. length unit: m a mm (se trabajará en milímetros)
 - ii. Marcar: Scale values when changing units
 Model Builder → Click derecho en Geometry 1 → Block
5. Model Builder → Click derecho en Block 1 (blk1) → Duplicate
6. Model Builder → Click derecho en Block 1 (blk1) → Duplicate

Los bloques construidos corresponden a los del dominio del fluido y las paredes.

7. Model Builder → En el apartado Geometry 1: Click en Block 1 (blk1) (Pared 1)
 - i. Size and Shape
 - a) Width: 3
 - b) Depth: 4
 - c) Height: 0.5

Model Builder → En el apartado Geometry 1: Click en Block 2 (blk2) (Fluido)

- ii. Size and Shape
 - a) Width: 3
 - b) Depth: 4
 - c) Height: 5
- iii. Position
 - a) x: 0
 - b) y: 0
 - c) z: 0.5

Model Builder → En el apartado Geometry 1: Click en Block 3 (blk3) (Pared 2)

- iv. Size and Shape
 - a) Width: 3
 - b) Depth: 4
 - c) Height: 0.5
- v. Position
 - a) x: 0
 - b) y: 0
 - c) z: 5.5

8. Model Builder → Click en Geometry 1 → Build All

Lo que sigue es escoger los materiales de los cuales estarán constituidos los dominios y asignarle al material sus dominios en específico.

9. Model Builder → Click derecho en Materials → Add Material from library

10. Add Material → Buscar:

- i. Water (Agua) → Built-in → Doble click en Water, liquid
- ii. Add Material → Borosilicate (Borosilicato).

Se asignan materiales a los dominios.

11. Model Builder → Materials → Click en Water, liquid

- i. Geometric identity selection → 2

12. Model Builder → Materials → Click en Borosilicate

- i. Geometric identity selection → 1 y 3

A continuación, se malla el sistema automáticamente con un mallado “más fino”.

13. Se malla el sistema automáticamente.

Click en Mesh 1

- i. Element Size: Finer
- ii. Click en build all

2.1.2 Parte Termo-Fluídica

Para la parte termo-fluídica del sistema se tienen que importar los módulos correspondientes y configurarlos con las condiciones anteriormente vistas. Los módulos utilizados ya cuentan con distintas ecuaciones guardadas, estas ecuaciones representan fenómenos físicos como el transporte de calor y mecánica de fluidos, los cambios que se pueden realizar a estas ecuaciones son pequeños y son opciones predefinidas, como lo es la inclusión de los efectos de la fuerza de gravedad en las ecuaciones de Navier-Stokes.

1. Model Builder → Click derecho en Component 1 (comp1) → Add Physics
2. Add Physics → Buscar: Laminar Flow
 - i. Click en Nonisothermal Flow (Este módulo nos exporta el de transferencia de calor y de mecánica de fluidos) → Doble click en Laminar Flow

Se configura el tipo de simulación que se requiere, en este caso un estudio estacionario.

3. Click en Home → Add Study
 - i. Doble click en Stationary
4. Model Builder → Click en Multiphysics → Flow heating → Desmarcar: Include viscous dissipation (No se incluye disipación por viscosidad)

Se configura el módulo de mecánica de fluidos con las condiciones vistas en el **capítulo 3 Ec. (3.10)**.

5. Model Builder → Click en Laminar Flow (Este módulo viene con las ecuaciones de Navier-Stokes)
 - i. Domain Selection → 2
 - ii. Physical Model → Marcar: Neglect inertial term (se omite el término inercial) e Include gravity (se considera la fuerza de la gravedad)
 - iii. Reference pressure level: 1[atm] (presión de referencia de 1atm)

El módulo de Laminar Flow pasa a ser Creeping Flow.

6. Model Builder → En el apartado Creeping Flow
 - i. Initial Values 1 → Pressure: 1[atm] (Condición inicial de la presión de 1atm)
7. Model Builder → Click derecho en Creeping Flow → Points → Pressure Point Constraint (se constriñe un punto a una presión de 1atm)
 - i. En el apartado Creeping Flow → Pressure Point Constraint
 - a) Point Selection: 3
 - b) Pressure: 1[atm]

Se configura el módulo de transferencia de calor con las condiciones anteriormente vistas. Primero se asigna que elementos son sólidos y cuales líquidos.

8. Model Builder → Click derecho en Heat Transfer in Fluids → Solids

9. Model Builder → En el apartado Heat Transfer in Fluids → Solid 1
 - i. Domain Selection: 1 y 3 (Se definen los dominios correspondientes a los sólidos o paredes.

Se crean las condiciones de frontera isothermas, correspondientes a una temperatura de desnaturalización (“caliente”) y alineación (“fría”). En este ejemplo se muestran dos fronteras isothermas, para la simulación del sistema PCR microfluídico se utilizaron 3, esta tercera frontera corresponde a la temperatura de extensión Ec. (3.24).

10. Model Builder → Click derecho en Heat Transfer in Fluids → Temperature
11. Model Builder → Click derecho en Heat Transfer in Fluids → Temperature
12. Model Builder → En el apartado Heat Transfer in Fluids → Temperature 1
 - i. Boundary Selection: 3
 - ii. Temperature: TD (temperatura de desnaturalización)
13. Model Builder → En el apartado Heat Transfer in Fluids → Temperature 2
 - i. Boundary Selection: 10
 - ii. Temperature: TA (temperatura de alineación)

2.1.3 Transporte de especies y reacciones PCR

Se calcula el promedio de especies químicas a lo largo del tiempo, con la función $aveop1()$ en el estudio dependiente del tiempo, la temperatura y velocidad promedio en el sistema con la misma función, en el estudio estacionario. Esto se guarda en una tabla (**Tabla A2.1**) junto con los coeficientes de reacción. Los coeficientes de reacción en COMSOL requieren que las cantidades que se suman o restan a la temperatura, tengan que ser transformados a Kelvin, esto nos deja con los siguientes coeficientes de reacción Ecs. (A2.1) a (A2.5).

Esta parte de la simulación tiene más posibilidades de personalización ya que COMSOL permite introducir modelos de reacciones químicas irreversibles o reversibles, junto con coeficientes de reacción dependientes de la temperatura o del alguna otra magnitud física. Sin embargo, el módulo que se encarga del modelo de transporte de especies apenas y se puede modificar con algunas opciones predefinidas tal y como lo es el considerar los efectos de convección del campo de velocidad del fluido.

$$k_D^+(T) = \frac{k_0^+}{2} \left(1 + \tanh \left(\frac{T-361.15}{5} \right) \right) \quad (A2.1)$$

$$k_D^-(T) = \frac{k_0^-}{2} \left(1 + \tanh \left(-\frac{T-348.15}{5} \right) \right) \quad (A2.2)$$

$$k_A^+(T) = \frac{k_1^+}{2} \left(1 + \tanh \left(-\frac{T-335.65}{5} \right) \right) \quad (A2.3)$$

$$k_A^-(T) = \frac{k_1^-}{2} \left(1 + \tanh \left(\frac{T-339.15}{5} \right) \right) \quad (A2.4)$$

$$k_E(T) = k_2 \exp\left(-\left(\frac{T-343.15}{5}\right)^2\right) \quad (\text{A2.5})$$

1. Model Builder → Click derecho en Definitions → Variables
Introducir Name y Expression de la **Tabla A2.1**

Tabla A2.1: Tabla de variables insertados en COMSOL junto con su definición.

Name	Expression	Definición
av_S1S2	aveop1(cS1S2)	Cálculo de la concentración promedio de S ₁ S ₂ .
av_S1P2	aveop1(cS1P2)	Cálculo de la concentración promedio de S ₁ P ₂ .
av_S2P1	aveop1(cS2P1)	Cálculo de la concentración promedio de S ₂ P ₁ .
av_S1	aveop1(cS1)	Cálculo de la concentración promedio de S ₁ .
av_S2	aveop1(cS2)	Cálculo de la concentración promedio de S ₂ .
av_P1	aveop1(cP1)	Cálculo de la concentración promedio de P ₁ .
av_P2	aveop1(cP2)	Cálculo de la concentración promedio de P ₂ .
av_VPROM	aveop1(nitf1.U)	Cálculo de la concentración promedio (VPROM).
av_TPROM	aveop1(nitf1.T)	Cálculo de la concentración promedio (TPROM).
kd_plus	(k0_plus/2)*(1+tanh((T-361.15[K])/5[K]))	Ec. (A2.1)
kd_minus	(k0_minus/2)*(1+tanh(-(T-348.15[K])/5[K]))	Ec. (A2.2)
ka_plus	(k1_plus/2)*(1+tanh(-(T-335.65[K])/5[K]))	Ec. (A2.3)
ka_minus	(k1_minus/2)*(1+tanh((T-339.15[K])/5[K]))	Ec. (A2.4)
Ke	k2*exp(-((T-343.15[K])/5[K])^2)	Ec. (A2.5)

Otras constantes como los factores de proporción, Ecs. (2.46) a (2.50), de los coeficientes de reacción, Ecs. (A2.1) a (A2.5) son almacenados en tablas (**Tabla A2.2**), al igual que las temperaturas aplicadas en las fronteras de temperatura isothermas, coeficientes de difusividad y concentraciones iniciales de los reactivos.

2. Model Builder → Global Definitions → Parameters 1
Introducir Name y Expression de la **Tabla A2.2**

Tabla A2.2: Tabla de parámetros insertados en COMSOL junto con su definición.

Name	Expression	Definición
Diff_S1S2	1e9[m^2/s]	Coficiente de difusividad de S ₁ S ₂ .

Diff_S1andS2	1e10[m ² /s]	Coeficiente de difusividad de S ₁ y S ₂ .
Diff_P1andP2	1e10[m ² /s]	Coeficiente de difusividad de P ₁ y P ₂ .
Diff_S1P2andS2P1	1e10[m ² /s]	Coeficiente de difusividad de S ₁ P ₂ y S ₂ P ₁ .
TD	98[degC]	Temperatura de desnaturalización.
TA	55[degC]	Temperatura de alineación.
k0_plus	12.5[1/s]	Ec. (2.46)
k0_minus	1e6[1/s][1/M]	Ec. (2.47)
k1_plus	5e6[1/s][1/M]	Ec. (2.48)
k1_minus	1e-4[1/s]	Ec. (2.49)
k2	0.32[1/s]	Ec. (2.50)
S1_init	0[M]	Concentración inicial de S ₁ .
S2_init	0[M]	Concentración inicial de S ₂ .
S1P2_init	0[M]	Concentración inicial de S ₁ P ₂ .
S2P1_init	0[M]	Concentración inicial de S ₂ P ₁ .
S1S2_init	5.71e-10[M]	Concentración inicial de S ₁ S ₂ .
P1_init	3e-5[M]	Concentración inicial de P ₁ .
P2_init	3e-5[M]	Concentración inicial de P ₂ .

Se crean los dominios en los cuales se van a calcular los promedios para diferentes cantidades: concentración de las distintas especies químicas (S₁S₂, S₁ y S₂, P₁ y P₂, y S₁P₂ y S₂P₁) y la temperatura y velocidad promedio en el fluido.

3. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe
 - i. Source Selection: 2
 - ii. Expression: cS1S2
4. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe
 - i. Source Selection: 2
 - ii. Expression: cS1
5. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe
 - i. Source Selection: 2
 - ii. Expression: cS2
6. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe
 - i. Source Selection: 2
 - ii. Expression: cP1
7. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe
 - i. Source Selection: 2
 - ii. Expression: cP2
8. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe
 - i. Source Selection: 2
 - ii. Expression: cS1P2
9. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe

- i. Source Selection: 2
 - ii. Expression: $cP1S2$
10. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe
- i. Source Selection: 2
 - ii. Expression → Expression: $spf.U$
 - iii. Expression → Table and plot unit: mm/s
11. Model Builder → Click derecho en Definitions → Probes → Domain Probe
- i. Source Selection: 2
 - ii. Expression → Expression: $ht.T$
 - iii. Expression → Table and plot unit: degC

Se agregan los módulos de química y de transporte de especies.

12. Model Builder → Click derecho en Component 1 (comp1) → Add Physics
- i. Add Physics → Buscar y doble click en: Chemistry y Transport of Diluted Species

Se introduce el modelo de cinética de reacciones PCR Ecs. (2.36) a (2.40), Ecs. (2.46) a (2.50) y Ecs. (A2.1) a (A 2.5).

13. Model Builder → Click derecho en Chemistry → Reaction
- i. Model Builder → Reaction 1
 - a) Reaction Formula: $S1S2 \rightleftharpoons S1+S2$ → Apply, Ec. (2.36)
 - b) Reaction thermodynamic properties → Heat source of reaction → User defined: 0
 - c) Rate constants
 - I. kf: kd_plus
 - II. kr: kd_minus
14. Model Builder → Click derecho en Chemistry → Reaction
- i. Model Builder → Reaction 2
 - a) Reaction Formula: $S1+P2 \rightleftharpoons S1P2$ → Apply, Ec. (2.37)
 - b) Reaction thermodynamic properties → Heat source of reaction → User defined: 0
 - c) Rate constants
 - I. kf: ka_plus
 - II. kr: ka_minus
15. Model Builder → Click derecho en Chemistry → Reaction
- i. Model Builder → Reaction 3
 - a) Reaction Formula: $S2+P1 \rightleftharpoons S2P1$ → Apply, Ec. (2.38)
 - b) Reaction thermodynamic properties → Heat source of reaction → User defined: 0
 - c) Rate constants
 - I. kf: ka_plus
 - II. kr: ka_minus
16. Model Builder → Click derecho en Chemistry → Reaction

- i. Model Builder → Reaction 3
 - a) Reaction Formula: $S_1P_2 \Rightarrow S_1S_2$ → Apply, Ec. (2.39)
 - b) Reaction thermodynamic properties → Heat source of reaction → User defined: 0
 - c) Rate constants
 - I. kf: ke
- 17. Model Builder → Click derecho en Chemistry → Reaction
 - i. Model Builder → Reaction 3
 - a) Reaction Formula: $S_2P_1 \Rightarrow S_1S_2$ → Apply, Ec. (2.40)
 - b) Reaction thermodynamic properties → Heat source of reaction → User defined: 0
 - c) Rate constants
 - I. kf: ke

Se termina de configurar el módulo de química, mandando a llamar los datos de temperatura y velocidad en el fluido de los módulos de transferencia de calor y de mecánica de fluidos.

- 18. Model Builder → Chemistry
 - i. Calculate Transport Properties
 - a) Desemmarcar: Calculate mixture properties
 - ii. Model Input
 - a) Temperature: Temperature (ht) (Campo de temperaturas del módulo de transferencia de calor)
 - b) Pressure: (Absolute pressure spf)
 - iii. Mixture Properties
 - a) Phase: Liquid (Se especifica que las especies están diluidas en un líquido)
 - b) Species Matching: Transport of Diluted Species (Se enlaza el módulo de química con el de transporte de especies diluidas)

Se configura el módulo de transporte de especies, se introducen las múltiples especies químicas (S_1S_2 , S_1 y S_2 , P_1 y P_2 , y S_1P_2 y S_2P_1), se incluye el término de convección.

- 19. Model Builder → Transport of Diluted Species (tds)
 - i. Domain Selection: 2
 - ii. Transport Mechanisms → Marcar: convection (se incluye el término de convección)
 - iii. Dependent Variables: cS_1S_2 , cS_1 , cS_2 , cP_1 , cP_2 , cS_1P_2 , cS_2P_1 (Se introducen las 7 especies químicas: S_1S_2 , S_1 y S_2 , P_1 y P_2 , y S_1P_2 y S_2P_1)

Se introducen los coeficientes de difusividad (**Tabla 3.5**) de las distintas especies químicas ya mencionadas y se configuran los campos de velocidad y temperatura utilizados.

- 20. Model Builder → Transport of Diluted Species (tds) → Transport Properties

- i. Model Input → Temperature: Temperature (ht) (Se llama al campo de temperaturas del módulo de transferencia de calor)
- ii. Convection → Velocity Field: Velocity Field (spf) (Se llama al campo de velocidades del módulo de mecánica de fluidos)
- iii. Diffusion → Material: Water, Liquid (mat1) (Se especifica que la difusividad ocurre en agua)
- iv. Diffusion → Diffusion coefficient (Coeficientes de difusividad):
 - a) DcP1: Diff_P1 (Coeficiente de difusividad de P_1)
 - b) DcP2: Diff_P2 (Coeficiente de difusividad de P_2)
 - c) DcS1: Diff_S1 (Coeficiente de difusividad de S_1)
 - d) DcS2: Diff_S2 (Coeficiente de difusividad de S_2)
 - e) DcS1P2: Diff_S1P2 (Coeficiente de difusividad de S_1P_2)
 - f) DcS2P1: Diff_S2P1 (Coeficiente de difusividad de S_2P_1)
 - g) DcS1S2: Diff_S1S2 (Coeficiente de difusividad de S_1S_2)

Model Builder → Transport of Diluted Species (tds) → No Flux 1 → Convection → Marcar: Include (Se incluye el fenómeno de convección nuevamente)

Se introducen las concentraciones iniciales (**Tabla 3.5**) de las diferentes especies químicas.

21. Model Builder → Transport of Diluted Species (tds) → Initial values:

- i. cP1: P1_init (Concentración inicial de P_1)
- ii. cP2: P2_init (Concentración inicial de P_2)
- iii. cS1: S1_init (Concentración inicial de S_1)
- iv. cS2: S2_init (Concentración inicial de S_2)
- v. cS1P2: S1P2_init (Concentración inicial de S_1P_2)
- vi. cS2P1: S2P1_init (Concentración inicial de S_2P_1)
- vii. cS1S2: S1S2_init (Concentración inicial de S_1S_2)

22. Model Builder → Click derecho Transport of Diluted Species (tds) → Reactions (Se define el dominio donde se van a dar las reacciones)

- i. Model Builder → Transport of Diluted Species (tds) → Reactions 1
 - a) Domain Selection: 2
 - b) Reaction Rates: Emparejarlos con sus respectivas especies.

2.1.4 Realización de las simulaciones

Se realizan las simulaciones configurando los estudios estacionario y dependiente del tiempo, el primero se realiza con los módulos de mecánica de fluidos, de transporte de calor y de flujo no isoterma (el módulo de flujo no isoterma acopla el de mecánica de fluidos y el de transporte de calor), el segundo se hace con el módulo de química y de transporte de especies.

- 1. Home → Add Study
 - i. Add Study → Doble click: Time dependent

2. Model Builder → Study 1 → Step 1 Stationary → Physics and variables selection
 - i. Marcar: Creeping Flow (spf), Heat Transfer in Fluids (ht), Nonisothermal Flow 1 (nitf1)
3. Model Builder → Study 2 → Step 1 Time dependent → Physics and variables selection
 - i. Marcar: Chemistry (chem), Transport of Diluted Species (tds)

Para el estudio dependiente del tiempo se utilizan los campos de temperatura y velocidad generados en el dispositivo, durante el estudio estacionario y se configura el paso en el tiempo de 1 minuto de 0 a 60 minutos.

4. Model Builder → Study 2 → Step 1 Time dependent → Values and dependent variables
 - i. Study settings:
 - a) Time unit: min (Se escogen minutos como el paso en el tiempo)
 - b) Range: (0,1,60) (Se escoge el intervalo de 0 a 60 minutos con pasos de 1 minuto)

Se manda a llamar la solución del estudio estacionario para usarla en el dependiente del tiempo, recordemos que el estudio estacionario calcula los campos de temperatura y velocidad en el dispositivo.

- ii. Values of variables not solved for:
 - a) Settings: User controlled
 - b) Method: Solution
 - c) Study: Study 1
 - d) Selection: Last

Se realizan las simulaciones.

5. Home → Study 1 → Compute
6. Home → Study 2 → Compute

Apéndice 3

Se muestra el código implementado en Python, para el cálculo de las pendientes del logaritmo de la concentración normalizada de S_1S_2 en la fase exponencial en la **sección 4.1** y la **Tabla 4.1**.

```
# Librerías requeridas

import numpy as np
import pandas as pd
import statsmodels.api as sm

# Se carga los datos con pandas y se eliminan los nan values.

ID79_986574 = pd.read_csv('079ID/079ID_concentration_986574.csv')
ID79_986574.head(0)

# Se transforma la concentración de S1S2 mediante el logaritmo
# Se define el intervalo de tiempo en que dura la fase exponencial

time = ID79_986574['Time']
con = ID79_986574['S1S2']
log_con = np.log10(con/con[0])
log_con_dt = np.gradient(log_con, time)
time_interval = (time ≥ 9)&(time ≤ 22)
con[time_interval].values[-1]

# Se realiza la regresión lineal con la función sm.OLS y se guardan los resultados de la regresión

t = sm.add_constant(time[time_interval])
reg = sm.OLS(log_con[time_interval], t).fit()
const, slope = reg.params
reg.summary()

print('986574')
print('Slope: ', round(slope, 5))
print('Taken Time: ', round(time[time_interval].to_numpy()[-1], 5))
print('Slope Scored: ', round(slope/time[time_interval].to_numpy()[-1], 5))
```

Apéndice 4

Se muestra el código implementado en Python para la realización de las gráficas de dispersión junto con sus líneas de tendencia mostrados en distintas secciones (**sección 4.3**).

```
# Librerías requeridas

import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns

plt.style.use(['nature', 'grid', 'notebook'])

# Se carga los datos con pandas y se eliminan los nan values.

df = pd.read_excel('Book1.xlsx')
df.dropna(axis=0, inplace=True)
df.head()

# Con matplotlib se crea la matriz de gráficos y se editan atributos como los títulos.
# Con seaborn se rellena la matriz de gráficos utilizando sns.regplot

fig, (ax0, ax1) = plt.subplots(nrows=1, ncols=2, figsize=(17, 10))
fig.suptitle('Relación entre variables de respuesta', fontsize=20)

sns.regplot(data=df, x='SLOPELOGC', y='EXPTIME', ax=ax0, scatter_kws={'s':20, 'color':'red'})
ax0.set_xlabel('Slope-Log-dsDNA (1/min)')
ax0.set_ylabel('EXPTIME (min)')
ax0.set_title('EXPTIME vs Slope-Log-dsDNA')

sns.regplot(data=df, x='RTIME', y='EXPTIME', ax=ax1, scatter_kws={'s':20, 'color':'red'})
ax1.set_xlabel('RTIME (min)')
ax1.set_ylabel(r'EXPTIME (min)')
ax1.set_title('EXPTIME vs RTIME')

plt.show()
```

Aquí se muestra el código implementado en Python, para la realización de los histogramas de distribución de la **sección 4.3**.

```

# Librerías requeridas

import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns

plt.style.use(['nature', 'grid', 'notebook'])

# Se carga los datos con pandas y se eliminan los nan values.

df = pd.read_excel('Book1.xlsx')
df.dropna(axis=0, inplace=True)
df.head()

# Con matplotlib se crea la matriz de gráficos y se editan atributos como los títulos.
# Con seaborn se rellena la matriz de gráficos utilizando sns.histplot.

fig, (ax0, ax1, ax2) = plt.subplots(nrows=1, ncols=3, figsize=(17, 10))
fig.suptitle('Distribución de las variables de respuesta', fontsize=20)

sns.histplot(data=df, x='SLOPELOGC', ax=ax0)
ax0.set_xlabel('Slope-Log-dsDNA (1/min)')
ax0.set_ylabel('Frecuencia')
ax0.set_title('Distribución de Slope-Log-dsDNA')

sns.histplot(data=df, x='EXPTIME', ax=ax1)
ax1.set_xlabel('EXPTIME (min)')
ax1.set_ylabel('Frecuencia')
ax1.set_title('Distribución de EXPTIME')

sns.histplot(data=df, x='RTIME', ax=ax2)
ax2.set_xlabel('RTIME (min)')
ax2.set_ylabel('Frecuencia')
ax2.set_title('Distribución de RTIME')

plt.show()

```

Apéndice 5

Se muestra el código implementado en Python, para obtener los modelos de regresión de la **sección 4.4**.

```
# Librerías requeridas
import numpy as np
import pandas as pd
from sklearn.preprocessing import StandardScaler
from sklearn.linear_model import LinearRegression
from sklearn.pipeline import Pipeline
from sklearn.model_selection import KFold, cross_val_score

# Se carga los datos con pandas y se eliminan los nan values.

df = pd.read_excel('Book1.xlsx')
df.dropna(axis=0, inplace=True)
df.head()

# Se crea un Pipeline que realiza un estandarizado de los datos para luego realizar una regresión sobre estos.

regressor = Pipeline(steps=[
    ['scaler', StandardScaler()],
    ['regressor', LinearRegression()]
])

# Se crean las particiones para la validación cruzada

kf = KFold(n_splits=5, shuffle=True, random_state=12345)

# Se definen las variables independientes X y la variable dependiente y

X = df[['TD', 'TA', 'TE', 'ID']]
y = df[['EXPTIME']]

# Se realiza la regresión, se valida mediante validación cruzada y se guardan los valores r2 y RMSE
# Se guardan las predicciones de la regresión

regressor.fit(X, y)
slopes = regressor.named_steps.regressor.coef_
intercept = regressor.named_steps.regressor.intercept_
r2 = cross_val_score(regressor, X, y, scoring='r2', cv=kf).mean()
rmse = np.sqrt(-cross_val_score(regressor, X, y, scoring='neg_mean_squared_error', cv=kf)).mean()
df['Regression_1'] = regressor.predict(X)
```

Así como el código implementado en Python, para obtener la distribución de residuales de las regresiones de la **sección 4.4**.

```

# Con matplotlib se crea la matriz de gráficos y se editan atributos como los títulos.
# Con seaborn se rellena la matriz de gráficos utilizando sns.histplot para la creación del histograma de la
distribución de los residuos y sm.ProbPlot para crear la gráfica de distribución normal de los residuos.

fig, (ax0, ax1) = plt.subplots(nrows=1, ncols=2, figsize=(22, 18))
fig.suptitle('Distribución de los residuos', fontsize=20)

sns.histplot(x=df['EXPTIME']-df['Regression_1'], bins=11, kde=True, color='blue', ax=ax0)
ax0.get_lines()[0].set_linewidth(3)
ax0.get_lines()[0].set_color('red')
ax0.set_xlabel('Residuos')
ax0.set_ylabel('Frecuencia')
ax0.set_title('Histograma de residuos')

sm.ProbPlot(df['EXPTIME']-df['Regression_1']).qqplot(line='s', ax=ax1)
ax1.get_lines()[1].set_linewidth(3)
ax1.get_lines()[0].set_markersize(8)
ax1.set_xlabel('Cuantiles teorizados')
ax1.set_ylabel('Cuantiles de la muestra')
ax1.set_title('Gráfica de probabilidad normal')

plt.show()

```

Finalmente, se muestra el código implementado en Python, para obtener la gráfica de dispersión de los residuales de las regresiones de la **sección 4.4**.

```

# Se utiliza la función plt.figure para crear el esqueleto de la figura
# Se utiliza sns.scatterplot para crear la gráfica de puntos de los residuales
# Se gráfica una línea horizontal en y=0

plt.figure(figsize=(17, 10))
plt.xlabel('Valor observado')
plt.ylabel('Residuos')
plt.title('Gráfica de residuales')

sns.scatterplot(y=df['EXPTIME']-df['Regression_1'], x=df['EXPTIME'], s=50, color='black')
sns.lineplot(x=(12, 28), y=(0, 0), color='red', linewidth=3)

plt.show()

```

Apéndice 6

Se muestra la **Tabla A6.1** de todas las simulaciones FEM-COMSOL del sistema PCR que no convergieron en el estudio dependiente del tiempo. Se plantea que las simulaciones que no convergieron se debieron a problemas con el redondeo de decimales, ya que el momento donde se presentaron los problemas de divergencia en el estudio dependiente del tiempo fue cuando las concentraciones de S_1S_2 eran cercanas a las iniciales, ya que la concentración pasaba ser negativa (algo imposible). El problema de divergencia de las simulaciones estuvo mayormente presente en el capilar de menor diámetro.

Tabla A6.1: Simulaciones PCR que no convergieron.

SIM	TD (°C)	TA (°C)	TE (°C)	ID (μm)	VPROM (mm/s)	TPROM (°C)
Sim 1	92	55	70	632.46	0.776	72.129
Sim 4	92	55	72	632.46	0.838	72.908
Sim 9	92	55	74	797.56	1.435	73.686
Sim 10	92	60	70	632.46	0.626	73.655
Sim 11	92	60	70	690.88	0.752	73.657
Sim 13	92	60	72	632.46	0.691	74.435
Sim 14	92	60	72	690.88	0.827	74.436
Sim 16	92	60	74	632.46	0.756	75.214
Sim 21	92	65	70	797.56	0.75	75.178
Sim 24	92	65	72	797.56	0.85	75.958
Sim 26	92	65	74	690.88	0.704	76.742
Sim 27	92	65	74	797.56	0.951	76.738
Sim 28	95	55	70	632.46	0.823	73.044
Sim 29	95	55	70	690.88	0.985	73.046
Sim 31	95	55	72	632.46	0.886	73.823
Sim 36	95	55	74	797.56	1.519	74.601
Sim 37	95	60	70	632.46	0.673	74.57
Sim 38	95	60	70	690.88	0.809	74.572
Sim 40	95	60	72	632.46	0.739	75.35
Sim 41	95	60	72	690.88	0.885	75.352
Sim 43	95	60	74	632.46	0.805	76.129
Sim 44	95	60	74	690.88	0.962	76.131
Sim 54	95	65	74	797.56	1.034	77.653
Sim 55	98	55	70	632.46	0.872	73.959
Sim 56	98	55	70	690.88	1.045	73.961
Sim 58	98	55	72	632.46	0.936	74.738
Sim 65	98	60	70	690.88	0.869	75.487
Sim 67	98	60	72	632.46	0.789	76.265
Sim 68	98	60	72	690.88	0.946	76.267
Sim 70	98	60	74	632.46	0.856	77.044
Sim 71	98	60	74	690.88	1.025	77.046

Apéndice 7

Protocolo de extracción de ADN de la sangre

Materiales:

1. Baño de agua a 65 °C.
2. Tubos cónicos para microcentrífuga (15 mL; Falcon).
3. Tubos cónicos de microcentrífuga (1.5 mL).
4. Rotor de tubos cónicos.
5. Pipeta Pasteur de vidrio.
6. EDTA (0.5 M), pH 8.0: Añadir 146.1 g de EDTA a 800 mL de agua destilada. Ajustar pH a 8.0 con hojuelas de NaOH, (va a requerir de aproximadamente 20 g). Hacer hasta 1 L con agua destilada. Autoclave a 15 p.s.i por 15 min.
7. 1 M Tris-HCl, pH 7.6: Disolver 121.1 g de la base Tris en 800 mL de agua destilada. Ajustar pH con HCl concentrado (agregar aproximadamente 60 mL). Hacer hasta 1 L con agua destilada. Autoclave a 15 p.s.i por 15 min.
8. Reactivo A: Lisis de glóbulos rojos: 0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 320 mM sacarosa, 5 mM MgCl₂, 1 % Triton X 100.
9. Añadir 10 mL de 1 M Tris, 109.54 g de sacarosa, 0.47 g de MgCl₂, y 10 mL de Triton X-100 a 800 mL de agua destilada. Ajustar pH a 8.0 y hacer hasta 1 L con agua destilada. Autoclave a 10 p.s.i por 10 minutos.
10. Reactivo B: Lisis de células: 0.4 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.06 M EDTA, 1 % dodecilsulfato sódico, pH 8.0. Tomar 400 mL de 1 M Tris (pH 7.6), 120 mL de 0.5 M EDTA (pH 8.0), 8.76 g de NaCl y ajustar el pH a 8.0. Hacer hasta 1 L con agua destilada. Autoclave por 15 min a 15 p.s.i. Después del emplear la autoclave, añadir 10 g de dodecilsulfato sódico.
11. 5 M de perclorato de sodio: Disolver 70 g de perclorato de sodio en 80 mL de agua destilada. Hacer hasta 100 mL.
12. TE Buffer, pH 7.6: Tomar 10 mL de 1 M Tris-HCl, pH 7.6, 2 mL de 0.5 M EDTA y hacer hasta 1 L con agua destilada. Ajustar pH a 7.6 y emplear la autoclave por 15 min a 15p.s.i.
13. Cloroformo pre-enfriado a 4 °C.
14. Etanol (100 %) pre-enfriado a 4 °C.

Método:

1. Recolección de la sangre

- 1.1. Recolectar la sangre en un tubo Vacumtainer que contenga heparina o EDTA mediante punción venosa. Guardar a temperatura ambiente y extraer el mismo día de trabajo.

2. Extracción de ADN

Para extraer ADN de cultivos celulares, omitir pasos 1-3.

- 2.1. Colocar 3 mL de sangre en un tubo cónico de 15 mL
- 2.2. Añadir 12 mL del reactivo A.
- 2.3. Mezclar en un mezclador de sangre giratorio durante 4 min a temperatura ambiente.
- 2.4. Centrifugar a 3000 g por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 2.5. Descartar el sobrenadante sin perturbar el sedimento celular. Retirar la humedad restante volteando el tubo y secando sobre un pañuelo de papel.
- 2.6. Añadir 250 μ L de 5 M de perclorato de sodio y mezclar volteando el tubo varias veces.
- 2.7. Poner el tubo en un baño de agua por 15 a 20 min a 65 °C.
- 2.8. Dejar que se enfríe a temperatura ambiente.
- 2.9. Añadir 2 mL de cloroformo helado.
- 2.10. Mezclar en un mezclador rotatorio durante 30 a 60 minutos.
- 2.11. Centrifugar a 2400 g por 2 min.
- 2.12. Transferir la fase superior a un tubo cónicos limpio usando una pipeta estéril.
- 2.13. Añadir 2 a 3 mL de etanol helado e invertir despacio para permitir al ADN precipitarse.
- 2.14. Usar una pipeta de pasteur flameada, enrollar el ADN en el extremo del gancho.
- 2.15. Transferir a un tubo cónico de 1.5 mL y dejar secar al aire.
- 2.16. Resuspender en 200 μ L de TE buffer.

Apéndice 8

Protocolo de extracción de ADN de tejido

Materiales:

1. Tubos cónicos de microcentrífuga (1.5 mL).
2. Baño de agua con agitación.
3. Microcentrífugadora.
4. Buffer de digestión de ADN: 50 mM tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS, pH 8.0.
5. Proteinasa K: 0.5m g/mL en buffer de digestión de ADN.
6. Fenol/cloroformo/isopentanol (25:24:1).
7. 100 % Etanol (EtOH)
8. 70 % EtOH
9. TE buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Protocolo:

1. Colocar 0.1 a 0.5 g de tejido en tubos cónicos de microcentrífuga de polipropileno.
2. Agregar 0.5 mL de buffer de digestión de ADN con proteinasa K.
3. Incubar por la noche a 50-55° C con agitación suave.
4. Centrifugar los tubos por 5 s a 500 g para recoger la mezcla del fondo del tubo.
5. Agregar 0.7 mL de fenol/cloroformo/isopentano (25:24:1).
6. Mezclar por inversión durante 1 hr (no vortizar).
7. Microcentrifugar a 12000 g durante 5 min y transferir 0.5 mL de la fase superior a un nuevo tubo de microcentrífuga.
8. Agregar 1 mL de etanol al 100 % a temperatura ambiente y suavemente invertir hasta que el ADN precipite (aproximadamente 1 min).
9. Microcentrifugar a 12000 g por 5 min y descartar sobrenadante.
10. Añadir 1 mL de etanol al 70% (-20°C) e invertir múltiples veces. Este lavado de etanol remueve excesos de sal.
11. Microcentrifugar a 12000 g durante 5 min y descartar sobrenadante.
12. Girar tubos durante 5 s para recolectar remanentes de etanol en el fondo del tubo. Remover las gotas de etanol con pasta fina.
13. Secar a temperatura ambiente durante 10 a 15 min.
14. Resuspender en 100 µL de TE e incubar a 65 °C por 15 min para disolver el ADN.