



APLICACIONES DE MICROFLUÍDICA EN BIOSEPARACIONES

MICROFLUIDICS APPLICATIONS IN BIOSEPARATIONS

B.H. Lapizco-Encinas*

Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos y Centro de Biotecnología Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey. Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL 64849, México.

Recibido 29 de Mayo 2008; Aceptado 26 de Agosto 2008

Resumen

Los microsistemas para análisis conocidos como laboratorios montados en un microdispositivo (*lab-on-a-chip*) están tomando cada vez mayor importancia en la industria biotecnológica y farmacéutica, ya sea en aplicaciones analíticas o preparativas (alta producción). Las ventajas que ofrecen estos microdispositivos son mayor rapidez y menor consumo de reactivos. Los avances en microfluídica, ciencia que estudia el manejo de fluidos en microescala (10^{-9} a 10^{-18} litros), han permitido el desarrollo de los microdispositivos con aplicación en bioseparaciones. Las técnicas de bioseparación más aplicables en microescala son cromatografía, electroforesis y dielectroforesis, las cuales han sido utilizadas exitosamente para la separación y concentración de variedad biopartículas, desde proteínas hasta parásitos.

Este artículo presenta un análisis de los avances en el área de bioseparaciones en microescala, es decir las aplicaciones de microfluídica en bioseparaciones, el objetivo es proveer al lector con información sobre el estado del arte en este campo de la ciencia. Además, se presenta el panorama del desarrollo de este campo de investigación en México, donde incluye información sobre los investigadores e instituciones mexicanas que están realizando estudios sobre bioseparaciones en microescala.

Palabras clave: microfluídica, bioseparaciones, dielectroforesis, electroforesis, cromatografía.

Abstract

Microsystems for analysis, also known as lab-on-a-chip devices, are becoming increasingly important for the biotechnological and pharmaceutical industries, in analytical or preparative (high production) applications. The advantages that microdevices offer are shorter time and lower reagent consumption. The advances in microfluidics, the science that studies the handling of fluids on microscale (10^{-9} to 10^{-18} liters), have allowed the development of microdevices with applications in bioseparations. Chromatography, electrophoresis y dielectrophoresis are the bioseparation techniques more applicable on microscale, these techniques have been successfully utilized for the separation and concentration of a wide variety of bioparticles, ranging from proteins to parasites.

The present paper presents an analysis of the advances in the field of microscale bioseparations, i.e. the application of microfluidics in bioseparations, the objective is to provide the reader with information on the state of the art in this field. Furthermore, an overview of the development of this research field in Mexico is presented, where information about the mexican researchers and institutions working in this field is included.

Keywords: microfluidics, bioseparation, dielectrophoresis, electrophoresis, chromatography.

1. Introducción

Los avances en microtecnología han permitido el desarrollo de los llamados "*lab-on-a-chip*" o laboratorios montados en un microdispositivo. Estos microsistemas realizan las funciones de equipo de laboratorio convencional, con las ventajas que requieren cantidades de muestra muy pequeñas, menores tiempos de respuesta y son portátiles. El área de microsistemas o microanalizadores se está desarrollando significativamente; además de "*lab-on-a-chip*" estos

microdispositivos reciben los nombres de sistemas bio-micro-eléctrico-mecánicos, conocidos en inglés como "*BioMEMS*". Otro nombre común son microsistemas analíticos totales ó "*micro-TAS*" por sus siglas en inglés. Las posibles aplicaciones para este tipo de microsistemas son numerosas, y van desde aplicaciones en medicina para analizar fluidos del cuerpo humano, aplicaciones en ingeniería ambiental para analizar la concentración de algún contaminante o como un sensor utilizado en control de calidad en un proceso de producción (Andersson

* Autora para la correspondencia. E-mail: blapizco@itesm.mx
Tel: (81) 8358-2000, ext. 4850, Fax: (81) 8328-1400

y van den Berg, 2003; Andersson y van den Berg, 2004; Nikolajsen y col., 2006).

Gracias a los avances en la microelectrónica, en los años 90's se inició un gran desarrollo en la tecnología de microfabricación, lo que permitió un gran avance de los microsistemas para análisis. Desde entonces ha habido un interés creciente en el desarrollo de técnicas de separación que puedan implementarse en microescala, tales como: cromatografía, electroforesis y dielectroforesis. Para poder llevar a cabo un proceso de separación en escala micro es necesario disponer de microdispositivos equipados con válvulas, microcanales, reservorios, cámaras de mezclado, y microcolumnas (Whitesides, 2006). A continuación se describen brevemente los inicios de la microfluídica.

1.1 Inicios y metas de la microfluídica

La microfluídica es la ciencia que estudia los sistemas para manipular cantidades muy pequeñas de fluido (10^{-9} a 10^{-18} litros), empleando canales con dimensiones desde unas cuantas micras hasta cientos de micras. Las primeras aplicaciones de la microfluídica se llevaron a cabo en sistemas de análisis, lo anterior fue posible gracias a las ventajas que posee la microfluídica: bajo consumo de muestras y reactivos químicos, alta resolución y sensibilidad, bajo costo y tiempos de análisis cortos. En los sistemas de microfluídica se explotan dos atributos principales: el tamaño pequeño y el flujo laminar (generalmente con número de Reynolds menor a 100), lo que permite un mejor control de los procesos. El campo de la microfluídica tiene su origen en cuatro áreas: el análisis molecular, la biodefensa, la biología molecular y la microelectrónica. Los primeros avances fueron en análisis, con los llamados métodos micro-analíticos: cromatografía de gases, cromatografía de líquidos a altas presiones y electroforesis capilar. Estos métodos, combinados con los avances realizados en detección, permitieron obtener resoluciones altas con pequeñas cantidades de muestra (Effenhauser, 2006; Whitesides, 2006).

Los importantes avances en genómica en los años 80's, seguidos con los progresos en microanálisis para biología molecular, como los procesos de secuenciación de ADN, requirieron métodos analíticos con mayor capacidad, sensibilidad y resolución, que los métodos tradicionales utilizados en la biología. La microfluídica fue la respuesta a estas necesidades de mejores analizadores. Una motivación más para el desarrollo de la microfluídica vino después de la guerra fría, cuando las armas químicas y biológicas eran una gran amenaza. La agencia de proyectos de investigación en defensa avanzada (DARPA por sus siglas en inglés) de la secretaría de defensa de los Estados Unidos de América financió significativamente una serie de proyectos en la década de los

90's. Estos proyectos tuvieron el objetivo de desarrollar dispositivos de microfluídica para ser usados en campo y funcionar como detectores de contaminación química y/o biológica; impulsando el desarrollo de la microfluídica. (Nikolajsen y col., 2006; Whitesides, 2006).

Otra contribución al desarrollo de la microfluídica fue la microelectrónica. Un gran número de los primeros dispositivos para microfluídica se realizaron con fotolitografía, en obleas de silicio y de vidrio. Actualmente, una gran cantidad del trabajo en microfluídica se realiza con plástico, como los análisis de muestras biológicas en agua; donde el utilizar vidrio o silicio es prohibitivo debido al elevado costo y complejidad en fabricación. Además, en forma similar a la microelectrónica, la microfluídica permite la fabricación de microsistemas altamente integrados que sean capaces de realizar varias funciones en un mismo microdispositivo. La meta final del campo de la microfluídica en el área de bioseparaciones es la creación de microdispositivos de diagnóstico, integrados y portátiles que puedan utilizarse en casa o en cualquier otro lugar. De tal forma que se eliminen los tardados análisis de laboratorio. En un futuro, muchos de los análisis que realizan como parte de la vida cotidiana, serán realizados en microanalizadores. En México estos microanalizadores podrían ser usados para la realización de análisis clínicos en poblaciones alejadas, acortando el tiempo de espera.

2. Fundamentos de la microfluídica

En microfluídica, donde se tienen conductos y canales de dimensiones muy pequeñas, es el *reino del flujo laminar*. El número de Reynolds a través de un canal de microfluídica se define como:

$$Re = \frac{Lv\rho}{\mu} \quad (1)$$

donde L es la distancia característica, μ es la viscosidad, ρ es la densidad, y v es la velocidad promedio de flujo del fluido. Para muchos microcanales L es el diámetro equivalente, definido como cuatro veces el diámetro hidráulico

$$L = 4 \frac{A}{P} \quad (2)$$

donde A es el área de la sección transversal y P es el perímetro mojado. Debido a las diminutas dimensiones de los microcanales, L tiene un valor muy pequeño y el número de Reynolds en estos sistemas es usualmente menor a 100, y en muchas ocasiones menor a uno. Bajo estas condiciones el flujo es completamente laminar y no ocurre turbulencia. La transición a flujo turbulento ocurre para valores del número de Reynolds en el rango de 2000. El flujo laminar permite predecir el comportamiento del flujo del fluido (Karniadakis y col., 2005; Nikolajsen y col., 2006). Existen dos métodos comunes que se emplean para mover fluidos

a lo largo de microcanales, estos métodos son: flujo por presión y flujo electroosmótico.

Flujo por presión: el fluido es impulsado a través del microdispositivo mediante bombas de desplazamiento positivo, como las bombas de jeringa. El emplear estas bombas produce un perfil de velocidad parabólico en el microcanal, lo que tiene un efecto significativo en la distribución de partículas que son transportadas dentro del microcanal. El flujo por presión puede ser relativamente económico y reproducible para el bombeo de fluidos en microdispositivos, además esta opción es cada día más accesible debido a los avances en el desarrollo de micro-bombas (Karniadakis y col., 2005; Nikolajsen y col., 2006).

Flujo electroosmótico: el transporte electrocinético de fluidos, electroósmosis y electroforesis, es utilizado en numerosos microsistemas (Yang, 2002). Existen numerosos materiales que al entrar en contacto con una solución acuosa, se lleva a cabo una reacción química instantánea donde superficie del material adquiere carga eléctrica. Si un material de este tipo es empleado para la fabricación de un microdispositivo, las paredes de un microcanal tendrán carga eléctrica y una doble capa eléctrica de iones se formará sobre las paredes. En el caso del vidrio, material muy empleado en microfluídica, la superficie toma carga negativa y atrae a los cationes de la solución acuosa (Hughes, 2003). Cuando se aplica un campo eléctrico a lo largo del microcanal, los iones de la doble capa se moverán hacia el electrodo de polaridad opuesta. Esto crea un movimiento del fluido cerca de las paredes y transfiere movimiento convectivo al bulto del fluido. Si el canal está abierto en el electrodo, como lo están la mayoría de los canales, la velocidad del fluido es uniforme en todo el ancho del canal. En la ausencia de flujo por presión, el perfil de velocidad es plano, también llamado flujo tapón. La Fig. 1 muestra una representación del flujo electroosmótico generado para paredes que tienen carga negativa (como el vidrio): el ánodo se encuentra a la izquierda y el cátodo se encuentra a la derecha. Al aplicar un campo eléctrico, los cationes que están junto a la pared del canal, empiezan a moverse hacia el cátodo, generando flujo de líquido. El perfil de velocidad es de tipo tapón, donde la velocidad baja a cero en las paredes en una distancia cuyo grosor es comparable al de la doble capa eléctrica (en el orden de nanómetros). Las grandes ventajas de flujo electroosmótico es que el perfil de velocidad plano elimina muchas heterogeneidades de difusión que existen con el flujo por presión; y es la simplicidad con la que puede ser acoplado con otros sistemas en microdispositivos. Sin embargo, frecuentemente se requiere la aplicación de voltajes altos, lo que hace difícil su miniaturización sin equipos fuera del microdispositivo. Otra desventaja es la variabilidad de las características de la superficie; por ejemplo, las proteínas pueden adsorberse en las paredes de microcanales, lo que

cambia las propiedades de la superficie, cambiando a su vez la velocidad del fluido, resultando en poca reproducibilidad del flujo. Por último, la magnitud del flujo electroosmótico también depende de la concentración de iones y del pH del líquido dentro del microcanal (Karniadakis y col., 2005; Nikolajsen y col., 2006).

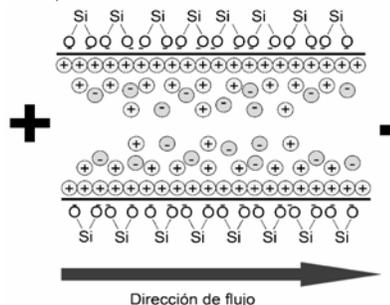


Fig. 1. Representación de flujo electroosmótico en un microcanal de vidrio.

3. Técnicas de bioseparaciones empleadas a escala micro

A continuación se mencionan ejemplos representativos de aplicaciones de microfluídica con las técnicas de cromatografía, electroforesis y dielectroforesis, así como híbridos de estas técnicas.

El primer micro-cromatógrafo: las primeras separaciones en microdispositivos se llevaron a cabo en cromatografía. Debido a que puede aplicarse a sustancias térmicamente inestables, polares y no volátiles, la cromatografía de líquidos es el método de análisis y separación más empleado en bioseparaciones para sustancias neutras. Hay un interés creciente en implementar la cromatografía de líquidos en micro-escala (Jacobson y col., 1994). El primer reto a vencer para la realización de un micro-cromatógrafo, era la fabricación de micro-columnas. Este término se designa para una columna capilar abierta o para una columna capilar empacada, con un diámetro interno menor de 0.5 mm. La Fig. 2 muestra una representación esquemática de los tres tipos de micro-columnas más comunes para cromatografía de líquidos. El primer micro-cromatógrafo reportado en la literatura, fue fabricado por Terry y col., (1979) este microdispositivo se fabricó en obleas de silicio, las cuales se procesaron con litografía y grabado químico. El microsistema se diseñó para analizar aire, y consistió de una columna capilar, un sistema para la inyección de la muestra, y un detector de conductividad, todo integrado en una oblea de 5 cm. Se realizó la separación de una mezcla de hidrocarburos en un tiempo de 10 segundos (Terry y col., 1979).

Micro-electrocromatógrafo: La electro-cromatografía es una técnica híbrida entre cromatografía y electroforesis. El aspecto cromatográfico de esta técnica es que la separación del analito se

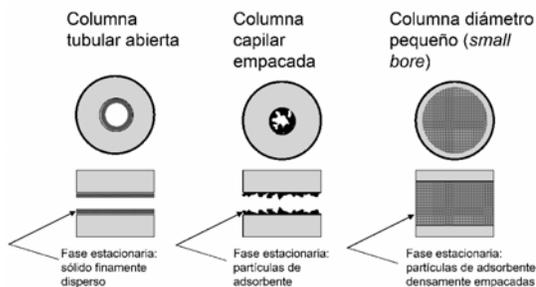


Fig. 2. Representación esquemática de los tipos de micro-columnas en cromatografía de líquidos.

lleva a cabo gracias a la partición de éste entre la fase móvil y la fase estacionaria. El aspecto electroforético, se debe a que el líquido se transporta gracias al flujo electroosmótico. Jacobson y col. (1994) construyeron un micro-electrocromatógrafo en un microdispositivo en vidrio (Fig. 3) para la separación de la toxina coumarina. La columna de separación en serpentín tenía un largo de 171 mm de la cruz de inyección al reservorio de desecho general. El canal fue fabricado con grabado húmedo, lo que produce una sección transversal trapezoidal de 5.6 μm de alto, 72 μm de ancho en la parte superior y 60 μm de ancho en la parte inferior (Fig. 4). Se realizó una activación química de las paredes del microcanal para generar una fase estacionaria de cromatografía de fase reversa, se utilizó detección mediante fluorescencia. Los resultados mostraron la separación de 3 tipos de coumarina: coumarina-440, coumarina-450 y coumarina-460. Se aplicaron campos eléctricos de 27 a 163 V/cm, lo que originó velocidades de flujo electroosmótico de 0.13 a 0.78 mm/s. Este trabajo demostró como la técnica de electro-cromatografía puede ser aplicada en microescala, con eficiencias más altas a las obtenidas en equipos convencionales; obteniéndose alturas de plato de tan solo 4.1 a 5 μm . En una publicación posterior, se demostró la separación de coumarina empleando una columna recta y cromatografía electrocinética micelar (Kutter y col., 1997).

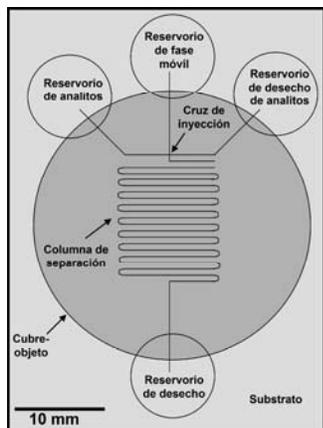


Fig. 3. Representación del microdispositivo para electrocromatografía empleado por Jacobson y colaboradores (Jacobson y col., 1994).

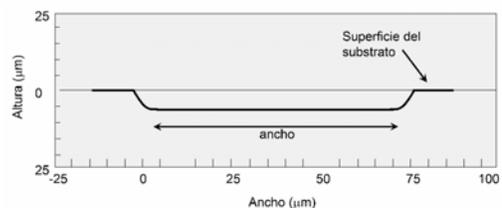


Fig. 4. Sección transversal del microcanal realizado con grabado húmedo por Jacobson y colaboradores (Jacobson y col., 1994).

Micro-cromatógrafo aniónico con columna monolítica: la versatilidad de las técnicas de bioseparación se ha podido extender a la mayoría de los métodos cromatográficos existentes. Las columnas cromatográficas tradicionales están empacadas con partículas esféricas, lo que en ocasiones resulta en altas caídas de presión y algunas dificultades en miniaturización. A finales de los años 80's se inició el desarrollo de un nuevo tipo de columnas cromatográficas: las columnas monolíticas. Los monolitos porosos poliméricos son estructuras que pueden formarse dentro de una columna o microcanal, y adaptarse a la geometría del mismo. Este tipo de fase estacionaria, altamente porosa, está ganando una alta aceptación en microfluídica, debido a la facilidad que se tiene para ser modificada logrando amplia funcionalidad para distintos tipos de cromatografía. Como un ejemplo, se tiene el trabajo realizado por Hilder y col., (2004), donde emplearon una estructura monolítica creada dentro de un capilar de sílice para la separación de carbohidratos. Este grupo de investigación utilizó partículas de látex, que fueron cubiertas con un polímero para proporcionar una funcionalidad de aminas cuaternarias, para la separación de sacáridos con cromatografía aniónica. El microdispositivo utilizado consistió en el capilar que contenía el monolito, con un diámetro de 250 μm y 10 cm de largo. Se logró realizar la separación de los sacáridos en menos de 10 minutos. Este estudio demuestra cuán versátiles son las técnicas de microfluídica en el campo de las bioseparaciones.

Micro-cromatógrafo electroquímicamente modulado: como ya se mencionó, se han tenido exitosas aplicaciones de las técnicas híbridas en microescala. La cromatografía electroquímicamente modulada, es un híbrido entre cromatografía y electroquímica, que permite cambiar la capacidad de la fase estacionaria, que a su vez es el electrodo de trabajo (Fig. 5). Lam y col., (1999) desarrollaron un microdispositivo donde se les agregó una funcionalidad para intercambio iónico a esferas de acero inoxidable cubiertas con una capa de oro, para lograr la separación de ribonucleasa A, los resultados demostraron que la retención de la proteína fue controlada por el potencial aplicado, las corridas experimentales tuvieron una duración de 5-10 minutos, obteniéndose cromatogramas de alta resolución (Lam y col., 1999).

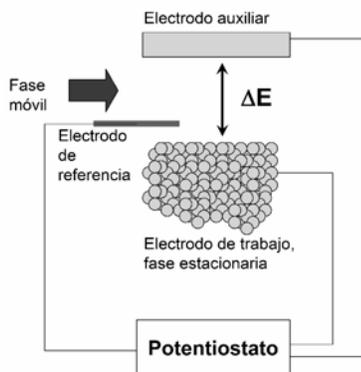


Fig. 5. Conceptualización de la cromatografía electroquímica modulada (Lam y col., 1999).

Microdispositivo para electroforesis altamente integrado: uno de los trabajos de investigación más destacados en los últimos 10 años fue el microdispositivo para análisis de ADN construido por Burns y colaboradores (1998). En este microdispositivo se integraron todas las operaciones necesarias, desde la introducción de la muestra hasta la detección. El microdispositivo se construyó con vidrio y silicio, y se formaron estructuras para el mezclado de la muestra, medición precisa de volumen de ADN y reactivos mediante el uso de superficies hidrofóbicas, reacción controlada térmicamente, columna electroforética con los electrodos integrados dentro del dispositivo, así como detección mediante fluorescencia con integración de filtro y fotodiodo. En la columna electroforética se utilizó una gel de poli(acrilamida) la cual fue formada *in situ* antes de usarse. Brevemente, el funcionamiento del dispositivo está formado de los siguientes pasos: con un “parche” de superficie hidrofóbica se detiene la muestra, formando una gota precisa en escala de nano-litros (120 nl). Mediante la aplicación de presión se empuja la gota hacia el interior del microdispositivo, los reactivos se introducen de la misma manera. Las nano-gotas se mezclan y pasan al reactor que está térmicamente controlado. Una vez terminada la reacción, los productos se hacen llegar a la columna electroforética mediante presión. El ADN es introducido a la columna electrocinéticamente, aplicando un campo eléctrico menor a 10 V/cm. Como resultado se obtuvo la exitosa migración del ADN en la columna electroforética con gel y la obtención de un solo pico en el detector. El trabajo de Burns y colaboradores demostró que es posible amplificar ADN en microdispositivos en tiempos de análisis muy cortos, comparado con los equipos convencionales. Este trabajo de investigación constituye la primera demostración de un dispositivo altamente integrado o “laboratorio completo” en un microdispositivo, sin requerir equipo externo, donde se realizaron una serie de pasos sin intervención humana. El desarrollo de este tipo de micro-laboratorios autónomos es la tendencia que se tienen

en países altamente desarrollados, donde la mano de obra calificada es altamente costosa (Rheea y Burns, 2008).

Micro-electroforesis para separar microorganismos: Armstrong y col., (1999) realizaron la separación de una mezcla de microorganismos utilizando un microdispositivo para electroforesis capilar. Este trabajo de investigación tuvo un importante aspecto de originalidad ya que se realizó la separación de microorganismos como si se tratara de macromoléculas. El trabajo de investigación incluyó el empleo de dos técnicas diferentes de electroforesis capilar. En la primera aplicación se utilizó electroenfocado, obteniéndose un electroferograma mostrando picos bien definidos y excelente resolución, con eficiencias de 1’600,000 platos, cada pico contenía un solo tipo de bacteria. Se utilizó un capilar de 50 μm de diámetro y 47 cm de largo, con detección por UV. Las bacterias fueron separadas en base a las propiedades de su membrana, es decir, su punto isoelectrónico. Para poder usar este método era necesario eliminar el flujo electroosmótico. La muestra conteniendo las células de diferentes especies se introdujeron al capilar por presión. Se aplicó un voltaje de 20 kV por 5 minutos, con el fin de lograr el electroenfocado. Las bandas de microorganismos electroenfocados se movilaron utilizando presión. El segundo método empleado por Armstrong y col. fue electroforesis capilar. El capilar tenía un diámetro de 100 μm y 27 cm de largo, con detección por UV. Se agregó un polímero (óxido de polietileno, PM=600,000) para disminuir en forma significativa el flujo electroosmótico. Sin el polímero, el flujo electroosmótico es dominante y minimiza la contribución electroforética, lo que hace que los microorganismos tengan la misma movilidad. Los microbios tenían carga negativa y migraban en la dirección opuesta al flujo electroosmótico. Las movilidades electroforéticas de los microbios también fueron afectadas por el polímero. A mayor concentración del polímero, mayores fueron los tiempos de retención. Con este segundo método también se obtuvo un electroferograma mostrando picos de excelente resolución, cada pico contenía un solo tipo de bacteria. La presencia del polímero indujo cierta selectividad en cuanto a tamaño y forma. El trabajo demostró la aplicación de dos métodos electroforéticos para separar microorganismos intactos, donde en ambos casos el flujo electroosmótico fue suprimido. Ambos métodos produjeron picos definidos en tiempos de análisis cortos (Armstrong y col., 1999). Esta demostración de la separación electroforética de microorganismos establece la versatilidad que las técnicas de bioseparación en microescala para la manipulación de una gran variedad de biopartículas.

Microseparador dielectroforético para microorganismos: La dielectroforesis es el movimiento de partículas causado por efectos de polarización en campos eléctricos no uniformes. Este

mecanismo de transporte no destructivo tiene un enorme potencial para la concentración y manipulación de biopartículas desde macromoléculas hasta parásitos. Además, posee excelentes características para ser incorporada en microanalizadores, ya que permite una fácil integración con otras técnicas y microdispositivos. La respuesta dielectroforética de una biopartícula puede ser positiva o negativa. Las partículas que sean más polarizables que el medio donde se encuentren inmersas, exhibirán dielectroforesis positiva, es decir, serán atraídas hacia las regiones donde la intensidad del campo eléctrico sea más alta. Contrariamente, las partículas que sean menos polarizables que el medio de inmersión, exhibirán dielectroforesis negativa, donde serán repelidas de las regiones de alta intensidad de campo eléctrico (Hughes, 2003; Ozuna-Chacón y col., 2008). Una de las aplicaciones más interesantes de la dielectroforesis la realizó Morgan y col., (1999), empleando un microdispositivo con electrodos polinomiales y manipulando las condiciones de operación, este grupo logró separar espacialmente virus mosaico del tabaco y virus del herpes simple (Fig. 6). El virus de herpes cuenta con un envoltorio que cubre su cápside, lo que produce una polarizabilidad menor a la del medio y por tanto exhiba comportamiento de dielectroforesis negativa y sea repelido de los electrodos polinomiales, atrapándose en el centro de los electrodos. En cambio, el virus de tabaco no cuenta con este envoltorio, por tanto tiene una polarizabilidad mayor a la del medio y presenta dielectroforesis positiva, siendo atraído a los electrodos (Fig. 6). Esta investigación muestra como los microdispositivos pueden funcionar como instrumentos para la detección de microorganismos. La dielectroforesis es una técnica que solo ha tenido aplicaciones exitosas gracias a la miniaturización, sin la microfluídica, no sería posible el creciente desarrollo de microdispositivos dielectroforéticos para la manipulación de biopartículas.

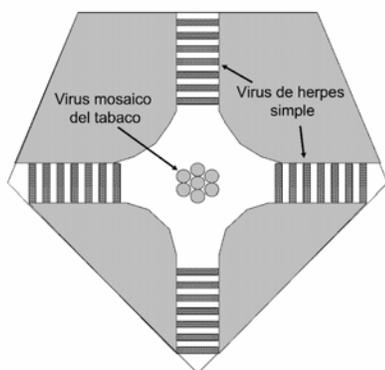


Fig. 6. Representación esquemática de la separación dielectroforética entre virus mosaico del tabaco y virus de herpes simple (Morgan y col., 1999).

4. Avances en México en bioseparaciones en microescala

El área de bioseparaciones en microescala ha tenido un crecimiento importante en las últimas dos décadas, los Estados Unidos de América es el país donde se realiza mayor investigación en este campo. La Tabla 1 muestra los países que más publicaciones producen en este campo, donde puede observarse que Estados Unidos, China y Japón son los países líderes. Para proveer de mayor información se incluyó también la producción científica en México. Uno de los esfuerzos más importantes para el desarrollo de los microsistemas en México lo llevó a cabo la Fundación México Estados Unidos para la Ciencia (FUMEC, <http://www.fumec.org.mx>) con el lanzamiento de la iniciativa Centro de Articulación Productiva en Microsistemas CAP-MEMS (www.capmems.org.mx). La Coordinación en Tecnologías MEMS de FUMEC está a cargo de la M.C. Guillermina Avendaño Soto. Esta iniciativa incluye varias universidades y centros de investigación, dentro de los cuales destacan: 1) Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ), donde las labores de diseño y unión (bonding) de microdispositivos se llevan a cabo bajo la dirección del Dr. José Mireles Jr. García dentro del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología Aplicada (CICTA, <http://www.uacj.mx/mems>). 2) Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), donde se llevan a cabo labores de diseño y caracterización de microdispositivos dentro del proyecto UNAMEMMS (http://www.proyecto_unamems.unam.mx) bajo la dirección del M.I. Roberto Tovar Medina. 3) Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) donde se llevan a cabo las labores de fabricación bajo la dirección del Dr. Wilfrido Calleja Arriaga dentro del grupo de Microelectrónica (http://www-elec.inaoep.mx/espanol/g_investigacion/microelectronica.html). La iniciativa CAP-MEMS comprende desde cursos y talleres de entrenamiento para investigadores interesados en el área de MEMS, hasta las colaboraciones estratégicas establecidas entre más de una decena de universidades y centros de investigación.

Tabla 1. Publicaciones en el área de bioseparaciones en microescala en las últimas dos décadas (información recopilada con ISI Web of knowledge).

País	No. de Publicaciones en 1990-1999	No. de Publicaciones en 2000-2008
EUA	696	2391
China	182	1487
Japón	272	828
Alemania	271	568
Francia	153	449
México	8	16

En mayo 2007 se consolidó el Consorcio Mexicano de Microsistemas como asociación civil (FUMEC, 2008). Para mayor información se recomienda al lector contactar a FUMEC o al grupo CAP-MEMS.

Además de esta importante iniciativa apoyada por FUMEC, hay investigadores en distintas universidades y centros de investigación en México que se encuentran realizando estudios en el campo de bioseparaciones en microescala. Información sobre algunos de estos investigadores ha sido incluida en la

Tabla 2. La información de las Tablas 1 y 2 se encontró realizando numerosas búsquedas con palabras clave empleando las bases de datos ISI Web of Knowledge de Thomsom (<http://www.isiwebofknowledge.com>) y la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (<http://redalyc.uaemex.mx/>), un proyecto impulsado por la Universidad Autónoma de Estado de México (UAEM).

Tabla 2. Información sobre investigadores en instituciones mexicanas en el área de bioseparaciones en microescala.

Investigador e información de contacto	Proyectos en los que trabaja
Castellanos Mier, Alejandro Universidad Veracruzana Email: acastellanos@uv.mx	Trabajo experimental con matrices de polímero que se hidratan e deshidratan, donde se combina efectos de atracción a la superficie y dielectroforesis. Esta técnica es apropiada para microdispositivos en la separación y fraccionación de mezclas de biopartículas, atrapando las partículas pequeñas y dejando libres partículas grandes. Esta técnica fue aplicada en microsferas, pero posee el potencial para bioseparaciones (Castellanos <i>et al.</i> , 2007a, b).
Lapizco Encinas, Blanca H. Tecnológico de Monterrey Email: blapizco@itesm.mx Web: http://homepages.mty.itesm.mx/blapizco/	Trabajo experimental sobre dielectroforesis y electrocinética en microdispositivos para la concentración de biopartículas como proteínas (Lapizco-Encinas <i>et al.</i> , 2008; Ozuna-Chacón <i>et al.</i> , 2008). Iniciando esfuerzos en manipulación dielectroforética de células de levaduras y microalgas (Lapizco-Encinas, 2008).
Martínez Chapa, Sergio O. Tecnológico de Monterrey Email: smart@itesm.mx Web: http://homepages.mty.itesm.mx/smart/	Trabajo experimental y de simulación sobre sistemas de hidrogeles implantables para la administración de fármacos en el tratamiento de diabetes mellitus (Sánchez Chávez <i>et al.</i> , 2008; Sánchez-Chávez <i>et al.</i> , 2008).
Martínez Cisneros, Cynthia S. Email: cynthia.martinez@uab.es Instituto Tecnológico de la Laguna	Trabajo experimental en la detección de insecticida con biosensor (Flores <i>et al.</i> , 2003). Integración de sistemas analíticos miniaturizados para realizar detección, utilizando cerámicas de baja temperatura. Este trabajo posee el potencial para aplicación en bioseparaciones (Martínez-Cisneros <i>et al.</i> , 2007b; Ibañez-García <i>et al.</i> , 2008). Además, un analizador de microflujo para sistemas donde el control de temperatura es crucial (Martínez-Cisneros <i>et al.</i> , 2007a).
Valdés Perezgasga, Francisco Email: fvaldesp@gmail.com Instituto Tecnológico de la Laguna	
Morales Villagran, Alberto Universidad de Guadalajara Email: amorales@cucba.udg.mx	Trabajo experimental en el desarrollo de un biosensor para la medición de glutamato en fluido cerebral extracelular en un tiempo de 1 minuto (Morales-Villagran <i>et al.</i> , 2008b). Realización de un biosensor electroquímico el cual fue insertado en el cerebro de ratas para medir la concentración de glutamato y la actividad electroencefalográfica en tiempo real durante convulsiones inducidas (Morales-Villagran <i>et al.</i> , 2008a). Actualmente desarrollando sistemas de detección en escala micro y nano con las técnicas de fluorescencia y quimioluminiscencia (Morales-Villagran, 2008).
Santana Solano, Jesús CINESTAV, Unidad Monterrey Email: jsantana@cinvestav.mx Web: http://www.cinvestav-monterrey.edu.mx/index.php/Jesus-Santana.html	Trabajo experimental en la medición del flujo electrodinámico de partículas coloidales en microcanales. Este trabajo posee el potencial para su aplicación en micro-electroforesis y micro-dielectroforesis de biopartículas (Santana-Solano <i>et al.</i> , 2006). Iniciando esfuerzos con flujo de glóbulos rojos en microcanales (Santana-Solano, 2008).
Vargas Bernal, Rafael Instituto Tecnológico Superior de Irapuato E-mail: ravargas@itesi.edu.mx Web: http://rvargasbernal.angelfire.com/	Diseño teórico de micromezcladores para enzimas para usarse en microdetector de pesticidas en alimentos (Vargas-Bernal, 2007a; Vargas-Bernal, 2007b). Microsistemas para administración de fármacos, caso especial diabetes mellitus (Vargas-Bernal, 2006).
Zehe, Alfred F.K. Universidad Autónoma de Puebla Email: azehe@siu.buap.mx ; Web: http://www.cv-az.ece.buap.mx/index.html	Trabajo teórico y de modelación en la manipulación electrocinética y dielectroforética de biopartículas como eritrocitos, células eucarióticas y virus, enfocado a la caracterización de propiedades dieléctricas de estas biopartículas (Sánchez y Zehe, 2003; Zehe y Ramírez, 2004; Zehe <i>et al.</i> , 2004; Durán <i>et al.</i> , 2005; Ramírez y Zehe, 2005; Zehe <i>et al.</i> , 2006).

La Tabla 2 contiene información sobre científicos mexicanos que investigan en el área de bioseparaciones en microescala, cuya producción científica fue encontrada en las bases de datos de publicaciones mencionadas anteriormente. Los artículos mencionados en la Tabla 2 fueron seleccionados buscando que se tuviera alguna institución mexicana dentro de las instituciones de adscripción de los autores. Información más específica fue obtenida contactando a algunos de los investigadores incluidos en la Tabla 2. El Instituto Tecnológico de la Laguna tiene una importante colaboración con el con el Grupo de Sensores y Biosensores de la Universidad Autónoma de Barcelona en el campo del uso de las cerámicas (low-temperature cofired ceramics) para integrar microfluídica y electrónica de medición y control, el interés es desarrollar sistemas de fluídica a escala meso (Valdés-Perezgasga, 2008). La Cátedra de Investigación BioMems del Tecnológico de Monterrey tiene una colaboración importante con el BioMems Research Group de la Universidad de California en Irvine (http://mmadou.eng.uci.edu/Madou_Lab_Website) con la realización del proyecto 2D-3D Carbon Dielectrophoresis (Martínez-Chapa, 2008).

Conclusiones

El desarrollo de las técnicas de bioseparación en microescala está teniendo un desarrollo acelerado, gracias a los avances en microfluídica. Se han reportado exitosas aplicaciones de microdispositivos para la separación y concentración de biopartículas, desde pequeños analitos de bajo peso molecular hasta microorganismos. Las técnicas de bioseparación más empleadas en microescala son la cromatografía, electroforesis y dielectroforesis, así como sus técnicas híbridas.

Países como Estados Unidos, China y Japón, son los líderes en el desarrollo del área de bioseparaciones en microescala. En México ya se han iniciado esfuerzos importantes en este campo. Instituciones como la Fundación México Estados Unidos para la Ciencia (FUMEC) están cimentando los inicios de este campo de la ciencia en nuestro país. Otras instituciones están realizando también esfuerzos en el desarrollo de microdispositivos para bioprocesos.

Se espera que en México siga creciendo el interés en el desarrollo de las técnicas de bioseparación en microescala. El principal objetivo de este artículo, es el de informar al lector sobre el desarrollo de esta área y los avances que se tienen en México. Aún queda un largo camino por recorrer, pero se cuenta en nuestro país con el recurso humano y gradualmente se van teniendo los apoyos de infraestructura y financiamiento, que permitirán tener avances significativos en esta creciente rama de la ciencia.

Agradecimientos

La autora agradece el apoyo económico proporcionado por la Cátedra de Investigación Bioingeniería y Nanobiopartículas (CAT161) del Tecnológico de Monterrey, así como el apoyo económico proporcionado por CONACYT, proyecto número CONACYT-CB-2006-53603.

Referencias

- Andersson, H. y van den Berg, A. (2003). Microfluidic devices for cellomics: A review. *Sensors and Actuators B-Chemical* 92(3), 315-325.
- Andersson, H. y van den Berg, A. (2004). Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 15(1), 44-49.
- Armstrong, D.W., Schulte, G., Schneiderheinze, J.M. y Westenberg, D.J. (1999). Separating microbes in the manner of molecules. 1. Capillary electrokinetic approaches. *Analytical Chemistry* 71(24), 5465-5469.
- Burns, M.A., Johnson, B.N., Brahmasandra, S.N., Handique, K., Webster, J.R., Krishnan, M., Sammarco, T.S., Man, P.M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C.H. y Burke, D.T. (1988). An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science* 282, 484-487.
- Castellanos, A., DuPont, S.J., Heim, A.J., Matthews, G., Stroot, P.G., Moreno, W. y Toomey, R.G. (2007a). Size-exclusion "capture and release" separations using surface-patterned poly(n-isopropylacrylamide) hydrogels. *Langmuir* 23, 6391-6395.
- Castellanos, A., Toomey, R.G. y Moreno, W. (2007b). Non-conventional biomems for biosamples manipulation. *XIII Taller IBERCHIP*, Lima, Perú, Marzo 14-16.
- Durán, R., Ramírez, A. y Zehe, A. (2005). A nanorotor driven by the electrokinetic effect acting on a bioparticle. *Transactions on Biology and Biomedicine* 2(3), 294-298.
- Effenhauser, C.S. (2006). Analytical microsystems: A bird's eye view. *En Separation methods in microanalytical systems*. (J. P. Kutter and Y. Fintschenko, eds.), Pp. 1-18, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Flores, F., Artigas, J., Marty, J.L. y Valdés, F. (2003). Development of an enfet for the detection of organophosphorous and carbamate insecticides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376(4), 476-480.
- FUMEC (2008). Programa para el desarrollo del sector de microsistemas. Accesado 08/08/2008. (http://fumec.org.mx/v4/index.php?option=com_content&task=view&id=37&Itemid=88&lang=es)

- Hughes, M.P. (2003). *Nanoelectromechanics in engineering and biology*. Boca Ratón, FL, CRC Press.
- Hildera, E.F., Svec, F., y Fréchet, J.M.J. (2004). Latex-functionalized monolithic columns for the separation of carbohydrates by micro anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 1053, 101-106.
- Ibañez-García, N., Martínez-Cisneros, C.S., Valdés, P. y Alonso, J. (2008). Green-tape ceramics. New technological approach for integrating electronics and fluidics in microsystems. *Trends in Analytical Chemistry* 27(1), 24-33.
- Jacobson, S.C., Hergenroder, R., Koutny, L.B. y Ramsey, M. (1994). Open channel electrochromatography on a microchip. *Analytical Chemistry* 66(14), 2369-2373.
- Kamiadakis, G., Beskok, A. y Aluru, N. (2005). *Microflows and nanoflows: Fundamentals and simulation*. New York, NY, Springer.
- Kutter, J.P., Jacobson, S.C. y Ramsey, M. (1997). Integrated microchip device with electrokinetically controlled solvent mixing for isocratic and gradient elution in micellar electrokinetic chromatography. *Analytical Chemistry* 69, 5165-5171.
- Lam, P., Kumar, K., Wnek, G.E. y Przybycien, T.M. (1999). A prototype electrochemical chromatographic column for use with proteins. *Analytical Chemistry* 71(19), 4272-4277.
- Lapizco-Encinas, B.H. (2008). *Comunicación personal*. Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey.
- Lapizco-Encinas, B.H., Ozuna-Chacón, S. y Rito-Palomares, M. (2008). Protein manipulation with insulator-based dielectrophoresis and direct current electric fields. *Journal of Chromatography A* 1206(1), 45-51.
- Martínez-Chapa, S.O. (2008). *Comunicación personal*. Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey.
- Martínez-Cisneros, C.S., Ibañez-García, N., Valdés, P. y Alonso, J. (2007a). LTCC microflow analyzers with monolithic integration of thermal control. *Sensors and Actuators A-Physical* 138, 63-70.
- Martínez-Cisneros, C.S., Ibañez-García, N., Valdés, P. y Alonso, J. (2007b). Miniaturized total analysis systems: Integration of electronics and fluidics using the low-temperature co-fired ceramics. *Analytical Chemistry* 79(21), 8376-8380.
- Morales-Villagran, A. (2008). *Comunicación personal*. Universidad de Guadalajara.
- Morales-Villagran, A., Medina-Ceja, L. y Lopez-Perez, S.J. (2008a). Simultaneous glutamate and eeg activity measurements during seizures in rat hippocampal region with the use of an electrochemical biosensor. *Journal of Neuroscience Methods* 168(1), 48-53.
- Morales-Villagran, A., Sandoval-Salazar, C. y Medina-Ceja, L. (2008b). An analytical flow injection system to measure glutamate in microdialysis samples based on an enzymatic reaction and electrochemical detection. *Neurochemical Research* 33(8), 1592-1598.
- Morgan, H., Hughes, M.P. y Green, N.G. (1999). Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis. *Biophysical Journal* 77(1), 516-525.
- Nikolajsen, R.P.H., Chirica, G.S., Fintschenko, Y. y Kutter, J.P. (2006). Electro-driven separation methods on chips. En *Separation methods in microanalytical systems*. (J. P. Kutter and Y. Fintschenko, eds.), Pp. 261-317, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ozuna-Chacón, S., Lapizco-Encinas, B.H., Rito-Palomares, M., Martínez-Chapa, S.O. y Reyes-Betanzo, C. (2008). Performance characterization of an insulator-based dielectrophoretic microdevice. *Electrophoresis* 29(15), 3115-3122.
- Ramírez, A. y Zehe, A. (2005). Forced low-frequency cell oscillations in human blood suspensions. En *Recent advances in multidisciplinary applied physics*. (A. Méndez-Vilas, eds.), Pp. 203-208, Elsevier Science, Amsterdam.
- Rheea, M. y Burns, M.A. (2008). Microfluidic assembly blocks. *Lab on a Chip* 8, 1365-1373.
- Sánchez, A. y Zehe, A. (2003). El potencial del virus mosaico de tabaco (tmv) como bionanosistema en la electrónica molecular. *Internet Electronic Journal Nanociencia et Moletrónica* 1(12), 100-111.
- Sánchez Chávez, I.Y., Martínez Chapa, S.O. y Peppas, N.A. (2008). Computer evaluation of hydrogel-based systems for diabetes closed loop treatment. *AIChE Journal* 54(7), 1901-1911.
- Sánchez-Chávez, I.Y., Martínez-Chapa, S.O. y Morales-Menéndez, R. (2008). Glucose optimal control system in diabetes treatment. *Applied Mathematics and Computation* doi:10.1016/j.amc.2008.06.030.
- Santana-Solano, J. (2008). *Comunicación personal*. CINVESTAV, Unidad Monterrey.
- Santana-Solano, J., Wu, D.T. y Marr, D.W.M. (2006). Direct measurement of colloidal particle rotation and field dependence in alternating current electrohydrodynamic flows. *Langmuir* 22(13), 5932-5936.
- Terry, S.C., Jerman, J.H. y Angell, J.B. (1979). A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *Electron Devices, IEEE Transactions on* 26(12), 1880-1886.
- Valdés-Perezgasga, F. (2008). *Comunicación personal*. Instituto Tecnológico de la Laguna.
- Vargas-Bernal, R. (2006). Choosing materials for designing drug delivery systems based on

- mems. *Proceedings of the XV International Materials Research Congress: Biomaterials Symposium, Cancún, Quintana Roo, México, August 2006* 20-24.
- Vargas-Bernal, R. (2007a). Consideraciones de diseño de micro-mezcladores involucrando enzimas. *IEEE 5to Congreso Internacional sobre Innovación y Desarrollo Tecnológico (CIINDET 2007)*, Cuernavaca, Morelos, México, October 2007, 1, 10-12.
- Vargas-Bernal, R. (2007b). Topologies based on microfluidics of pesticides biosensors. *Proceedings of the Electronics, Robotics and Automotive Mechanics Conference (CERMA 2007)*, Cuernavaca, Morelos, México, 25-28 September 2007 608-613.
- Whitesides, G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368-373.
- Yang, C. (2002). Transport of liquid in rectangular microchannels by electroosmotic flow. En *Microfluidics and biomems applications*. (F. E. H. Tay, eds.), Pp. 265-285, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Zehe, A. y Ramírez, A. (2004). Vibration of eukariotic cells in suspension induced by a low-frequency electric field: Mathematical Modelling. *WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine* 1(1), 55-59.
- Zehe, A., Ramírez, A. y Cid, A. (2004). Efectos electrocinéticos de células biológicas y partículas coloidales en la espectroscopía dieléctrica a baja frecuencia. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* 25(1), 16-24.
- Zehe, A., Ramírez, A. y Starostenko, O. (2006). Size-selective dielectrophoretic force on linear erythrocyte aggregates. *Biophysics* 51(4), 645-653.