



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA ELÉCTRICA – SISTEMAS ELECTRÓNICOS.**

**“MICROSISTEMA EMBEBIDO DE MEDICIÓN DINÁMICA DE PROLIFERACIÓN
CELULAR EN CULTIVO”.**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA ELÉCTRICA**

PRESENTA :

Ing. Arturo Abner Jiménez Aguilar.

TUTOR PRINCIPAL :

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille.
Facultad de Ciencias

Ciudad Universitaria, CD. MX

Enero 2018

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Pérez Alcázar Pablo Roberto

Secretario: Dra. Moumtadi Fátima

Vocal: Dr. Hautefeuille Mathieu Christian A.

1^{er}. Suplente: Dra. Medina Gómez Lucía

2^{d o}. Suplente: Dr. Matatagui Cruz Daniel

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: NOMBRE DEL LUGAR

TUTOR DE TESIS:

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille.

FIRMA

MICROSISTEMA EMBEBIDO DE MEDICIÓN DINÁMICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN CULTIVO

Resumen

Presentamos el desarrollo de un sistema basado en microcontroladores para el conteo de células en cultivo por el método de microbiología de impedancia; para el cual fue necesario, también el diseño y construcción de una mini-incubadora para cultivo celular que permitiera tomar mediciones en tiempo real y en un ambiente controlado. Para llevar a cabo las mediciones se empleó un arreglo de microelectrodos de plata, un generador de funciones basado en el circuito integrado xr-2206, un sistema de medición de impedancia basado en amplificadores operacionales, un microcontrolador tiva TM4C1294 y un teensy 3.2, estos últimos para la adquisición y procesamiento de los datos. Se pudo obtener tanto el módulo de la impedancia como el ángulo de desfase de la corriente respecto al voltaje en un circuito que simuló el comportamiento de un electrodo con medio de cultivo y células y se pudo mantener un ambiente controlado de temperatura, humedad y CO₂ en condiciones óptimas para la proliferación celular y se espera como siguiente etapa medir en tiempo real la proliferación y efecto de agentes citotóxicos de diferentes tipos de células.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1.	12
INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1 OBJETIVO GENERAL	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
1.3 ESTRUCTURA DE LOS CAPÍTULOS.	14
Capítulo 2.	15
MEDICIÓN DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS CELULARES	15
2.1. CORRIENTE ALTERNA	15
2.2 IMPEDANCIA ELÉCTRICA	16
2.2.1 IMPEDANCIA EN CIRCUITOS RLC	18
2.3 FASE EN CIRCUITOS DE CORRIENTE ALTERNA	20
2.4 PRINCIPIOS Y PROPIEDADES BIOELÉCTRICAS EN EL CUERPO HUMANO	22
2.5 LA CÉLULA	23
2.5.1 CICLO DE VIDA CELULAR	23
2.5.2 FISIOLOGÍA DE LA CÉLULA	24
2.5.3 MEMBRANA CELULAR	25
2.5.4 COMPORTAMIENTO ELÉCTRICO DE LA MEMBRANA CELULAR	26
2.6 MONITORIZACIÓN DE CRECIMIENTO Y MUERTE CELULAR	30
2.6.1 TÉCNICAS EXISTENTES PARA MEDIR EL NÚMERO DE CÉLULAS	30
2.7.2 MÉTODOS EMPLEADOS EN MICROBIOLOGÍA DE IMPEDANCIA	34
2.6.3 MÉTODO SELECCIONADO DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS CELULARES	34
2.7 MODELO DE MICROELECTRODO Y CULTIVO CELULAR.	35
2.8 DEPENDENCIA DE LA FRECUENCIA EN LAS MEDIDAS DE IMPEDANCIA	36
2.9 LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA	38
Capítulo 3.	40
CARACTERIZACIÓN DE MICROELECTRODOS	40
3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ELECTRODOS DE MEDICIÓN.	40
3.1.1 MATERIALES	41
3.1.2 DIMENSIONES Y CONFIGURACIÓN	42
3.2 FABRICACIÓN DE MICROELECTRODOS	45
3.3 CARACTERIZACIÓN CON EL LCR-METER	48
3.3.1 MEDICIONES OBTENIDAS CON EL LCR.	48
3.3.2 VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL LCR.	50

Capítulo 4.	52
CONSTRUCCIÓN DE MINI-INCUBADORA	52
4.1 DISEÑO	52
4.2 SENSOR DE TEMPERATURA	53
4.2.1 CELDA PELTIER	55
4.3 SENSOR DE HUMEDAD	57
4.3.1 ADECUACIÓN DE CONDICIONES DE HUMEDAD	57
4.4 MEDICIONES DE TEMPERATURA Y HUMEDAD EN LA MINI-INCUBADORA	58
4.5 SENSOR DE CO2	59
4.5.1 ELECTROVÁLVULA PARA REGULACIÓN DE CO2	62
4.5.2 MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CO2	63
4.6 PRESENTACIÓN DE DATOS AL USUARIO	64
4.6.1 BLUETOOTH	64
4.6.2 DISPLAY	65
Capítulo 5.	67
AMPLIFICACIÓN	67
5.1 AMPLIFICADOR DIFERENCIAL.	67
5.2 AMPLIFICADORES OPERACIONALES.	68
5.3 CONSIDERACIONES DE LOS AMPLIFICADORES OPERACIONALES	70
5.3.1 TENSIÓN DE OFFSET DE ENTRADA	70
5.3.2 RAZÓN DE RECHAZO DE MODO COMÚN	71
5.3.3 IMPEDANCIA DE ENTRADA	71
5.3.4 IMPEDANCIA DE SALIDA	72
5.3.5 RANGO DE SALIDA	72
5.3.6 SLEW RATE	72
5.3.8 RUIDO EN OP-AMPS	73
5.3.9 RESPUESTA EN FRECUENCIA	74
5.4 AMPLIFICADORES BIOELÉCTRICOS.	74
Capítulo 6.	76
INTEGRACIÓN DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA.	76
6.1 AMPLIFICADOR DE TRANSIMPEDANCIA.	76
6.2 AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN.	80
6.3 PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA	81
6.4 CONVERSIÓN ANALÓGICA-DIGITAL .	86
6.4.1 RESOLUCIÓN DEL CONVERTIDOR ANALOGICO DIGITAL	87
6.4.2 ERRORES DEL CONVERTIDOR ANALOGICO DIGITAL	87
6.5 EEPROM	89

6.6 MEDICIÓN DE IMPEDANCIA DE FORMA EXPERIMENTAL EN EL PROYECTO.	90
6.7 VALIDACIÓN DE RESULTADOS	90
6.8 MEDICIÓN DEL ÁNGULO DE DESFASE	91
Capítulo 7	97
PLATAFORMA FINAL	97
Capítulo 8	98
CONCLUSIONES	98
REFERENCIAS.	99
ANEXO A (PROGRAMAS)	104

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 PARÁMETROS QUE CARACTERIZAN A UNA SEÑAL DE CORRIENTE ALTERNA SINUSOIDAL.....	15
FIGURA 2.2 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL MÓDULO Y LA FASE DE LA IMPEDANCIA.....	16
FIGURA 2.3 (a) CIRCUITO RESISTIVO (b) DIAGRAMA DE FASORES PARA UN CIRCUITO PURAMENTE RESISTIVO (c) GRÁFICAS DE V FRENTE A WT PARA EL MISMO CIRCUITO.....	19
FIGURA 2.4 (a) CIRCUITO CAPACITIVO (b) DIAGRAMA DE FASORES PARA UN CIRCUITO PURAMENTE CAPACITIVO (c) GRÁFICAS DE V FRENTE A WT PARA EL MISMO CIRCUITO.....	20
FIGURA 2.5 (a) CIRCUITO INDUCTIVO (b) DIAGRAMA DE FASORES PARA UN CIRCUITO PURAMENTE INDUCTIVO (c) GRÁFICAS DE V FRENTE A WT PARA EL MISMO CIRCUITO.....	20
FIGURA 2.6 DERIVACIÓN GRÁFICA DEL ÁNGULO DE FASE Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA (R). LA REACTANCIA (XC) Y LA IMPEDANCIA (Z).....	21
FIGURA 2.7 CANALES DE NA ⁺ Y K ⁺ EN LA MEMBRANA CELULAR.....	25
FIGURA 2.8 CIRCUITO ELÉCTRICO EQUIVALENTE DE LA MEMBRANA.....	27
FIGURA 2.9 POTENCIAL DE ACCIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR.....	29
FIGURA 2.10 CURVA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO CERRADO.....	31
FIGURA 2.11 MODELO DE MICROELECTRODO Y CULTIVO CELULAR.....	34
FIGURA 2.12 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL MODELO DE MICROELECTRODO Y CULTIVO CELULAR.....	35
FIGURA 2.13 A) CIRCUITO EQUIVALENTE DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA B) ESPECTRO DE IMPEDANCIA EN EL MEDIO DE CRECIMIENTO JUNTO CON LA CURVA DE AJUSTE.....	36
FIGURA 2.14 PORCENTAJE DE CAMBIO DE IMPEDANCIA A DIFERENTES FRECUENCIAS DURANTE EL CRECIMIENTO DE SALMONELLA TYPHIMURIUM.....	37
FIGURA 2.15 ESQUEMA DE DOBLE CAPA EN UN LÍQUIDO EN CONTACTO CON UN	

SÓLIDO CARGADO NEGATIVAMENTE.....	38
FIGURA 3.1 FLUJO DE ELECTRONES A TRAVÉS DE ELECTRODOS SUMERGIDOS EN MEDIO DE CULTIVO.....	39
FIGURA. 3.2 FLUJO DE ELECTRONES CON CÉLULAS ADHERIDAS A LOS ELECTRODOS.....	40
FIGURA. 3.3 UNIÓN DE CÉLULA- ELECTRODO, SE MUESTRA LA ADHESIÓN FOCAL DE LA CÉLULA Y EL FLUJO DE CORRIENTE.....	40
FIGURA 3.4. GRÁFICA DE LA MAGNITUD DE IMPEDANCIA CONTRA FRECUENCIA EN ESCALA LOGARÍTMICA PARA CUATRO ELECTRODOS DE DIFERENTE ÁREA....	42
FIGURA 3.5. CONFIGURACIÓN DEL SENSOR CON CUATRO ELECTRODOS DE DIFERENTE ÁREA.....	42
FIGURA 3.6. EFECTOS DE LA FRECUENCIA EN LOS CAMBIOS DE IMPEDANCIA EN ELECTRODOS DE MEDICIÓN CELULAR.....	43
FIGURA 3.7 CHIP PARA CONTEO DE HEP G2.....	43
FIGURA 3.8 PASOS PRINCIPALES DE LA FOTOLITOGRAFÍA.....	45
FIGURA 3.9 PROCESO PARA FABRICAR MICROELECTRODOS USANDO TÉCNICA DE MICROFABRICACIÓN LÁSER EN SUSTRATO DE PMMA.....	46
FIGURA 3.10 ELECTRODO FABRICADO ESPECIALMENTE PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS.....	47
FIGURA 3.11 DIAGRAMA DE CONEXIÓN DEL MEDIDOR LCR CON EL MICROELECTRODO.....	48
FIGURA 3.12 MEDICIÓN DE IMPEDANCIA REAL DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CÉLULAS EN EL MEDIDOR LCR.....	48
FIGURA 3.13 MEDICIÓN DE ÁNGULO DE DESFASE CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CÉLULAS EN EL MEDIDOR LCR.....	49
FIGURA 4.1. MINI-INCUBADORA.....	51

FIGURA 4.2 EFECTO PELTIER.....	55
FIGURA 4.3 TIEMPOS CALENTAMIENTO Y ENFRIAMIENTO DE MINI-INCUBADORA..	56
FIGURA 4.4 GRÁFICA DE CONTROL DE TEMPERATURA DENTRO DE MINI-INCUBADORA.....	57
FIGURA 4.5. GRÁFICA DE CONTROL DE HUMEDAD DENTRO DE MINI-INCUBADORA.....	58
FIGURA 4.6. ABSORCIÓN DE ENERGÍA INFRARROJA POR EL CO ₂	60
FIGURA 4.7 VÁLVULA SOLENOIDE NORMALMENTE CERRADA.....	62
FIGURA 4.8. GRÁFICA DE CONCENTRACIÓN DE CO ₂ DENTRO DE MINI-INCUBADORA.....	63
FIGURA 4.9 DISPLAY 4 DÍGITOS.....	64
FIGURA. 4.10 ESQUEMA MINI-INCUBADORA.....	64
FIGURA 4.11 MEDICIONES SIMULTÁNEAS MINI-INCUBADORA.....	65
FIGURA 5.1 AMPLIFICADOR DIFERENCIAL OPERACIONAL (OP-AMP).....	68
FIGURA 5.2 SÍMBOLO DE CIRCUITO DE UN OP-AMP.....	68
FIGURA 5.3 TENSIÓN DE OFFSET DE ENTRADA.....	70
FIGURA 5.4 RAZÓN DE RECHAZO DE MODO COMÚN.....	70
FIGURA 5.5. FUENTES DE RUIDO EN UN OP-AMP.....	72
FIGURA 6.1 AMPLIFICADOR DE TRANSIMPEDANCIA.....	76
FIGURA 6.2 SIMULACIÓN DE CIRCUITO DE TRANSIMPEDANCIA.....	77
FIGURA 6.3 SALIDA DE AMPLIFICADOR DE TRANSIMPEDANCIA, C _{d1} =100, R _i = 1KOHM, C _{d1} = 1nF.....	77
FIGURA 6.4 SALIDA DE AMPLIFICADOR DE TRANSIMPEDANCIA, C _{d1} =100, R _i = 1KOHM, C _{d1} = 10nF.....	78
FIGURA 6.5 DESFASE SEÑAL DE ENTRADA VS SALIDA TRANSIMPEDANCIA; C _{d1} = 1nF.....	78

FIGURA 6.6 DESFASE SEÑAL DE ENTRADA VS SALIDA TRANSIMPEDANCIA; Cdi = 10nF.....	79
FIGURA 6.7 AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN.....	80
FIGURA 6.8 LOW SIDE SENSING CON AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN.....	82
FIGURA 6.9 SIMULACIÓN DE SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA BASADO EN AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN.....	83
FIGURA 6.10 SEÑALES DE ENTRADA Y SALIDA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA BASADO EN AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN. Cdi =100, Ri= 1Kohm, Cdi= 1nF.....	83
FIGURA 6.11 DESFASE ENTRE ENTRADA Y SALIDA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA BASADO EN AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN. Cdi =100, Ri= 1Kohm, Cdi= 1nF.....	84
Figura 6.12 SEÑALES DE ENTRADA Y SALIDA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA BASADO EN AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN. Cdi =100, Ri= 1Kohm, Cdi= 10nF.....	84
FIGURA 6.13 DESFASE ENTRE ENTRADA Y SALIDA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA BASADO EN AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN. Cdi =100, Ri= 1Kohm, Cdi= 10nF.....	84
FIGURA 6.14 ERROR DE TIEMPO DE MUESTREO EN CONVERSIÓN ANALÓGICA-DIGITAL.....	85
FIGURA 6.15 ERROR DE CUANTIFICACIÓN EN EL CONVERTOR ANALÓGICO-DIGITAL.....	8
7	
FIGURA 6.16. SEÑAL DE 10KHZ ADQUIRIDA POR EL CONVERTIDOR ANALÓGICO DIGITAL DEL TMC1294.....	88
FIGURA 6.17 DIFERENCIAS DE AMPLITUD ENTRE UNA SEÑAL CON Cdi = 1 nF, 5 nF Y 10 nF.....	89
FIGURA 6.18 COMPARACIÓN DE IMPEDANCIA TEÓRICA VS IMPEDANCIA EXPERIMENTAL.....	90
FIGURA 6.19 VARIACIÓN EN LAS MEDIDAS DEL MICROCONTROLADOR.....	90

FIGURA 6.20 FIGURAS DE LISSAJOUS DE 0° A 90°.....	92
FIGURA 6.21 MEDICIÓN DEL ÁNGULO EN FIGURAS DE LISSAJOUS.....	92
FIGURA 6.22 SEÑALES SENOIDALES DE 1 VPP DE AMPLITUD Y 10 KHZ DE FRECUENCIA SIN DESFASE.....	93
FIGURA 6.23 SEÑALES SENOIDALES DE 1 VPP DE AMPLITUD Y 10 KHZ DE FRECUENCIA CON 90 ° DE DESFASE.....	94
FIGURA 6.24 SEÑALES SENOIDALES DE 1 VPP DE AMPLITUD Y 10 KHZ DE FRECUENCIA CON -90 ° DE DESFASE.....	94
FIGURA 6.25 COMPARACIÓN CON OSCILOSCOPIO DESFASES DE 0 A 90°.....	95
FIGURA 6.26 COMPARACIÓN CON OSCILOSCOPIO DESFASES DE 0 A -90°.....	95
FIGURA 7.1 MINI-INCUBADORA EN FUNCIONAMIENTO.....	96
FIGURA 7.2 BLOQUES DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA.....	96

Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años, según la Organización Mundial de la Salud [1], ya que aún existen muchos desafíos; tanto para tratar el cáncer como para lograr una respuesta inmunitaria óptima que permita erradicarlo, a la vez que se evitan respuestas que causan daños autoinmunitarios a los tejidos normales [2]. Un desafío adicional es la determinación de por qué las inmunoterapias actuales funcionan en algunos pacientes y no en otros.

Uno de los tratamientos utilizados para tratar el cáncer es la quimioterapia. La quimioterapia es un tipo de tratamiento del cáncer que usa fármacos antineoplásicos (citotóxicos) para destruir células cancerosas. La quimioterapia no solo destruye las células cancerosas, sino también destruye o frena el crecimiento de células sanas que crecen y se dividen con rapidez como las células epiteliales, la médula ósea y las células germinales .

Los agentes citotóxicos son un grupo heterogéneo de sustancias de distinta naturaleza química. Por su mecanismo de acción se clasifican en :

- Agentes alquilantes
- Antimetabólicos.
- Complejos de platino.
- Antibióticos citostáticos.
- Productos de origen natural.

El cáncer de cada persona contiene una constelación exclusiva de mutaciones génicas y otras alteraciones, lo cual hace que sea más compleja la identificación de tratamientos que podrían funcionar mejor para el cáncer específico de una persona [2]; es por ello que se busca determinar la toxicidad de los tratamientos antineoplásicos a nivel celular en forma personalizada (en cultivos celulares de un paciente determinado) para la formulación de terapias dirigidas o en modelos específicos de líneas celulares, esto último para coadyuvar a la tendencia actual del desarrollo de chips biomiméticos [3, 4].

Actualmente existen métodos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, tales como el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul

de kenacid y el ensayo de reducción del MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico)[5], que están dentro de los ensayos más conocidos y validados. Estos ensayos tienen consideraciones específicas y trabajan con distintos tipos de células pero, si se necesita evaluar el efecto en células de una gran cantidad de pacientes, se necesita un sistema portable, confiable y accesible que arroje resultados similares a los de estudios ya validados.

La utilización de dispositivos como sensores, micro-electrodos y microcontroladores nos permitirán elaborar una plataforma capaz de medir, a través de la variación de la impedancia, la proliferación o muerte celular causada por un agente citotóxico. Efectivamente, el modelo eléctrico de la célula biológica tiene una componente capacitiva que se podrá medir electrónicamente y cuya contribución está directamente relacionada con el número de células.

En el artículo *Micromachines* 5(1), 1–12 (2014) se presenta un método para utilizar un arreglo de electrodos como un transductor eléctrico, que permite medir el cambio de impedancia causada por la existencia de diferentes sustancias. Si las células se adhieren y proliferan en la superficie de los electrodos de medición, la superficie libre del electrodo se reduce y, por lo tanto, la impedancia total a través de los electrodos se incrementa, lo cual permite detectar la presencia de células [6, 7]. La mayoría de los biosensores de impedancia se basan en este principio. Las células que se encuentran suspendidas también influyen en la impedancia, sin embargo dependen mucho de la conductancia del medio en el que se encuentran [6].

En nuestro grupo ya se cuenta con las bases de microfabricación de microelectrodos embebidos en plásticos transparentes compatibles con el cultivo celular, para análisis biológico como acrílico, polidimetilsiloxano (PDMS), acetato y ácido poliláctico (PLA). Todos estos materiales han mostrado ser compatibles con las condiciones básicas del cultivo celular, durante varios días, según las pruebas preliminares realizadas por otros colaboradores con diferentes tipos celulares.

1.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente proyecto es desarrollar un sistema que permita monitorizar la proliferación o muerte celular en cultivo, debido al efecto de agentes citotóxicos y basado en una plataforma con microelectrodos de registro existentes. Para garantizar las condiciones necesarias al cultivo, se propone construir una mini-incubadora *ad hoc* que ofrezca condiciones controladas de temperatura, humedad y concentración de CO₂. El sistema completo integraría entonces el sustrato de cultivo, el sistema de medición, el sistema electrónico de adquisición y procesamiento de datos para reportar el conteo y la incubadora para que funcione la plataforma de manera autónoma.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterización de micro-electrodos existentes en sustrato de cultivo con medidor de impedancia.

Diseño y Construcción de la mini-incubadora.

Incorporación de sensores y actuadores para el control del ambiente de la mini-incubadora con microcontrolador.

Construcción del sistema para medir impedancia de manera autónoma y comparación con un medidor de impedancia LCR meter E4980A.

Interconexión del medidor de impedancia con microcontrolador y automatización de mediciones.

1.3 ESTRUCTURA DE LOS CAPÍTULOS.

En el capítulo 2 se enuncian los principios que deben ser considerados para la medición de impedancia en cultivos celulares.

En el capítulo 3 se presentan diferentes técnicas de fabricación de microelectrodos y la técnica que se utilizó para caracterizar los microelectrodos de medición de impedancia.

En el capítulo 4 se presenta el diseño y la caracterización de los sensores para la construcción de una mini-incubadora que contendrá el sistema medidor de impedancia.

En el capítulo 5 se explica el funcionamiento de los amplificadores operacionales y las características que deben tener para construir un circuito basado en un amplificador de instrumentación, el cual permite medir la impedancia del cultivo celular sin medidor de impedancia de banco.

En el capítulo 6 se presenta el desarrollo e integración del sistema de medición de impedancia.

En el capítulo 7 se presenta la plataforma final

En el capítulo 8 se presentan las conclusiones de este trabajo de tesis.

Capítulo 2.

MEDICIÓN DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS CELULARES

En este capítulo se abordará el tema de la medición de impedancia eléctrica, en específico, en sistemas biológicos, y las técnicas descubiertas para efectuar ese tipo de mediciones; también se explicará el método de la microbiología de impedancia mediante el cual realizaremos la medición de la proliferación y muerte celular en cultivo.

2.1. CORRIENTE ALTERNA

La corriente alterna es la corriente eléctrica en la que la magnitud y el sentido varían cíclicamente. Los electrones del circuito se desplazan primero en un sentido (entre los electrodos de diferente polarización) y luego en sentido contrario. Esto se consigue alternando la polaridad del voltaje de la fuente.

La ventaja de la corriente alterna proviene de que la energía eléctrica en forma de corriente alterna se puede transmitir a grandes distancias por medio de fáciles elevaciones de voltaje que reducen las pérdidas de energía en el transporte.

Las corrientes alternas más utilizadas son las llamadas periódicas, las cuales se repiten cada cierto intervalo de tiempo (periodo); entre ellas, la más importante es la llamada corriente sinusoidal o senoidal, porque es la única capaz de pasar a través de resistencias, bobinas y condensadores sin deformarse. Además, puede demostrarse que cualquier otra forma de onda se puede construir a partir de una suma de ondas sinusoidales de determinadas frecuencias.

Se llama sinusoidal porque sigue la forma de la función matemática seno. Los parámetros que caracterizan la señal en C.A se muestran en la figura 2.1 y son: la amplitud, la frecuencia angular y la fase inicial.

$$v(t) = V \text{ sen } (\omega t + \theta)$$

Frecuencia angular
Fase inicial

Amplitud
(2.1)

Fig 2.1 Parámetros que caracterizan a una señal de corriente alterna sinusoidal

Velocidad o frecuencia angular ω : es la magnitud del ángulo que recorre la señal alterna, de frecuencia f , en un segundo $\omega=2\pi f$ en rad/s.

Longitud de onda λ : es la distancia que recorre la onda en un intervalo transcurrido entre dos máximos consecutivos.

Valor RMS: es el valor de la corriente alterna que produce en una resistencia el mismo valor de potencia que uno de corriente directa.

Valor instantáneo: es el valor que asume una señal en cada instante.

Valor pico: el máximo valor instantáneo que alcanza la señal de corriente alterna.

Valor pico a pico: es el valor desde un máximo positivo hasta un máximo negativo en una señal de corriente alterna

Valor medio de una señal: es el promedio de valores de una señal. Matemáticamente es el resultado de sumar un determinado número de valores y dividir el resultado entre el número de valores tomados en cuenta en la suma.

Frecuencia : es el número de ciclos que completa una señal en 1 segundo $f = \frac{\omega}{2\pi}$

Periodo: es el tiempo que tarda una señal en completar un ciclo $T = \frac{2\pi}{\omega}$

Relaciones de fase: si dos o más señales no empiezan en el mismo instante, se dice que están desfasadas.

2.2 IMPEDANCIA ELÉCTRICA

La impedancia es una magnitud que establece la relación entre la tensión y la intensidad de corriente. Es la oposición total (Resistencia, Reactancia inductiva, Reactancia capacitiva) a la corriente de un sistema eléctrico. Tiene especial

importancia si la corriente varía en el tiempo, en cuyo caso, ésta, la tensión y la propia impedancia se describen de forma compleja o funciones del análisis armónico. Su módulo establece la relación entre los valores máximos o los valores eficaces de la tensión y de la corriente. La parte real de la impedancia es la resistencia y su parte imaginaria es la reactancia.

El concepto de impedancia generaliza la ley de Ohm en el estudio de circuitos en corriente alterna (AC). El término fue acuñado por Oliver Heaviside en 1886. En general, la solución para las corrientes y las tensiones de un circuito formado por resistencias, condensadores e inductancias y sin ningún componente de comportamiento no lineal, son soluciones de ecuaciones diferenciales. Pero, cuando todos los generadores de tensión y de corriente tienen la misma frecuencia constante y sus amplitudes son constantes, las soluciones en estado estacionario (cuando todos los fenómenos transitorios han desaparecido) son sinusoidales y todas las tensiones y corrientes tienen la misma frecuencia que los generadores y amplitud constante. La fase, sin embargo, se verá afectada por la parte compleja (reactancia) de la impedancia.

Sea un componente electrónico o eléctrico o un circuito alimentado por una corriente sinusoidal. Si la tensión en sus terminales es $A \sin(\omega t + \theta)$, la impedancia del circuito o del componente se define como un número complejo Z cuyo módulo y argumento están dados por:

$$|Z| = \frac{V_0}{I_0}; \quad \arg(Z) = \theta \quad (2.2)$$

El Módulo y la fase de Z también se pueden representar gráficamente como en la figura 2.2.

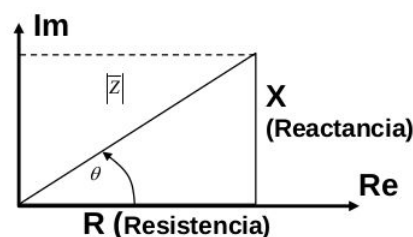


Fig 2.2 Representación gráfica del módulo y la fase de la Impedancia.[8]

Como las tensiones y las corrientes son sinusoidales, se pueden utilizar los valores pico (amplitudes), los valores eficaces, los valores pico a pico o los valores medios; pero hay que cuidar de ser uniforme y no mezclar los tipos. El resultado de los cálculos será del mismo tipo que el utilizado para los generadores de tensión o de corriente.

2.2.1 IMPEDANCIA EN CIRCUITOS RLC

Cuando se trabaja con circuitos de corriente alterna, interesa conocer las corrientes y tensiones sobre distintos elementos pasivos (resistencias, capacitores y bobinas). Asimismo, dado que la fuerza electromotriz que alimenta al circuito varía en el tiempo, es importante conocer la respuesta de estos elementos como función del tiempo.

El análisis de circuitos de corriente alterna se ve simplificado sobremanera si se utiliza la Ley de Ohm Generalizada.

$$V^* = I^* Z^* \quad (2.3)$$

donde Z^* es la impedancia del circuito. Si la tensión aplicada varía de forma senoidal, la impedancia puede expresarse como una función de la frecuencia y de las tres constantes fundamentales del circuito: R, C y L.

De este modo, para un circuito resistivo puro, la impedancia es igual a la resistencia.

$$Z^* = Z = R \quad (2.4)$$

Para un circuito capacitivo puro, la impedancia es igual a la reactancia capacitiva.

$$X_c^* = -j / \omega C \quad (2.5)$$

Para un circuito inductivo puro, la impedancia es igual a la reactancia inductiva.

$$X_L^* = \omega L j \quad (2.6)$$

Para un circuito RCL serie, la impedancia equivalente es la suma de las impedancias complejas de cada uno de los elementos que constituyen el circuito

$$Z^* = R + (X_L^* + (- X_c^*)) j \quad (2.7)$$

Para un circuito paralelo, la inversa de la impedancia equivalente es la suma de las inversas de las impedancias complejas de cada una de las n ramas del circuito.

$$1/Z^* = 1/Z_1^* + 1/Z_2^* + 1/Z_3^* + \dots + 1/Z_n^* \quad (2.8)$$

Para un circuito RCL paralelo, la inversa de la impedancia total es la suma de las inversas de las impedancias complejas de cada uno de las ramas del circuito.

$$1/Z^* = 1/R + 1/X_C^* + 1/X_L^* \quad (2.9)$$

El análisis de circuitos de corriente alterna,, mediante el uso de diagramas fasoriales y números complejos, se simplifica teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

En el caso de un circuito serie, ha de tomarse el fasor intensidad de corriente como base para determinar la relación de fase, puesto que es el mismo para todos los componentes del circuito.

En el caso de un circuito paralelo, debe tomarse el fasor tensión como base para determinar la relación de fase, ya que es el mismo para todas las ramas del circuito.

De este modo, los fasores representativos del circuito, se pueden expresar del siguiente modo:

CIRCUITO RLC SERIE	CIRCUITO RLC PARALELO
$I^* = I + 0j$	$\varepsilon^* = \varepsilon_m + 0j$
$V_R^* = V_R + 0j$	$I_R^* = I_R + 0j$
$V_L^* = 0 + V_Lj$	$I_C^* = 0 + I_Cj$
$V_C^* = 0 - V_Cj$	$I_L^* = 0 - I_Lj$
$\varepsilon^* = V_R^* + V_L^* + V_C^*$	$I_T^* = I_R^* + I_C + I_L^*$

Tabla 1. Fasores de un circuito RLC

Donde ε^* es la fuerza electromotriz o voltaje inducido, V_C , V_L , V_R , I_C , I_L e I_R corresponden a los voltajes y corrientes en las capacitancias, inductancias y resistencias del circuito.

Así, la resolución de un circuito de C.A. se limita a asignar las impedancias correspondientes a cada rama y luego resolverlo como si fuera un circuito de C.C. La Ley de Ohm Generalizada puede aplicarse para cada elemento del circuito y esto permite hallar las dependencias temporales y los desfases de cada uno de los elementos [9,10].

2.3 FASE EN CIRCUITOS DE CORRIENTE ALTERNA

En todos los circuitos de Corriente Directa (C.C.), el voltaje y la corriente alcanzan sus valores máximos y el valor cero al mismo tiempo, por lo que no es correcto hablar de una fase en este tipo de circuitos.

Los efectos de la inductancia y la capacitancia en circuitos de C.A. evitan que el voltaje y la corriente alcancen sus valores máximos y mínimos al mismo tiempo. Es decir, la corriente y el voltaje en la mayoría de los circuitos de C.A. están fuera de fase.

En los circuitos resistivos puros la corriente y la tensión están en fase (figura 2.3)

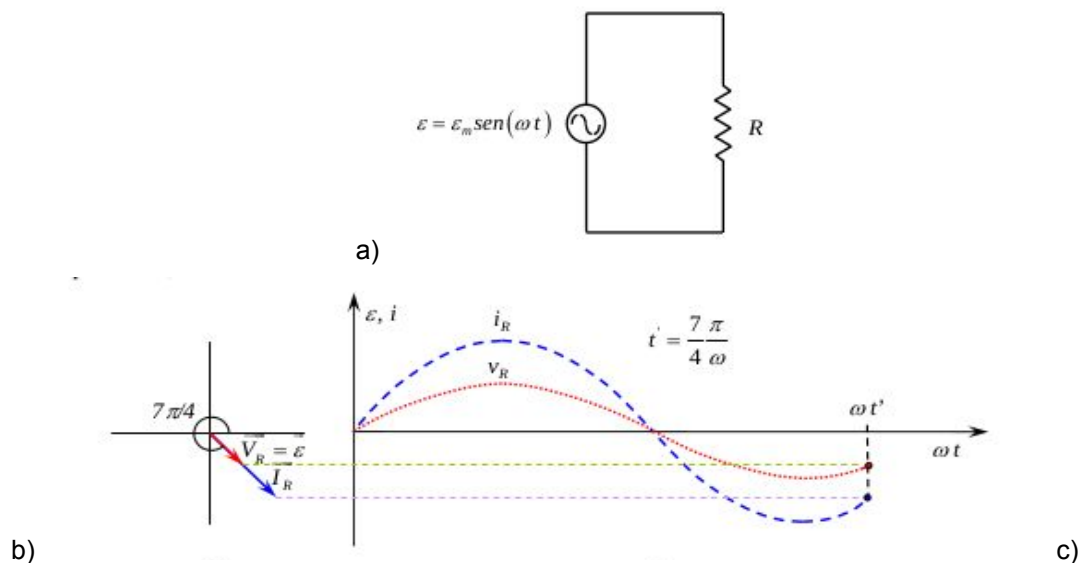


Fig 2.3 (a) Circuito resistivo (b) Diagrama de fasores para un circuito puramente resistivo (c) Gráficas de ε frente a ωt para el mismo circuito [11].

En los circuitos capacitivos puros la corriente está adelantada 90° respecto a la tensión (figura 2.4)

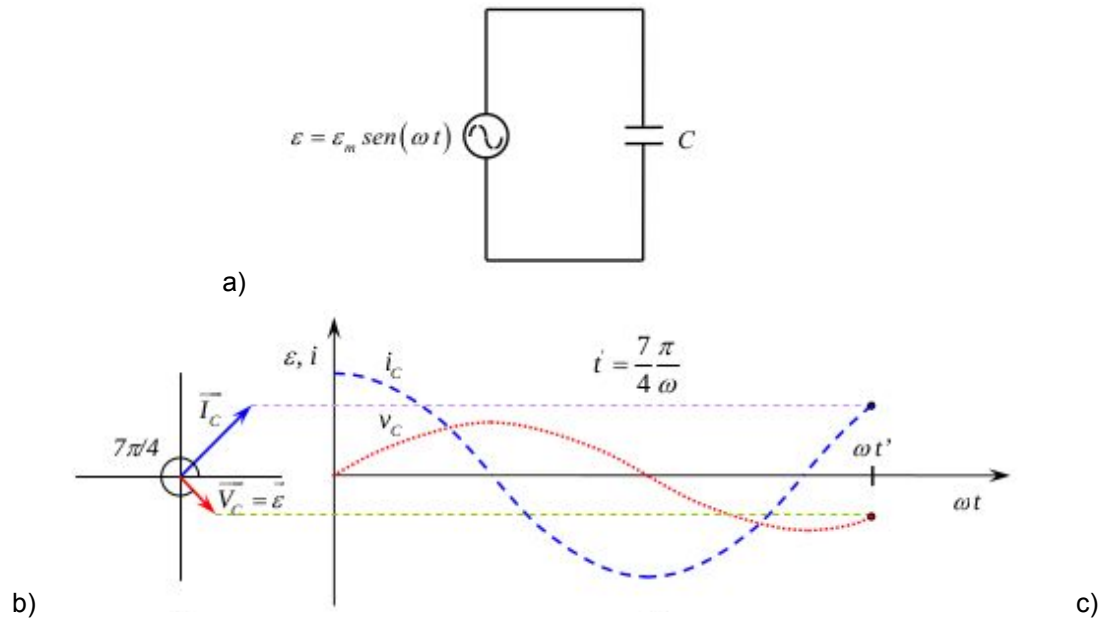


Fig 2.4 (a) Circuito capacitivo (b) Diagrama de fasores para un circuito puramente capacitivo (c) Gráficas de ε frente a ωt para el mismo circuito [11].

En los circuitos inductivos puros la corriente está atrasada 90° respecto de la tensión (figura 2.5)

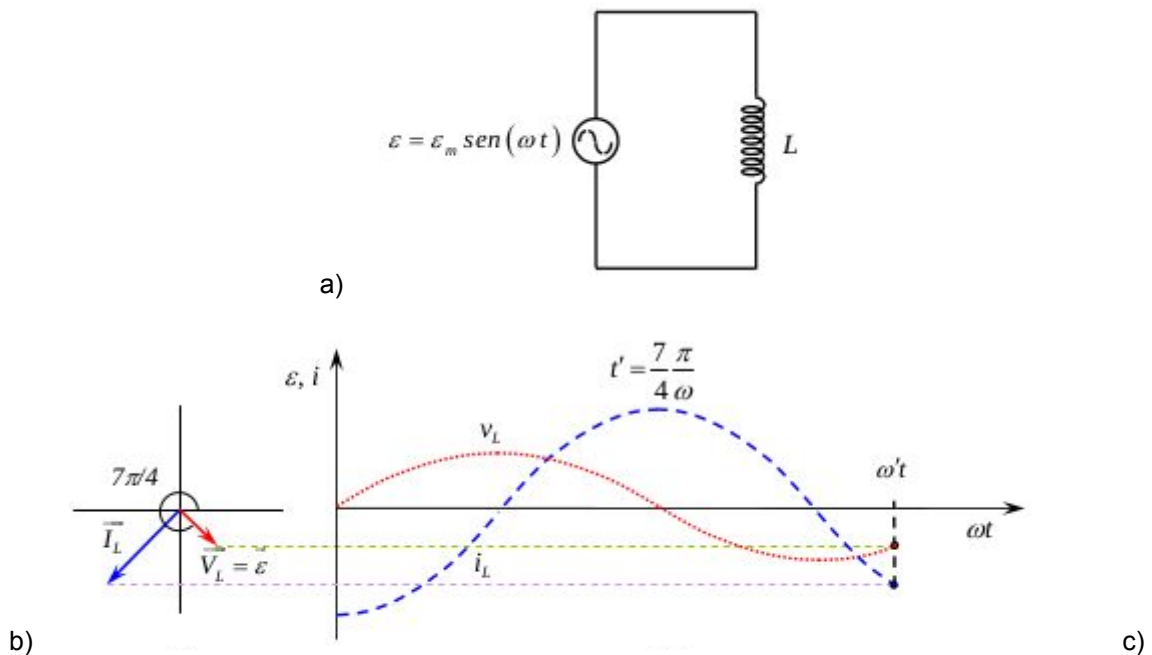


Fig 2.5 (a) Circuito inductivo (b) Diagrama de fasores para un circuito puramente inductivo (c) Gráficas de ε frente a ωt para el mismo circuito [11].

2.4 PRINCIPIOS Y PROPIEDADES BIOELÉCTRICAS EN EL CUERPO HUMANO

La impedancia corporal (Z) está en función de 2 componentes: resistencia (R) y reactancia (X_c) (figura 2.6). A estos 2 componentes les corresponden la ecuación

$$Z^2 = R^2 + X_c^2 \quad (2.10)$$

La R representa la resistencia de los tejidos al paso de una corriente eléctrica y X_c es la oposición adicional debida a la capacitancia de esos tejidos y las membranas celulares (es el llamado componente dieléctrico) [12]. Es importante mencionar que los valores de la reactancia dependen de la frecuencia de la corriente eléctrica. La reactancia se debe al componente lipídico de las membranas de la masa celular.

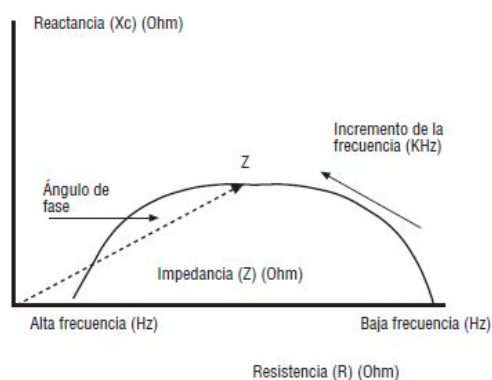


Fig 2.6 Derivación gráfica del ángulo de fase y su relación con la resistencia (R), la reactancia (X_c) y la impedancia (Z) [12].

Los aparatos de medición de impedancia eléctrica para el cuerpo introducen generalmente en el cuerpo una corriente alterna de amperaje muy bajo, que discurre por el cuerpo, actuando el agua corporal como elemento conductor y la resistencia que ofrece el fluido al paso de esa corriente es medida por el medidor de impedancias.

La resistencia en el cuerpo no es la misma que la de los conductores no biológicos. La reactancia está causada por la resistencia ofrecida por las membranas celulares, los tejidos de sostén y los tejidos no-iónicos que retardan el paso de la corriente [12]. Los flujos eléctricos de corriente atraviesan de forma diferente tanto los líquidos extracelulares, como los intracelulares, y son dependientes de la frecuencia de la corriente. Por ejemplo, en frecuencias de 5 Hz o menores, esta corriente fluye muy bien por el agua extracelular (AEC). En cambio,

con frecuencias por encima de 100 Hz, la corriente penetra en los tejidos corporales con una reactancia mínima. Un estudio más detallado de frecuencia a la cual la impedancia varía significativamente debido a la presencia de células es realizado en la sección 2.8 de este capítulo.

Para medir la proliferación de cultivos celulares, antes es conveniente conocer el ciclo de vida celular, la fisiología de la célula, sus compuestos principales y la reacción que tendrán a impulsos externos de tal manera que la medición que se planea efectuar no afecte la fisiología y el ciclo de vida de la célula.

2.5 LA CÉLULA

2.5.1 CICLO DE VIDA CELULAR

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula previo a la división en dos células hijas.

El ciclo celular se divide en dos fases principales: la interfase que se divide en los intervalos G_1 , S y G_2 , y la fase de Mitosis (M). El estado G_1 quiere decir «GAP 1» (Intervalo 1), el intervalo S representa la fase de «síntesis», en el que ocurre la replicación del ADN (ácidos desoxirribonucleicos), el intervalo G_2 representa «GAP 2» (Intervalo 2) y la fase M representa a la mitosis y la citocinesis (división del citoplasma).

Las células que se encuentran en el ciclo celular se denominan «proliferantes» y las que se encuentran en fase G_0 se llaman células «quiescentes». Todas las células se originan únicamente de otra existente con anterioridad. El ciclo celular se inicia en el instante en que aparece una nueva célula, descendiente de otra que se divide, y termina en el momento en que dicha célula, por división subsiguiente, origina dos nuevas células hijas. Cuando una célula no es necesaria o es una posible amenaza, ésta puede morir por apoptosis, ya sea por señales intra o extracelulares. [13, 14]

La célula puede encontrarse en dos estados muy diferenciados: el estado de no división o interfase y el estado de división o mitosis. En la Interfase, la célula realiza sus funciones específicas y, si está destinada a avanzar a la división celular, comienza por realizar la duplicación de su material genético (ADN). La interfase es la fase más larga del ciclo celular, ocupando casi el 90% del ciclo, transcurre entre dos mitosis y comprende tres etapas:

Fase G_1 (del inglés *Growth* o *Gap 1*): Es la primera fase del ciclo celular, en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN (ácidos

ribonucleicos). Es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN (replicación) teniendo una duración de entre 6 y 12 horas; durante este tiempo la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes.

Fase S (del inglés *Synthesis*): Es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN, como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de ADN que al principio. Tiene una duración de unas 10-12 horas y ocupa alrededor de la mitad del tiempo que dura el ciclo celular en una célula de mamífero típica.

Fase G₂ (del inglés *Growth* o *Gap 2*): Es la tercera fase de crecimiento del ciclo celular, en la que continúa la síntesis de proteínas y ARN. Al final de este período se observa al microscopio cambios en la estructura celular, que indican el principio de la división celular. Tiene una duración entre 3 y 4 horas. Termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis. En las células somáticas del humano, su estado diploide (después de la replicación) es de 23 pares de cromosomas.

Fase M (mitosis y citocinesis): Es la división celular en la que una célula progenitora (células eucariotas, células somáticas -células comunes del cuerpo-) se divide en dos células hijas idénticas. Esta fase incluye la mitosis, a su vez dividida en: profase, metafase, anafase, telofase; y la citocinesis, que se inicia ya en la telofase mitótica. La fase M duraría alrededor de 30 minutos.

2.5.2 FISIOLÓGÍA DE LA CÉLULA

Aunque existen cientos de tipos de células, todas ellas tienen una serie de características comunes[15]. Todas las células eucariotas tienen la siguiente estructura:

- Membrana plasmática: es la membrana que separa el contenido de la célula del exterior y está compuesta de lípidos anfipáticos (principalmente de fosfolípidos).
- Citoplasma y citosol: el citoplasma es el contenido celular localizado entre la membrana y el núcleo. El citosol es la porción semifluida del citoplasma, el fluido intracelular, compuesto por nutrientes, iones, proteínas solubles y otras pequeñas moléculas que participan en las diferentes fases del metabolismo celular. Los orgánulos y los endosomas están en suspensión en el citosol.

- Organelos: son estructuras membranales, también compuestas principalmente de fosfolípidos, altamente organizadas con formas y funciones específicas
- Vesículas o endosomas: Estructuras temporales que contienen productos de secreción y sustancias de reserva de las células.

El tamaño de la célula está relacionado con la función que ella desempeña y es una de las variables morfológicas que con frecuencia se ve afectada cuando la célula presenta alteraciones patológicas. Por ejemplo, en tejidos cancerosos se observa la hiperplasia, que consiste en un aumento en el número de las células que forman el tejido [16]. Generalmente el tamaño es constante para cada estirpe (o tipo) celular e independiente del tamaño del individuo.

2.5.3 MEMBRANA CELULAR

La función de la membrana es la de proteger el interior de la célula frente al líquido extracelular que tiene una composición diferente y de permitir la entrada de nutrientes, iones u otros materiales específicos. También se intercomunica con otras células a través de las hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc.

Una de las características más importantes de la membrana es que posee permeabilidad selectiva dependiendo de las propiedades químicas de cada molécula (polaridad, tamaño, hidrofobicidad, etc.), es decir, deja pasar ciertas sustancias en determinadas situaciones tanto hacia el exterior de la célula como hacia el interior.

En ambas fronteras de esta membrana están presentes diferentes iones, tanto positivos como negativos. Entre ellos se encuentran K^+ , Na^+ y Cl^- que son esenciales para el potencial de acción.

Debido a estas sustancias iónicas que se encuentran a un lado y al otro de la membrana, plasmática en ésta aparece una diferencia de potencial eléctrico; el potencial de membrana. Cuando este potencial se despolariza (mediante un estímulo externo), es decir, el potencial disminuye más allá de un cierto valor umbral, se genera un potencial de acción.

Estos cambios en el potencial de membrana son debidos a los movimientos de iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática mediante los llamados canales iónicos mostrados en la figura 2.7.

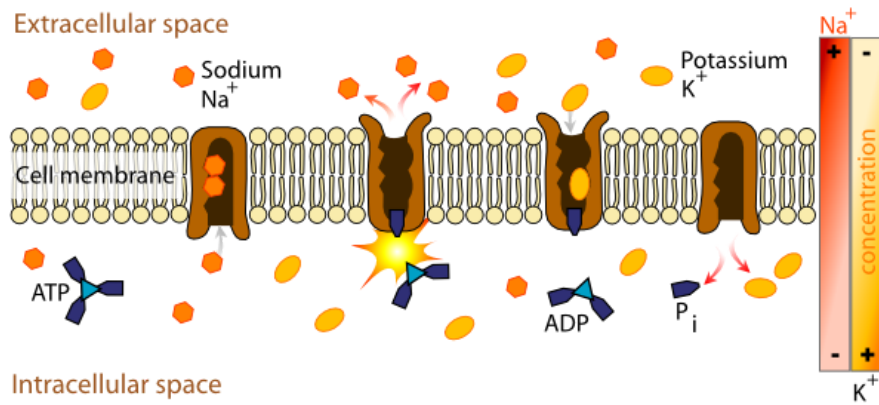


Fig 2.7 Canales de Na⁺ y K⁺ en la membrana celular [18]

El proceso se basa, esencialmente, en que primero se abre el canal iónico de Na⁺, introduciéndose estos iones en el interior de la célula, y se genera el potencial de acción. En ese momento se empiezan a abrir los canales del K⁺ y se empiezan a cerrar los del Na⁺, por tanto, los iones K⁺ se moverán hacia el exterior de la célula, volviendo a tomar el potencial de membrana el valor que existía al inicio del proceso.

En el líquido extracelular, los iones más importantes son el Na⁺ y el Cl⁻, mientras que en el interior de la célula predomina el K⁺ y fosfatos orgánicos aniónicos (PO⁻). Como resultado de esto, existe una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana (potencial de membrana) que se mide en voltios. El voltaje en las células vivas es de -20 a -200 mV (milivoltios), representando el signo negativo que el interior es más negativo que el exterior. En algunas condiciones especiales, algunas células pueden tener un potencial de membrana positivo.

2.5.4 COMPORTAMIENTO ELÉCTRICO DE LA MEMBRANA CELULAR

La descripción del comportamiento eléctrico de la membrana celular se basa en representar sus propiedades eléctricas con un circuito eléctrico equivalente. El descubrimiento de estas propiedades, así como el desarrollo del concepto de un circuito equivalente, fueron tema de estudio de numerosos investigadores durante años [17]. Sin embargo, el primer paso fue la demostración, usando métodos electrofisiológicos, de que todas las células están rodeadas por una membrana.

La primera demostración de que la conductancia de un medio conteniendo células disminuye, cuando la concentración de células aumenta, fué hecha en 1899 por Steward, quien encontró que las células vivas tienen una resistencia eléctrica mayor que la del medio que las rodea [18]. También observó que si las células eran

destruidas con saponina (detergente no iónico), la conductancia del medio se hacía independiente de la concentración de células destruidas, por lo que llegó a la conclusión de que la resistencia eléctrica estaba localizada en la membrana.

La presencia de una capacitancia en la membrana celular fue demostrada por Rudolf Höber (1910), quien la estudió aplicando corriente alterna a suspensiones de diferentes células y encontró que cuando la frecuencia de la corriente aplicada era alta, la impedancia de la membrana era baja, ya sea que las células estuvieran intactas o destruidas[18]. En cambio, cuando la frecuencia de la corriente era baja, la impedancia de un medio conteniendo células destruidas también lo era, pero si el medio contenía células intactas, la impedancia era alta, lo anterior implica que para poder diferenciar entre células vivas y muertas, la frecuencia de la corriente aplicada es determinante.

Posteriormente, alrededor de 1925, Hugo Fricke inició estudios con suspensiones de glóbulos rojos (eritrocitos) para medir la capacitancia de la membrana. Sus mediciones de la impedancia de esas células le permitieron calcular un valor de $0.81 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ para la capacitancia de la membrana, el cual, suponiendo una constante dieléctrica de 3 (igual a la del aceite), le daba un valor de 3.3 nm para el grosor de la membrana [19]. Estos experimentos son descritos con detalle por Kenneth S. Cole (1966), quien continuó los experimentos de Fricke, estudiando en forma semejante una gran variedad de células y como consecuencia actualmente se considera que el valor de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ para la capacitancia de la membrana es casi una constante biofísica [18].

Entre los experimentos clásicos en el estudio de la membrana celular se encuentran también los de Evert Gorter y Grendel (1925), quienes destilaron los lípidos de un número conocido de eritrocitos, encontrando que el área de la monocapa que obtenían era aproximadamente el doble de la superficie celular total [20]. Su interpretación de esos resultados es aún válida, indicando en ellos que la membrana está constituida por una bicapa de lípidos. Esta fue una conclusión impresionante para aquella época. Así, todos esos experimentos y muchos otros, demostraron la presencia y el valor de una capacitancia en la membrana celular.

La presencia de una resistencia eléctrica en la membrana celular fue establecida por medio de experimentos similares a los anteriores, conducidos por Fricke y Morse (1925). Estos experimentos fueron hechos con suspensiones de eritrocitos a los que aplicaron corriente alterna a varias frecuencias y fueron seguidos por experimentos en células aisladas (de huevecillos de los equinodermos Arbacia e Hippone, de estrella de mar Asterios, de grillos y de axones de calamares gigantes), suspensiones de eritrocitos y tejidos (de piel de rana, de diafragma de gato, de células cultivadas de músculo cardíaco de embriones de rata, de músculo esquelético de rana), hasta llegar finalmente a los registros intracelulares en el axón

de calamar gigante (Hodgkin y Huxley, 1939; Curtis y Cole, 1940) [20, 21].

Ya para mediados del siglo XX, Cole (1940) empezó a hacer mediciones internas del potencial de reposo y del potencial de acción con pipetas intracelulares llenas de KCl (Hodgkin y Huxley, 1939; Curtis y Cole, 1940). En estos experimentos, después de corregir los errores debido a los potenciales de unión líquida, obtuvo valores de aproximadamente -61 mV para el potencial de la membrana en reposo, mientras el potencial de acción promediaba 110 mV en amplitud. Con esos datos, Cole encontró que la membrana tenía que invertir su polaridad durante el potencial de acción, pero como al sustituir el agua de mar con dextrosa isotónica su amplitud no cambiaba, concluyó que tal vez la inversión era debida a un efecto de resonancia ocasionado por una capacitancia ($1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) y una inductancia ($0.2 \text{ H}/\text{cm}^2$) en la membrana. Como la inductancia ya había sido propuesta y utilizada anteriormente para explicar los resultados experimentales obtenidos durante las mediciones de la impedancia transversal de los axones gigantes (Cole y Baker, 1941), no le fue difícil aceptar que era el factor más importante [22].

Por lo tanto, el circuito equivalente que Cole consideró inicialmente como una representación de la membrana contenía una inductancia. Sin embargo, para 1947 lo abandonó y correctamente atribuyó el comportamiento inductivo a una consecuencia de las características no-lineales de la membrana. Así, el circuito equivalente usado actualmente para el estudio de las propiedades eléctricas de la membrana celular tiene solamente dos componentes en paralelo, resistencia y capacitancia, como se muestra en la figura 2.9.

Circuito equivalente de la membrana

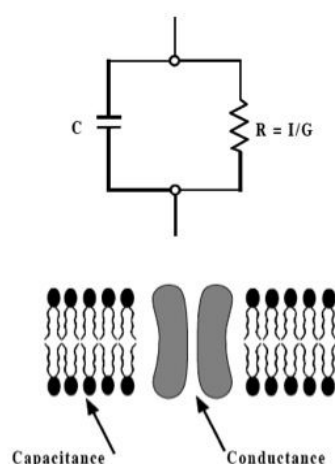


Fig. 2.8 Circuito eléctrico equivalente de la membrana. Los medios conductores interno y externo separados por la bicapa lipídica (dieléctrico) están representados por las placas del capacitor,

mientras los canales iónicos para el sodio y el potasio lo están por la resistencia [18].

2.5.5 EXCITABILIDAD CELULAR

Todos los sistemas biológicos son capaces de detectar las variaciones energéticas que ocurren en el medio que los rodea. Esta característica, de detectar cambios energéticos del medio y reaccionar ante ellos, constituye una de las principales propiedades de los sistemas biológicos y se le denomina irritabilidad[23]. Las variaciones energéticas (mecánicas, químicas, eléctricas, térmicas, lumínicas) que tienen lugar en el medio extracelular son los estímulos y las acciones de adaptación del sistema biológico ante estos, son las respuestas.

Todas las células que componen nuestro organismo son células excitables. El concepto de células excitables se le da a las células o tejidos que generan una respuesta cuando reciben un estímulo. Esta excitabilidad celular va a depender de la existencia de diferentes concentraciones de iones en ambos lados de la membrana celular y de la capacidad de intercambio activo y pasivo a través de estas membranas.

La capacidad celular de distribuir iones selectivamente a través de la membrana citoplásmica origina en ella diferencias en la distribución de cargas eléctricas. Esto permite a las células generar actividad eléctrica espontánea o en respuesta a la estimulación. Las corrientes iónicas fluyen de un lado a otro de la membrana celular, a través de poros proteicos que cruzan la membrana, llamados canales iónicos. Los canales iónicos son sensibles al voltaje, a los ligandos o a la tensión mecánica y son selectivamente permeables a diferentes tipos de iones.

La apertura de los canales iónicos permite el flujo de iones siguiendo su gradiente electroquímico. La corriente eléctrica producida por el flujo de iones a través de la membrana ocasiona cambios de voltaje que se propagan a lo largo de ésta. Si los cambios de voltaje son pequeños, es pasiva y sufre una atenuación a lo largo de la distancia. Si el cambio de voltaje sobrepasa un umbral de despolarización, se producen impulsos conocidos como potenciales de acción (figura 2.9). Estos son autoregenerativos y se propagan sin atenuación a lo largo de las células. Los impulsos nerviosos surgen de cambios transitorios en la permeabilidad membranal a los iones, principalmente de sodio y potasio, aunque en ocasiones el calcio tiene contribuciones importantes.

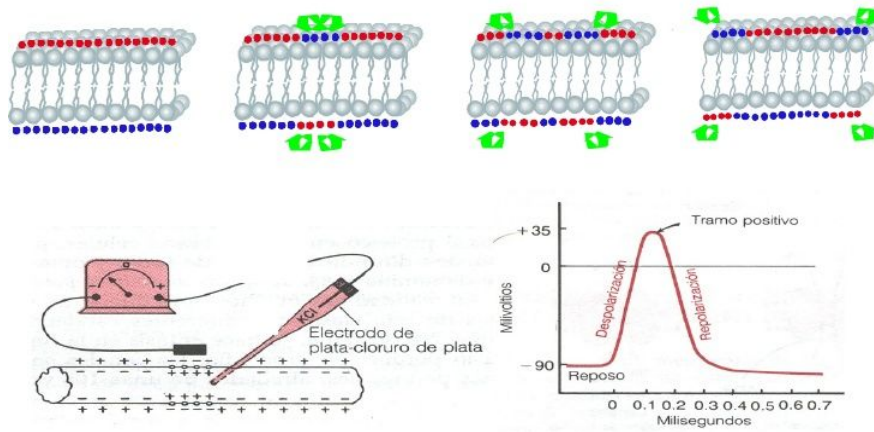


Fig. 2.9 Potencial de acción de la membrana celular [24].

2.6 MONITORIZACIÓN DE CRECIMIENTO Y MUERTE CELULAR

El ciclo celular es estudiado desde que el hombre sabe de su existencia y de su importancia para el crecimiento de organismos y la homeostasis de los tejidos. Sin embargo, en los últimos años, el interés se ha vuelto más bien un estudio detallado y caracterización de microorganismos incluidos las células.

La medición del crecimiento de células en sus diferentes etapas se ha convertido en una prioridad debido a las aplicaciones a las que se ha destinado, principalmente en áreas como la biomédica [25], ambiental [26] y alimenticia [27].

El crecimiento de una población celular puede ser entendido desde diferentes perspectivas y, de acuerdo a éstas, se puede llegar a determinar la medida del crecimiento mediante diversas metodologías.

2.6.1 TÉCNICAS EXISTENTES PARA MEDIR EL NÚMERO DE CÉLULAS

El crecimiento celular puede definirse como la capacidad para multiplicarse que tienen las células individuales, esto es, iniciar y completar las fases de su ciclo celular. De esta forma, se considera a las células como partículas discretas y el crecimiento es entendido como un aumento en el número total de partículas. Existen dos formas para determinar el número total de células en una muestra:

- Recuento microscópico:

Es una técnica común que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología o biología celular. Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuentos (hemocitómetros), aunque también pueden

realizarse a partir de células sin tinción (transparentadas) o teñidas con colorantes (Naranja de acridina o Azul de tripano).

La mayor dificultad del recuento en cámara es obtener reproducibilidad en el llenado de la cámara con líquido. Otra dificultad es la adsorción de las células en las superficies del vidrio, incluyendo pipetas. Esta adsorción es crítica en el proceso de dilución de la muestra y se minimiza al realizar las diluciones en medios de alta fuerza iónica (solución fisiológica o medios mínimos sin fuente de carbono).

Las cámaras más utilizadas son las de Hawksley y la de Petroff-Hausser. La primera tiene la ventaja que puede ser utilizada con objetivos de inmersión, aunque la mayoría de los recuentos se realizan con objetivos secos. Una de las mayores ventajas del recuento microscópico es brindar información adicional sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados [28].

- Recuento electrónico:

Los contadores electrónicos permiten realizar recuentos de células, bacterias, levaduras no filamentosas y protozoarios, pero no de hongos y microorganismos filamentosos o miceliares.

Estos instrumentos constan básicamente de dos compartimentos comunicados a través de un pequeño conducto. En ambos compartimentos hay electrodos que miden la resistencia eléctrica del sistema y, como el orificio del conducto es muy pequeño y su resistencia es muy alta, la resistencia eléctrica de cada compartimento es independiente.

El principio de funcionamiento de estos instrumentos es el que se explica a continuación. Un volumen fijo de una suspensión celular es forzada a pasar desde un compartimento al otro a través del pequeño conducto, en un muy breve intervalo de tiempo. Cuando un microorganismo pasa al nuevo compartimento, la resistencia de éste se incrementa debido a que la conductividad de la célula es menor que la del medio. Estos cambios en la resistencia son convertidos en pulsos o voltaje y contados.

Este tipo de recuento presenta algunos inconvenientes ya que ciertas células son muy pequeñas y producen cambios en la resistencia que son comparables al "ruido" generado por la turbulencia que se desarrolla al pasar el fluido por el orificio. No pueden medirse células que forman filamentos o agregados o soluciones muy concentradas de microorganismos, debido a que el pasaje de más de una célula en un breve período de tiempo va a ser tomado como una célula más grande. Es común la obstrucción del orificio por microorganismos muy grandes [28].

Otra forma de medir el crecimiento celular implica medir el aumento de los microorganismos capaces de formar colonias, debido a que sólo se tiene en cuenta el número de microorganismos viables; esto es, capaces de crecer indefinidamente. Las determinaciones que se utilizan son recuento de colonias y método del número más probable.

Para los fisiólogos bacterianos, bioquímicos y biólogos moleculares, una medida del crecimiento es el incremento de biomasa. Para ellos, la síntesis macromolecular y un incremento en la capacidad para la síntesis de los componentes celulares es una medida del crecimiento. Para este grupo, la división celular es un proceso esencial pero menor, que rara vez limita el crecimiento, ya que lo que limita el crecimiento es la capacidad del sistema enzimático para utilizar los recursos del medio y formar biomasa.

- Medida de la Biomasa

La medida de la masa de los constituyentes de la célula es utilizada frecuentemente como base para la medida de una actividad metabólica (figura 2.10), o de un constituyente metabólico o químico.

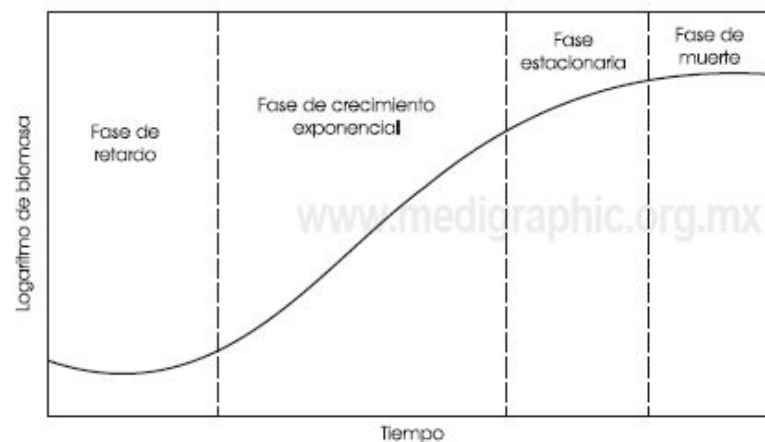


Fig 2.10 Curva de crecimiento de un cultivo cerrado. [29]

- Peso húmedo

Se obtiene a partir de una muestra en suspensión que es pesada luego de la separación de las células por filtración o centrifugación. Es una técnica útil para grandes volúmenes de muestra.

La principal desventaja es que el diluyente queda atrapado en el espacio intercelular y contribuye al peso total de la masa. La cantidad de líquido retenida puede ser importante, por ejemplo, un pellet de células bacterianas muy

empaquetadas puede contener un espacio intercelular que aporta entre el 5-30% del peso, de acuerdo a la forma y deformación celular. Para corregir el peso húmedo, se determina la cantidad de líquido que queda retenida en el espacio intercelular luego de una centrifugación; para ello se utilizan soluciones de polímeros no iónicos (como el Dextran) que pueden ingresar en el espacio intercelular pero no pueden atravesar las paredes bacterianas.

- **Peso seco**

El peso seco (contenido de sólidos) de las células que se encuentran en una suspensión se obtiene por el secado de un volumen en un horno a 105°C hasta peso constante.

Esta técnica es útil para grandes volúmenes de muestra, debido a que diferencias del orden de los miligramos representan el peso de un gran número de células.

La desventaja de este método es que componentes volátiles de la célula pueden perderse por el secado y puede existir alguna degradación. También la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene una humedad relativa alta.

- **Citometría de flujo**

Método basado en hacer pasar una a una las células de una suspensión por un sistema de detección; este sistema puede contener un detector capaz de medir diferentes parámetros (diferentes tipos de fluorescencia, absorbancia, dispersión de luz, etc.) lo que permite identificar las células durante su paso por el detector.

Un método indirecto es la técnica de medición de la impedancia eléctrica (IM) o bioimpedancia y la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIS, por sus siglas en inglés Electrical Impedance Spectroscopy) [29, 30, 31].

La aplicación de la impedancimetría en microbiología se conoce clásicamente como microbiología de impedancia (MI) y es un conjunto de técnicas que permiten monitorear, detectar, cuantificar y aún identificar microorganismos en muestras provenientes de la industria o la práctica médica.

La técnica consiste en realizar mediciones de las componentes de impedancia (por ejemplo conductancia, capacidad, módulo de impedancia o ángulo de fase) empleando el método bipolar, o el tetrapolar, con electrodos sumergidos en una celda que contiene un medio de cultivo inoculado y que es mantenido a temperatura constante.

2.7.2 MÉTODOS EMPLEADOS EN MICROBIOLOGÍA DE IMPEDANCIA

Varios métodos y circuitos han sido propuestos para la medición de los parámetros antes mencionados:

A. Puentes para medir cambios de impedancia o conductancia. Estos puentes son balanceados inicialmente contra una celda estéril o de referencia para disminuir variaciones de temperatura u otros parámetros .

B. Puentes de impedancia para medir el cociente de la impedancia de una celda de referencia sobre la suma de las impedancias de referencia y una celda inoculada. Este arreglo reduciría cambios extra-bacterianos.

C. Generador de corriente constante aplicado a una celda inoculada y un demodulador sensible a la fase. Esta técnica permite obtener señales proporcionales a las componentes resistiva total, reactiva total y módulo de impedancia total .

D. Una fuente de tensión senoidal aplicada a una celda inoculada a través de un resistor serie para medir la impedancia bipolar. Las tensiones medidas en el resistor serie, la celda de cultivo y la fuente permiten calcular por medio de la ley de Ohm y el teorema del coseno, el módulo de la impedancia y sus componentes resistiva y reactiva totales.

E. El método tetrapolar es similar al bipolar (punto D), pero evita la impedancia de la interfase electrodo-electrolito, y sólo mide la resistencia del medio de cultivo .

F. El método bi-frecuencia se basa en un técnica desarrollada por Schwan [32] y emplea las propiedades dependientes de la frecuencia de la impedancia de interfase, para separar las componentes de medio e interfase de la impedancia bipolar.

2.6.3 MÉTODO SELECCIONADO DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS CELULARES

La microbiología de impedancia (MI), también llamada microbiología de impedancia clásica, puede realizarse colocando dos electrodos de metal sumergidos en un medio de cultivo inoculado, midiendo entre ellos la impedancia bipolar a una frecuencia fija, mientras crecen los microorganismos presentes [33]. En él se miden los cambios de conductancia del medio o de capacidad de interfase debidos a la

actividad metabólica de los microorganismos presentes en un medio de cultivo. Es decir, no se mide directamente la presencia de células, sino su actividad metabólica.

Después de conocer los distintos métodos de conteo celular y las limitaciones de cada uno y teniendo en cuenta el objetivo de tener mediciones in situ y en tiempo real, se llegó a la conclusión que el más adecuado para desarrollar el sistema que medirá la proliferación y muerte celular en cultivo es el de microbiología de impedancia clásica, debido a que permitirá caracterizar cuantitativamente distintos tipos de células con pequeños ajustes de software; además, este método tiene la posibilidad de embeberse en un microcontrolador, lo cual proporcionará ventajas como la monitorización continua, la portabilidad y, según la capacidad del microcontrolador, una alta resolución en la medición de los cambios de impedancia.

2.7 MODELO DE MICROELECTRODO Y CULTIVO CELULAR.

La impedancia del electrodo puede ser modelada por una resistencia (R) y una reactancia (X) en serie cuyo valor decrece cuando la frecuencia se incrementa (Ragheb and Geddes, 1990).

El modelo mostrado en la figura (2.11), en el que se basa la primera caracterización de este estudio, consta de dos ramas en paralelo que simulan los microelectrodos fabricados, el medio de cultivo y las células presentes en dicho medio [34, 35, 36].

La primera rama tiene 3 elementos en serie, los dos capacitores representan la capacitancia de doble capa entre los electrodos y el medio (C_{DL}). La resistencia representa la resistencia del medio de cultivo (R_{sol}).

La segunda rama modela la capacitancia del medio de cultivo (C_{di}) y, por lo tanto, es la parte que simula las células dentro del medio de cultivo, ya que son las células las que aportan la componente capacitiva al medio. En la figura 2.12 se observan gráficamente los correspondientes del modelo.

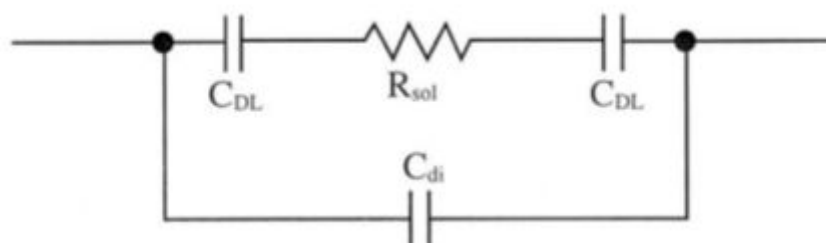


Fig 2.11 Modelo de microelectrodo y cultivo celular [36].

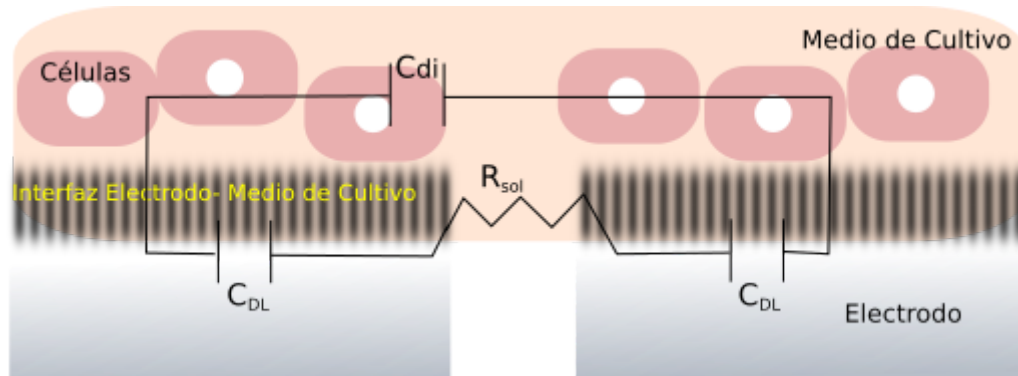


Fig 2.12 Representación gráfica del modelo de microelectrodo y cultivo celular.

2.8 DEPENDENCIA DE LA FRECUENCIA EN LAS MEDIDAS DE IMPEDANCIA

En general, se pueden identificar tres regiones discretas de dispersión en los tejidos biológicos: la dispersión alfa (10 Hz a unos pocos kHz), asociada con interfaces de tejido, como membranas; la dispersión Beta (1kHz a varios MHz), asociada a la polarización de las membranas celulares, las proteínas y otras macromoléculas orgánicas; y la dispersión Gamma (> 10 GHz), asociada a la polarización de las moléculas de agua.

En circuitos RC, como el que se utilizará como circuito equivalente del fenómeno a estudiar, la impedancia es directamente proporcional al periodo de oscilación de la señal de corriente alterna generada e inversamente proporcional a la frecuencia, ya que la impedancia de un circuito RC incrementa a medida que la frecuencia disminuye y viceversa.

El condensador del circuito RC genera un desfase en la señal de voltaje que se mide en la resistencia, el cual aumenta si se aumenta la frecuencia.

Cuando la capacitancia del circuito tiende a ser muy grande, la impedancia toma un valor muy cercano al de la resistencia.

De igual manera se comportan los electrodos inmersos en medio de cultivo, sólo que en este caso el comportamiento también depende de la geometría del electrodo, de la conductividad y permitividad del medio.

Dependiendo de la frecuencia del voltaje aplicado, la componente capacitiva del circuito influye con mayor o menor importancia en la magnitud total de la impedancia (figura 2.13). A continuación se explica el modelo con más detalle.

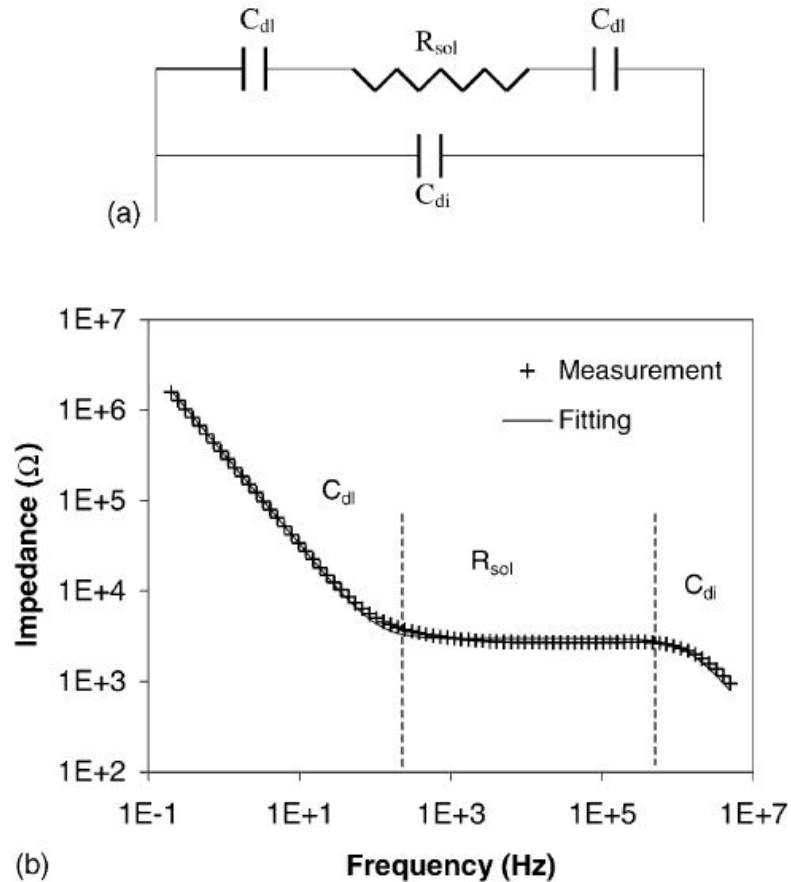


Fig 2.13 a) Circuito equivalente del sistema de medición de impedancia b) espectro de impedancia en el medio de crecimiento junto con la curva de ajuste. C_{dl} es la capacitancia de doble capa en cada electrodo; R_{sol} es la resistencia del medio; C_{di} es la capacitancia dieléctrica del medio; amplitud AC : 5 mV; rango de frecuencia: 0.2 hz- 5 Mhz [35].

La propiedad dependiente de la frecuencia de estas tres regiones puede interpretarse utilizando el circuito equivalente anterior, donde se aprecian dos ramas paralelas

En el circuito equivalente (C_{di} y $C_{dl} + R_{sol} + C_{dl}$), dos casos podrían ocurrir a la rama de capacitancia dieléctrica (C_{di}) en toda la gama de frecuencias de prueba. En un caso, cuando la frecuencia no sea suficientemente alta (<1 MHz), la corriente no puede pasar a través del condensador dieléctrico. Como resultado, la capacitancia dieléctrica paralela está inactiva, y sólo actúa como un circuito abierto. Sólo la capacitancia de doble capa y la resistencia media en serie debe tenerse en cuenta, para la impedancia total.

Cuando las células están presentes en el sistema, la presencia del aislamiento eléctrico de las membranas celulares influye en C_{di} [34].

Las células son conductores muy pobres en frecuencias por debajo de 10 kHz [39]. La conductividad de la membrana celular es de alrededor de 10^{-7} S/m, mientras que la conductividad del Interior de una célula puede ser tan alto como 1

S/m [40]. Por lo tanto, la proliferación celular puede estimarse midiendo la impedancia total en la región de baja frecuencia 10hz -10khz(figura 2.14).

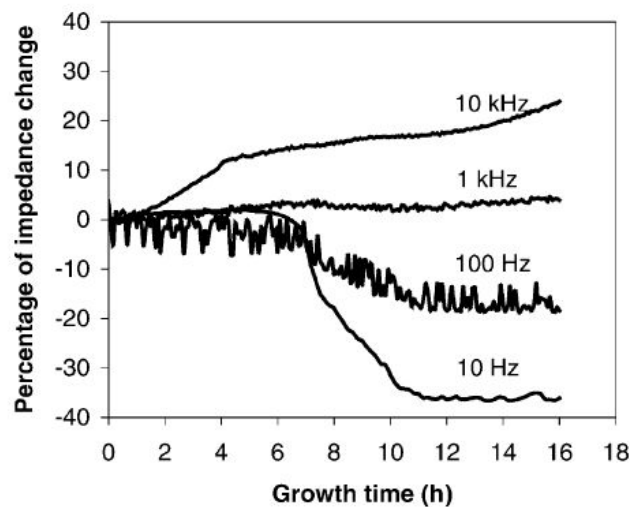


Fig 2.14 Porcentaje de cambio de impedancia a diferentes frecuencias durante el crecimiento de *Salmonella typhimurium* [35]

El segundo caso se produce a una frecuencia superior a 1 MHz, lo que permite el paso de corriente a través de la capacitancia dieléctrica en lugar de la resistencia del medio. Por lo tanto, la capacitancia dieléctrica del medio domina la impedancia total, y la capacitancia de doble capa y la resistencia media podrían ser ignoradas en este caso. Sin embargo, con el fin de no alterar el funcionamiento normal de las células, no es deseable para este proyecto hacer pasar corriente a través de ellas.

2.9 LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA

La doble capa eléctrica es la estructura que comprende la región de interfase entre dos fases. Contiene una distribución compleja de carga eléctrica que proviene de la transferencia de carga entre las fases, la adsorción de los iones positivos y negativos, la orientación de las moléculas con momento dipolar y la polarización de la carga eléctrica en las moléculas. Esta doble capa adquiere gran importancia en el comportamiento de los coloides y otras superficies en contacto con solventes. Uno de los principales efectos de la existencia de la doble capa en la interfaz electrodo-solución es la acumulación de carga o capacidad, superpuesta a una actividad faradaica.

Se ha demostrado experimentalmente que el comportamiento de la interfase electrodo-solución es análoga a la de un condensador y, puede darse un modelo parecido a un condensador para la región de interfase. A un potencial determinado existirá una carga en el electrodo y una carga en la solución, y sus valores serán iguales y opuestos. La carga del metal reside en la superficie del mismo y la carga

de la solución se encuentra en el exceso de iones que se encuentre cerca de esta superficie. Se suele dividir la carga entre el área del electrodo y se trabaja con densidad de carga. El arreglo de especies cargadas y dipolos orientados existentes en la interfase metal solución es conocido como doble capa eléctrica (figura 2.15). La capacidad de la doble capa (C_d) suele encontrarse entre $10\text{-}40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Sin embargo, a diferencia de los condensadores reales, C_d suele ser una función del potencial. [37]

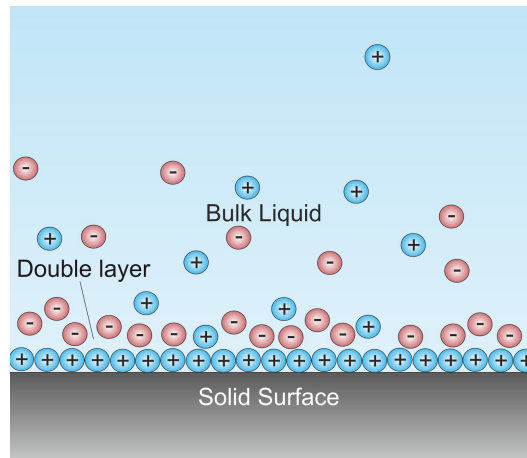


Fig 2.15 Esquema de doble capa en un líquido en contacto con un sólido cargado negativamente [38]

Los potenciales bioeléctricos generados en las células son potenciales iónicos, producidos por flujos de corrientes iónicas. La medida eficiente de esos potenciales iónicos requiere que sean convertidos en potenciales electrónicos antes de que se puedan medir con métodos convencionales. Es aquí donde adquieren importancia los microelectrodos de medición.

Capítulo 3.

CARACTERIZACIÓN DE MICROELECTRODOS

Para continuar con el desarrollo del proyecto es necesaria la utilización de un arreglo de microelectrodos adecuado para medir la impedancia en cultivo celular, en este capítulo se especifican las características funcionales, método de fabricación y caracterización de los microelectrodos de medición .

3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ELECTRODOS DE MEDICIÓN.

Como se mencionó en el capítulo 2, para poder utilizar el método de Microbiología de Impedancia se requieren dos electrodos de metal, sumergidos en un medio de cultivo con células, para posteriormente medir la impedancia entre ellos. El objetivo es lograr que las células se adhieran y proliferen en la superficie de los electrodos de medición, con lo cual incrementará la impedancia; por el contrario, la muerte celular conduce a la liberación de células de la superficie del electrodo de medición. Eso induce la disminución de la impedancia medida a través de los electrodos.

Las figuras 3.1 y 3.2 ilustran el comportamiento de la corriente a través de electrodos sumergidos en medios de cultivo con y sin células.

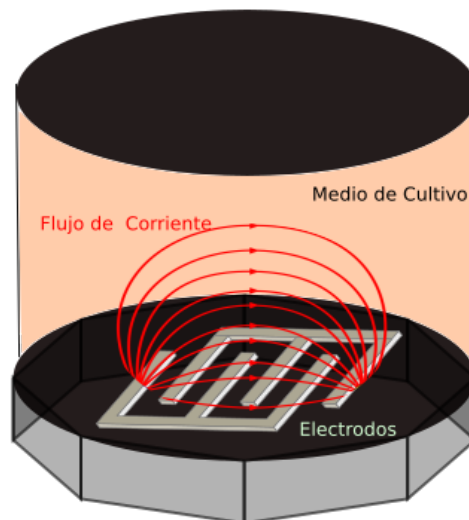


Fig 3.1 Flujo de corriente a través de electrodos sumergidos en el medio de cultivo

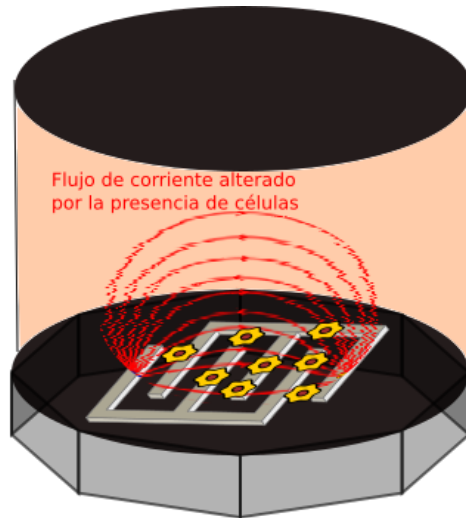


Fig. 3.2 Flujo de corriente con células adheridas a los electrodos

Cuando una célula crece en el electrodo, la célula forma adherencia con el electrodo, que representa el 15-20% de la Superficie celular. Además de las áreas de contacto, el espacio promedio entre la célula y la superficie del electrodo es de 50 nm a 150 nm.

Debido a que la membrana celular es altamente aislante, la corriente que fluye desde la parte cubierta por células debe fluir lateralmente a través de la región de la separación resistiva.

Así que, con la presencia celular, hay dos ramas para el flujo de corriente: la porción de electrodo expuesta con impedancia de $Z(\omega) / (\text{Area}_{\text{total}} - \text{Area}_{\text{cell}})$ y la porción cubierta de células con impedancia de $Z(\omega) / \text{Area}_{\text{cell}}$ (figura 3.3).

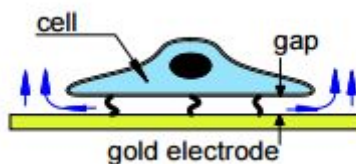


Fig. 3.3 Unión de célula- electrodo, se muestra la adhesión focal de la célula y el flujo de corriente [41]

Para que las células puedan adherirse a los electrodos y para que se puedan llevar a cabo mediciones de impedancia que arrojen datos útiles, los electrodos de medición deben de cumplir con ciertas especificaciones, entre las que están el material de fabricación, las dimensiones e incluso la forma.

3.1.1 MATERIALES

Existen varios materiales que sirven para la construcción de electrodos destinados a la medición de biopotenciales, en este caso de impedancia en cultivos celulares, algunos de ellos son los fabricados con plata - cloruro de plata, iridio-

Óxido de Iridio, ITO (Indium Tin oxide), platino y oro; así como PDMS dopado con distintos agentes para aumentar su conductividad.

A continuación se presenta la tabla 2 que recopila el estudio de las ventajas y desventajas de electrodos fabricados con distintos materiales, tanto para fines de sensado como de estimulación.

Tipo de electrodo	Para sensado	Para estimulación
Plata - Cloruro de plata	Bajo ruido electroquímico Bajo potencial de offset Bajo potencial de deriva Moderadamente costosos	Moderadamente útil con excitaciones bifásicas Pierden cloruro de plata con estimulaciones monofásicas
Platino y oro	Ruidosos a bajas frecuencias Exhiben potenciales de deriva Costosos	Excelentes para estimulaciones por periodos largos Funcionan bien con estimulación monofásica y bifásica
Iridio - Oxido de iridio	Generalmente ruidosos	Buen comportamiento general Gran transferencia de carga por unidad de área Muy costosos
Acero inoxidable	Ideales para señales de gran amplitud Bajo costo	Buen desempeño para aplicaciones cortas Bajo costo
PDMS con negro de carbón, nanotubos de carbón de multicapa o micro partículas metálicas	Generalmente ruidosos Aun en estudio	Buen comportamiento general Conductividad dependiente de su concentración Funcionan bien con estimulación monofásica y bifásica Bajo costo

Tabla 2. Comparación de propiedades de diferentes electrodos para biopotenciales [42]

3.1.2 DIMENSIONES Y CONFIGURACIÓN

Para encontrar el tamaño óptimo de los electrodos de medición, es necesario remontarse a estudios previos [7, 41]. en los que se prueban electrodos de distintas dimensiones y se obtiene su relación con los cambios de impedancia causados por la presencia de células.

Un estudio que utiliza fibroblastos 3T3 y electrodos de oro muestra la influencia del tamaño de los electrodos en las medidas de impedancia, los resultados se muestran en la figura 3.4

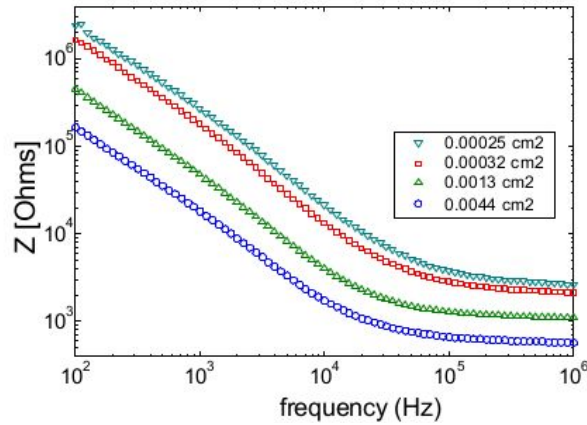


Fig. 3.4. Gráfica de la magnitud de la impedancia contra la frecuencia en escala logarítmica para cuatro electrodos de diferente área. [41]

La configuración de los electrodos utilizados en dicho estudio se muestra en la figura 3.5

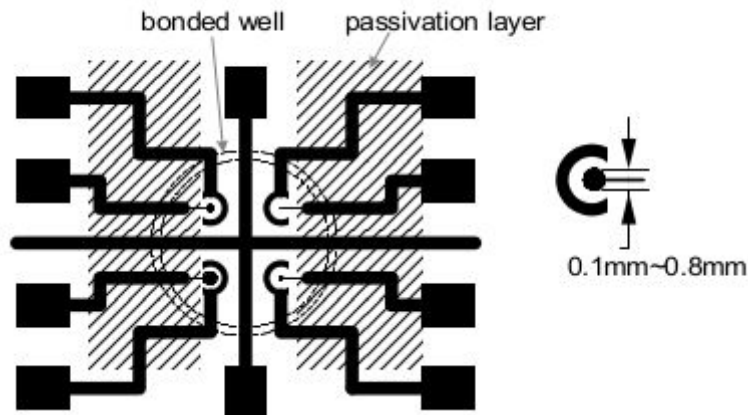


Fig. 3.5. Configuración del sensor con cuatro electrodos de diferente área. [41]

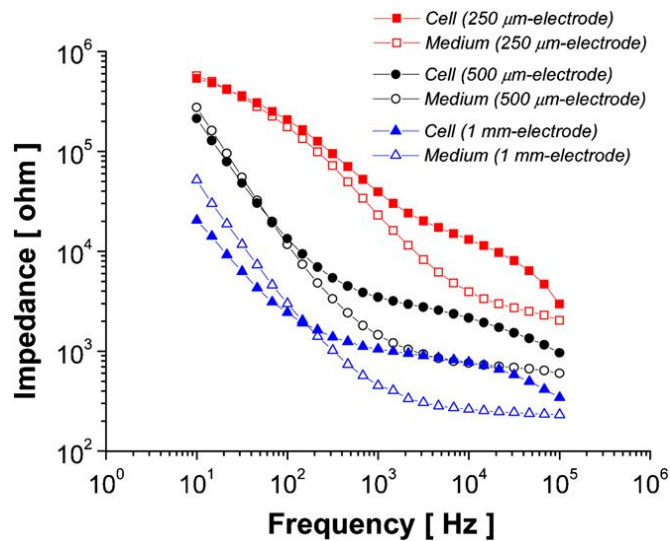


Fig. 3.6. Efectos de la frecuencia en los cambios de impedancia en electrodos de medición celular. Se utilizaron electrodos con diámetros de 250 μm , 500 μm y 1 mm. Miden la diferencia de impedancia entre células(HepG2) y el medio. [7]

La figura 3.6 fue tomada de un estudio en donde se mide el crecimiento de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) en microplacas multipozos medidos con electrodos de oro, donde se puede observar que la componente real de la impedancia depende del tamaño de los electrodos, además del medio presente entre ellos.

Se observa en este estudio que a una frecuencia de entre 1 y 10 kHz se obtiene la mayor diferencia de impedancia en mediciones con y sin células.

La forma de los electrodos que se utilizaron en este estudio se muestra en la figura 3.7.

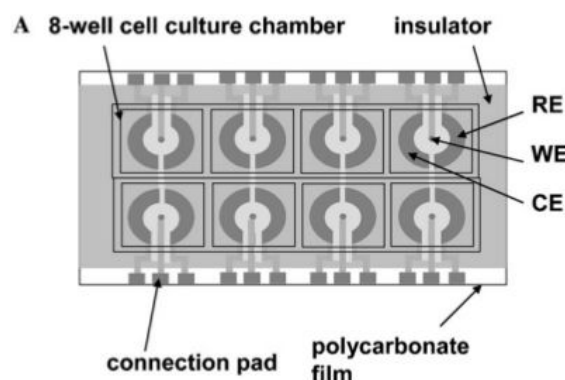


Fig 3.7 Chip para conteo de Hep G2, el cual consta de ocho cámaras de cultivo de células con un sistema de 3 electrodos que consiste en un electrodo de trabajo (WE), un un electrodo de referencia (RE) y un contraelectrodo (CE) en cada pocillo [7].

Dado que el rango de frecuencias de entre 1 y 10 kHz coincide en ambos estudios con la frecuencia óptima para medir el cambio de impedancia, es ésta la

que se utilizará para la posterior caracterización de electrodos y las mediciones con el sistema de medición de impedancia que se fabricará.

3.2 FABRICACIÓN DE MICROELECTRODOS

Para fabricar electrodos con las dimensiones y configuración antes explicadas, se pueden utilizar diversas técnicas de fotolitografía o como en este caso, una técnica desarrollada en el laboratorio de Micro-Nano-Tecnología que consiste en un transferencia directa de micropatrones por ablación láser [45].

La litografía es la tecnología que se utiliza para crear patrones con un tamaño que varía desde unos nanómetros hasta decenas de milímetros (tabla 3). Combinando la litografía con otros métodos como deposición y ataques (etching) se pueden obtener topologías de alta resolución e incluso obtener estructuras complejas a micro y nano escala. [43]

Técnica de litografía	Tamaño mínimo	Capacidad de producción	Aplicaciones
Fotolitografía (Impresión de contacto)	2-3 μm	Muy alta	Patrón típico en Nivel de laboratorio y Producción de diversos Dispositivos MEMS
Fotolitografía (Impresión de proyección)	37 nm	60-80 obleas / hora	Productos comerciales y Electrónica avanzada Incluyendo ICs avanzados, Chips de CPU
Litografía por haz de electrones	< 5 nm	8 hrs por chip	Máscaras e ICs Producción, modelado en R&D incluyendo fotónica Cristales, canales para Nanofluídica
Litografía por haz	20 nm	Muy lento	Lente plasmónica

de iones enfocado			
Litografía suave	30 nm	Alta	LOC para varias Aplicaciones
Litografía Nano-impresión	6-40 nm	>5 obleas/ hora	Bio-sensores , bio-Electrónica], LOC: nano Canales, nano cables
Nanolitografía Dip-pen	< 20 nm	Lento	Bioelectrónica , bio-Sensores, sensores de gas

Tabla 3. Especificaciones y aplicaciones de las principales técnicas de litografía. [43]

Las técnicas de litografía se dividen en dos tipos, dependiendo si se usa o no una máscara para transmitir el patrón. Entre las técnicas que utilizan máscara se encuentran la fotolitografía, litografía suave y litografía nanoimprint.

Por otro lado, en la litografía de haz de electrones, la litografía de haz de iones enfocado y la litografía de sonda de barrido no se utiliza una máscara, sin embargo se pueden crear estructuras de la escala de nanómetros aunque con un tiempo de fabricación más largo.

La fotolitografía es la técnica más usada en circuitos integrados, microchips y dispositivos MEMS comerciales, por lo cual en la figura 3.8 se muestra un esquema del proceso de fabricación por medio de fotolitografía.

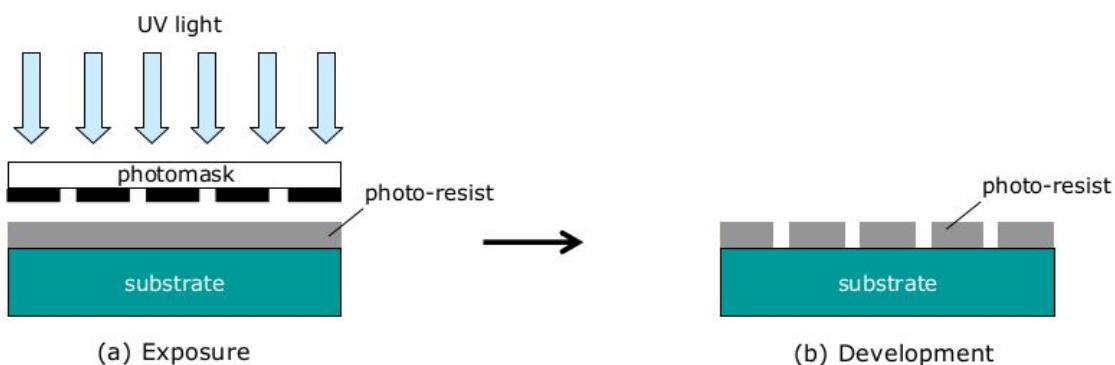


Fig 3.8 Pasos principales de la fotolitografía. (a) exposición: foto-resina revestido sobre el sustrato y exposición a la luz UV a través de la máscara (b) revelado: la foto-resina expuesta se elimina mediante inmersión en un revelador.

Otro método de fabricación interesante y de menor costo es el de transferencia directa por ablación láser.

Este método presenta varias ventajas: la velocidad de curado, la resolución, el costo reducido y la calidad del patrón a pesar de usar un láser de baja potencia.

En este procedimiento, una longitud de onda infrarroja de un diodo láser de unidad de CD-DVD es empleada para generar un microplasma local que permite ablación con resolución micrométrica en materiales normalmente transparentes a esta longitud de onda y que típicamente requiere de láseres de alta potencia y tiempos muy cortos [44, 45].

Es un método muy simple para la fabricación de microelectrodos sobre un sustrato de polimetilmetacrilato. Esta técnica de microfabricación se usa para grabar cualquier diseño en polimetilmetacrilato produciendo microcanales con geometría controlada.

Estos microcanales superficiales luego se llenan con una pasta conductora de material de nuestra elección, que se convierten en microelectrodos de formas y geometrías deseadas después del secado. [44]

Por su aplicación en sensores y biosensores de glucosa y el conteo celular, se adapta perfectamente a las necesidades del proyecto actual de medición de proliferación celular. Esta técnica fue desarrollada en el laboratorio de micro-nanotecnología del Lansbiodyt por Jehú López. En la figura 3.9 se muestra el detalle de su fabricación.

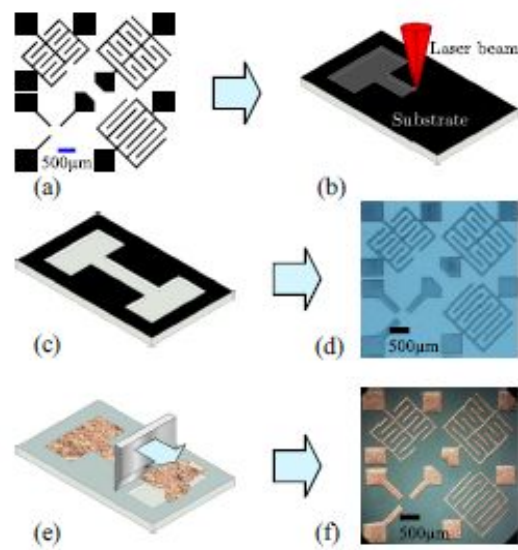


Fig 3.9 Proceso para fabricar microelectrodos usando técnica de microfabricación láser en sustrato de PMMA. a) es el diseño en 2D transferido a (b) sustrato de PMMA(polimetilmetacrilato) tratado con CNP e irradiado con el haz de un láser (c) después de limpiar el CNP de sustrato de PMMA (d) Un grabado de un diseño personalizado es obtenido y (e) Micromoldes rellenos con material conductivo produce los microelectrodos (f).

Se fabricaron varios tipos de microelectrodos con este método para otros proyectos del grupo de trabajo y se solicitó un juego de electrodos con la geometría y las dimensiones deseadas para este proyecto(figura 3.10). Se decidió basarse en el diseño de la figura 3.5.

Para caracterizar los electrodos se utilizó el medidor de impedancias Agilent LCR meter E4980A.

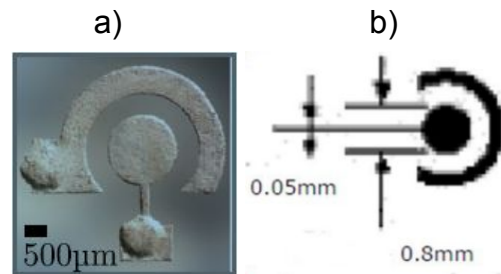


Fig.3.10 Micro-Electrodo fabricado especialmente para detección de células A) Imagen de micro-electrodo terminado, usando la técnica de microfabricación láser en sustrato de PMMA [44]. B) Dimensiones del electrodo

3.3 CARACTERIZACIÓN CON EL LCR-METER

El LCR es un instrumento de medición que proporciona las componentes resistiva, capacitiva e inductiva entre dos terminales de un circuito electrónico o medio de prueba al cual se le hace pasar un voltaje alterno que puede variar desde los 5 mv hasta los 2 V y desde los 20Hz hasta los 2 MHz.

Para medir con el LCR es necesario definir un rango de frecuencias y diferencia de potencial e introducir la señal a un material que posea cierta oposición al paso de corriente; el medidor dará como resultado la impedancia del mismo en la frecuencia y voltaje especificados.

La variación de impedancia y del ángulo de fase en un entorno de estudio puede ser más o menos pronunciada a cierta frecuencia, dependiendo de sus componentes capacitiva, resistiva o inductiva.

3.3.1 MEDICIONES OBTENIDAS CON EL LCR.

Con ayuda de un grupo de trabajo integrado por estudiantes de la carrera de física biomédica, se realizó la caracterización de la impedancia de los electrodos previamente fabricados por la técnica de microfabricación láser, en sustrato de PMMA. Para la caracterización se utilizó el medidor Agilent LCR meter E4980A. En la figura 3.11 se muestra el equipo utilizado y las conexiones para medir células en cultivo.

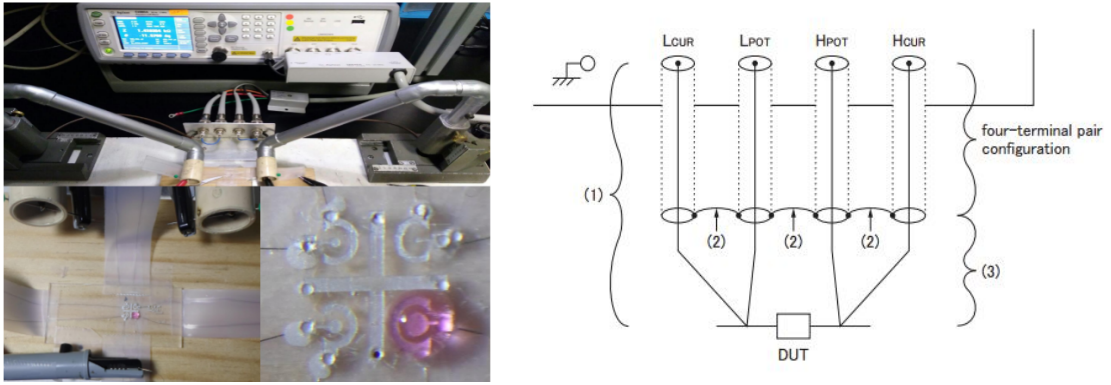


Fig.3.11 Diagrama de conexión del medidor LCR con el microelectrodo.

Se utilizaron concentraciones de 0.25 , 0.5 y 1.0×10^6 células/ml de hepatocitos C9 . Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 3.12 y 3.13.

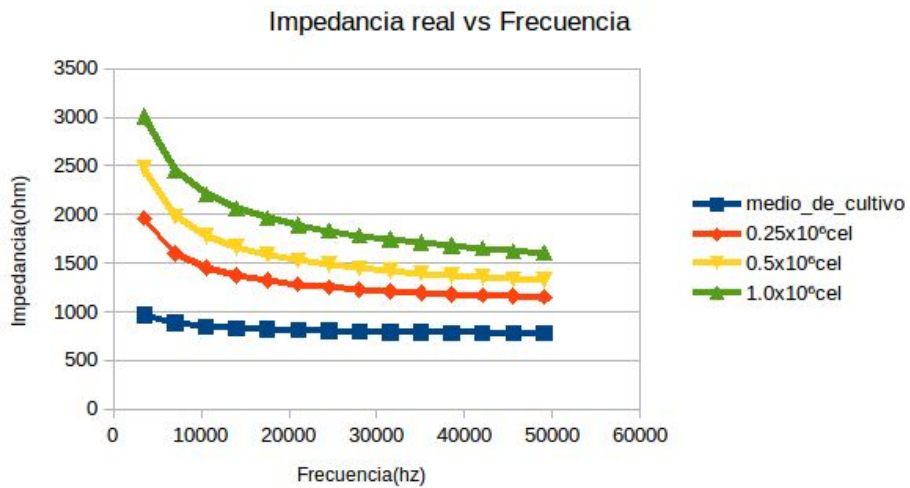


Fig.3.12 Medición de impedancia real de diferentes concentraciones de células en el medidor LCR

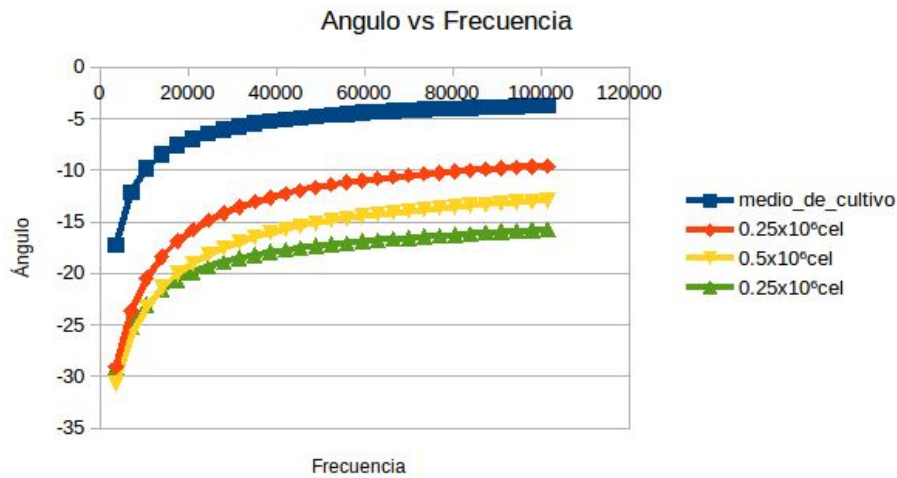


Fig.3.13 Medición de ángulo de desfase con diferentes concentraciones de células en el medidor LCR

En la caracterización se hizo un barrido de frecuencias desde los 20Hz hasta los 100 kHz y se pudieron comprobar los datos teóricos que apuntaban a que a la frecuencia de 10 kHz se observa una mayor diferenciación entre las mediciones de impedancia real a distintas concentraciones de células. El cambio de ángulo de desfase se notó más claramente en frecuencias cercanas a los 100 kHz.

Es importante mencionar que las células de este estudio, murieron poco tiempo después de que se empezara la medición, por lo cual se ratifica que es necesaria la construcción de una mini-incubadora, ya contemplada para este proyecto, la cual mantendrá las condiciones óptimas para la vida y proliferación de células.

3.3.2 VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL LCR.

Se ha constatado que el LCR con las adecuaciones necesarias sería el ideal para tener mediciones precisas de la impedancia a distintas frecuencias, sin embargo el costo actual del equipo es de alrededor de \$350,000 pesos, lo cual dificultaría la implementación de un sistema medidor de impedancia incorporado a una mini-incubadora en múltiples entornos de investigación.

Es por ello que es necesario un sistema de medición de impedancia que opere a un rango de frecuencias y voltajes más específico (1-10 kHz, 10 - 20 mV). Estos datos se obtuvieron de los anteriores estudios de impedancia celular y de una caracterización previa con el LCR, electrodos circulares y medio de cultivo con células.

Los datos que arroje el sistema deben estar en términos del número aproximado de células para así poder determinar el estado actual del cultivo que se encuentra bajo estudio.

También es importante que el sistema de medición de impedancias esté adaptado para realizar las mediciones en un ambiente favorable a muestras biológicas vivas, en este caso en particular a células. Por lo tanto, en el siguiente capítulo reportamos la construcción de la mini-incubadora de trabajo para probar nuestro sistema completo en condiciones ambientales ideales para cultivo y prueba de toxicidad.

Capítulo 4.

CONSTRUCCIÓN DE MINI-INCUBADORA

Para cumplir el objetivo de medir proliferación celular en tiempo real e in-situ es estrictamente necesario mantener condiciones de ambiente que favorezcan la proliferación celular y dentro de ese mismo ambiente llevar a cabo la medición, de otro modo es imposible mantener una medición continua sin alterar el estado de las células. Para mantener dichas condiciones se construyó una mini-incubadora bajo las especificaciones que a continuación se presentan.

Una incubadora sirve para mantener y hacer crecer cultivos microbiológicos o cultivos celulares, regulando factores de ambiente para permitir la proliferación, por ejemplo la temperatura, la humedad y la concentración de CO₂. Existen incubadoras que tienen la capacidad de controlar temperaturas extremadamente bajas (incubadoras microbiológicas), humedad y niveles de dióxido de carbono (incubadoras para cultivos celulares). Las incubadoras microbiológicas se usan principalmente en el crecimiento y almacenamiento de cultivos bacterianos a temperaturas entre 5 y 37°C. Por su parte las incubadoras para cultivo celular trabajan a temperatura de 37°C, simulando las condiciones de la temperatura corporal.

4.1 DISEÑO

Se diseñó una incubadora que cumpliera con los requerimientos para mantener un ambiente adecuado para la supervivencia y proliferación de células (control de CO₂, Temperatura y humedad). En la figura 4.1 se muestran las partes que conforman el primer prototipo de incubadora.

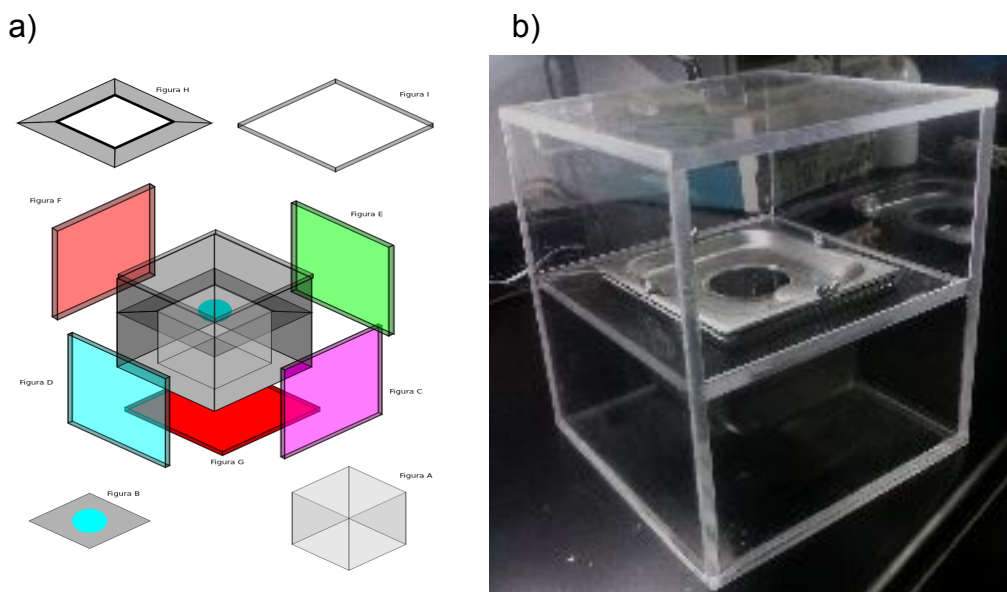


Fig 4.1. Mini-incubadora a)Diseño del prototipo , b) Prototipo Fabricado

Para mantener las condiciones deseadas en el ambiente de la incubadora se emplearán una serie de sensores, los cuales, por medio de un control difuso ejecutado por un microcontrolador, activarán una celda peltier que mantendrá una temperatura de 35°C, una electroválvula para mantener una concentración de CO₂ del 5% y, por medio de un recipiente con agua destilada y cloruro de benzalconio se mantendrá una humedad superior al 95% y un ambiente estéril: dichas condiciones son suficientes para garantizar un entorno favorable para la proliferación de células en cultivos.

4.2 SENSOR DE TEMPERATURA

Los sensores de temperatura son dispositivos que transforman los cambios de temperatura en cambios en señales eléctricas que son procesados por equipo eléctrico o electrónico.

El sensor de temperatura, típicamente suele estar formado por el elemento sensor, de cualquiera de los tipos anteriores, la vaina que lo envuelve y que está rellena de un material muy conductor de la temperatura, para que los cambios se transmiten rápidamente al elemento sensor, y del cable con el que se conectarán al equipo electrónico.

En la actualidad hay muchas formas de medir la temperatura con todo tipo de sensores de diversas naturalezas. La ingeniería de control de procesos ha inventado y, perfeccionado sensores que les ayuden a controlar los cambios de temperatura en procesos industriales. La tabla 4 es una muestra de la gran variedad de dispositivos capaces de medir la temperatura:

Eléctricos	Mecánicos	Radiación térmica	Varios
Termocuplas	Sistemas de dilatación	Pirómetros de radiación Total (banda ancha)	Indicadores de color, Lápices, Pinturas
Termorresistencias	Termómetros de vidrio con líquidos	Óptico	Sondas neumáticas
Termistores	Termómetros bimetalicos	Pasabanda	Sensores ultrasónicos
Diodos Sensores de silicio con efecto resistivo		Relación	Indicadores pirométricos

			Termómetros acústicos, Indicadores de luminiscencia (Termografía)
--	--	--	--

Tabla 4. Tipos de sensores de temperatura.

A pesar de que en la anterior tabla no están reflejados todos los tipos de sensores de temperatura existentes, la tabla 5 presenta los más extendidos en la industria, y en especial, los que podríamos usar en circuitos electrónicos junto con microcontroladores y otros sistemas electrónicos digitales.

Sistema	Rango en °C
Termocuplas / Termopar	-200 a 2800
Sistemas de dilatación (capilares o bimetálicos)	-195 a 760
Termorresistencias / RTD (<i>resistance temperature detector</i>)	-250 a 850
Termistores	-195 a 450
Pirómetros de radiación	-40 a 4000

Tabla 5. Rangos de medición de algunos sensores de temperatura.

Sin duda son los sensores de tipo eléctrico los que más extensión tiene hoy día en la medición de temperatura. Cada uno de este tipo de sensores tienen unas cualidades especiales que los convierten en más convenientes para un determinado proceso u objetivo.

- **Termistor**

El termistor está basado en que el comportamiento de la resistencia de los semiconductores es variable en función de la temperatura.

Existen los termistores tipo NTC y los termistores tipo PTC. En los primeros, al aumentar la temperatura, disminuye la resistencia. En los PTC, al aumentar la temperatura, aumenta la resistencia.

El principal problema de los termistores es que no son lineales según la temperatura, por lo que es necesario aplicar fórmulas complejas para determinar la temperatura según la corriente que circula y son complicados de calibrar.

- **RTD (*resistance temperature detector*)**

Un RTD es un sensor de temperatura basado en la variación de la resistencia de un conductor con la temperatura.

Los metales empleados normalmente como RTD son platino, cobre, níquel y molibdeno. De entre los anteriores, los sensores de platino son los más comunes por tener mejor linealidad, más rapidez y mayor margen de temperatura.

- **Termopar**

El termopar, también llamado termocupla y que recibe este nombre por estar formado por dos metales, es un instrumento de medida cuyo principio de funcionamiento es el efecto termoeléctrico.

Un material termoeléctrico permite transformar directamente el calor en electricidad, o bien generar frío cuando se le aplica una corriente eléctrica.

El termopar genera una tensión que está en función de la temperatura que se está aplicando al sensor. Midiendo con un voltímetro la tensión generada, conoceremos la temperatura. Los termopares tienen un amplio rango de medida, son económicos y están muy extendidos en la industria. El principal inconveniente estriba en su precisión, que es pequeña en comparación con sensores de temperatura RTD o termistores.

4.2.1 CELDA PELTIER

- **Efecto Peltier**

El efecto Peltier (figura 4.2) es una propiedad termoeléctrica descubierta en 1834 por Jean Peltier, trece años después del descubrimiento del mismo fenómeno, de forma independiente, por Thomas Johann Seebeck.

Este efecto consiste en la creación de una diferencia térmica a partir de una diferencia de potencial eléctrico. Ocurre cuando una corriente pasa a través de dos metales diferentes o semiconductores (tipo-n y tipo-p) que están conectados entre sí en dos soldaduras (uniones Peltier). La corriente produce una transferencia de calor desde una unión, que se enfría, hasta la otra, que se calienta. El efecto es utilizado para la refrigeración termoeléctrica.

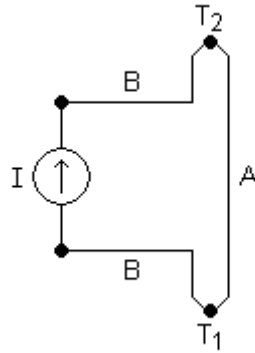


Fig 4.2 Efecto Peltier. Cuando una corriente se hace pasar por el circuito, el calor se genera en la junta superior (T2) y es absorbido en la junta inferior (T1)[46].

El silicio tipo-P normalmente tiene un coeficiente Peltier positivo (pero no mayor $\sim 550\text{K}$), y el silicio tipo-N es normalmente negativo como sugiere su nombre.

Los conductores están tratando de retornar al equilibrio de electrones que había antes de aplicarse la corriente absorbiendo energía a un conector y liberándola al otro. Los pares individuales pueden conectarse en serie para mejorar el efecto.

Una consecuencia interesante de este efecto es que la dirección de transferencia del calor es controlada por la polaridad de la corriente; invertir la polaridad cambiará la dirección de transferencia y así el signo del calor absorbido/producido.

Un enfriador/calentador Peltier o bomba de calor termoeléctrica es una bomba de calor activa, de estado sólido, que transfiere calor de un lado del dispositivo al otro. El enfriamiento Peltier es llamado Enfriamiento termoeléctrico.

En la figura 4.3 se muestran los tiempos de calentamiento a diferentes temperaturas utilizando una celda peltier en el prototipo de mini-incubadora desarrollado.

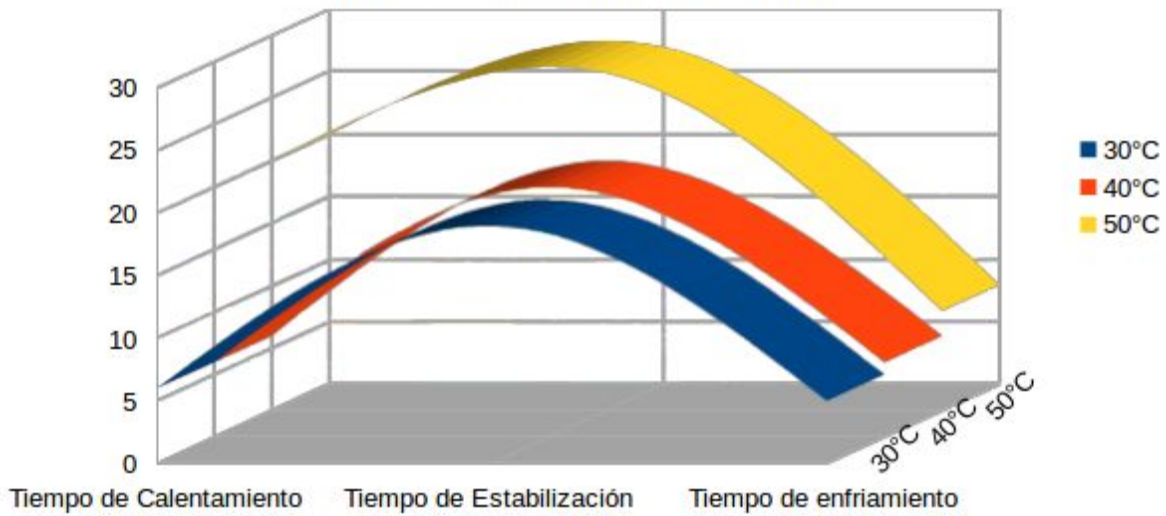


Fig 4.3 Tiempos calentamiento y enfriamiento de mini-incubadora.

4.3 SENSOR DE HUMEDAD

Existen varios tipos de Sensores de humedad, según el principio físico que siguen para realizar la cuantificación de la misma.

Mecánicos: aprovechan los cambios de dimensiones que sufren cierto tipos de materiales en presencia de la humedad. Por ejemplo, fibras orgánicas o sintéticas.

Basados en sales higroscópicas: deducen el valor de la humedad en el ambiente a partir de una molécula cristalina como el cloruro de litio la cual tiene mucha afinidad con la absorción de agua.

Por conductividad: la presencia de agua en un ambiente permite que a través de unas rejillas de oro circule una corriente. debido a que el agua es buena conductora de corriente. Según la medida de corriente se deduce el valor de la humedad.

Capacitivos: se basan sencillamente en el cambio de la capacidad que sufre un condensador en presencia de humedad.

Infrarrojos: estos disponen de 2 fuentes infrarrojas que lo que hacen es absorber parte de la radiación que contiene el vapor de agua.

4.3.1 ADECUACIÓN DE CONDICIONES DE HUMEDAD

El nivel de humedad óptimo se puede alcanzar colocando un recipiente con agua destilada y cloruro de benzalconio en la incubadora y aumentando la temperatura, se logra la evaporación del fluido y por lo tanto aumenta la humedad.

El porcentaje de humedad requerida es aproximadamente del 96%, el cual es alcanzado siempre y cuando el recipiente no se quede sin agua y la incubadora esté correctamente cerrada.

4.4 MEDICIONES DE TEMPERATURA Y HUMEDAD EN LA MINI-INCUBADORA

Para realizar las mediciones de temperatura y humedad se decidió utilizar el módulo AM2302, el cual cuenta con un sensor capacitivo de humedad y un sensor de temperatura de alta precisión, precalibrados y conectados a un microcontrolador de 8 bits. Los rangos de medición van de del 0 al 100 % de humedad relativa con +/- 2% de exactitud y de -40 a 80 °C con +/- =.5 °C de exactitud.

El consumo de corriente del módulo es de 500 μA durante la medición y 15 μA en estado de reposo, y puede ser alimentado a 3.3 o 5 V lo cual permite ser energizado directamente con un microcontrolador y comunicarse por medio de una entrada digital para el manejo de datos y control de ambiente.

En las siguientes gráficas (figuras 4.4 y 4.5) se muestran las mediciones obtenidas con el módulo AM2302 dentro de la mini-incubadora.

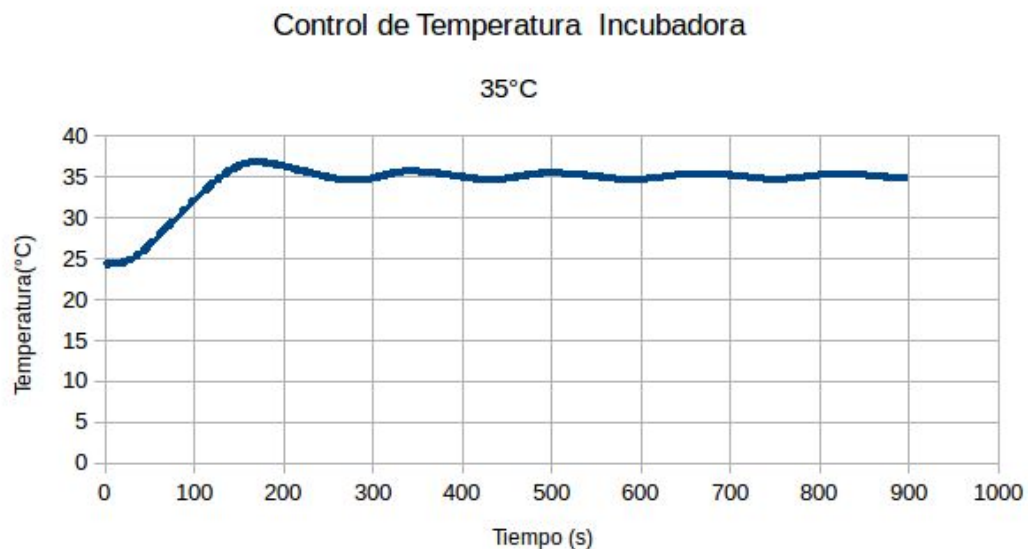


Fig 4.4. Gráfica de control de temperatura dentro de la mini-incubadora

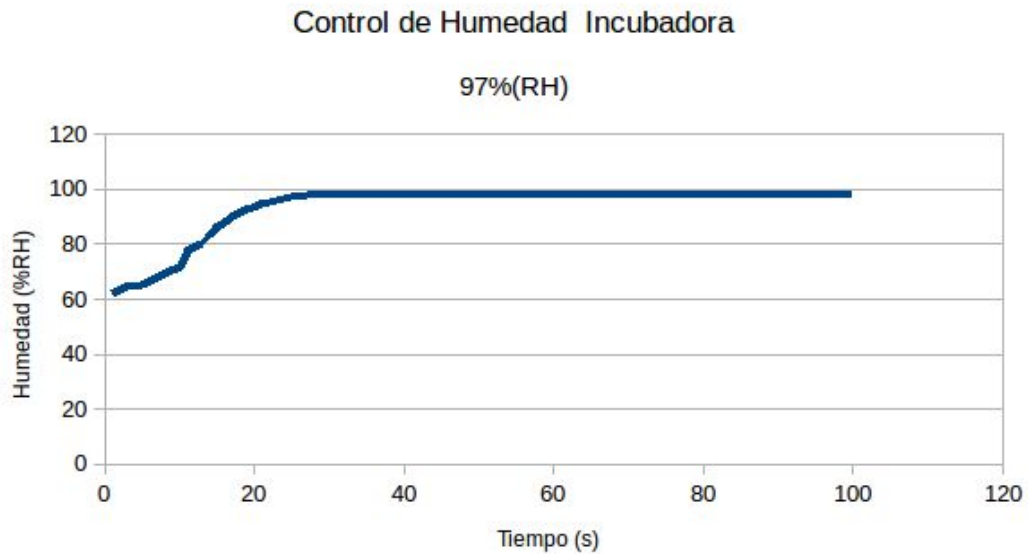


Fig 4.5. Gráfica de control de humedad dentro de la mini-incubadora

4.5 SENSOR DE CO₂

El dióxido de carbono (CO₂) es un gas incoloro, denso y poco reactivo. Forma parte de la composición de la troposfera (capa de la atmósfera más próxima a la Tierra) actualmente en una proporción de 350 ppm. (partes por millón)[47].

Para medir la concentración de CO₂ existen diversos tipos de sensores:

- Sensores Electroquímicos

Están formados por dos electrodos sumergidos en un medio electrolítico común. El electrolito es aislado de las influencias externas mediante una barrera que puede ser una membrana permeable al gas, un medio de difusión o un capilar, durante el funcionamiento. Cuando un voltaje de polarización es aplicado a los electrodos y el gas penetra en el sensor, una reacción redox genera una corriente eléctrica proporcional a la concentración del gas.

Los sensores electroquímicos son compactos, requieren de muy poca energía, muestran una gran linealidad, repetibilidad y, generalmente, tienen una vida útil larga, normalmente de uno a tres años. Los tiempos indicados como T90, es decir el tiempo para alcanzar el 90% de la respuesta final, son normalmente de 30 a 60 segundos y el intervalo de los límites de la detección oscila entre 0.02 y 50 ppm, según el tipo de gas especificado.

La adsorción de la muestra de gas en la superficie del óxido, seguida de una oxidación catalítica, termina en un cambio de la resistencia eléctrica del material oxidado que puede relacionarse con la concentración de gas.

- Sensores por semiconductor

El sensor fabricado con materiales semiconductores opera por la propiedad de adsorción de gas en la superficie de un óxido calentado y depositado en una base de sílice. En la mayoría de los casos el proceso es muy similar al utilizado en la manufactura de chips.

- Sensores de conductividad térmica

Consisten en la disposición de al menos dos filamentos con propiedades conductoras y térmicas formando un puente de Wheastone. Cada filamento se ubica en una celda independiente y el conjunto está a una temperatura definida.

En la celda de referencia se encierra una cantidad determinada de un gas estándar. En la celda de medida penetra el gas a detectar. Su conductividad térmica, difiere de la del gas de referencia, la cual hace que la temperatura del filamento se altere y, en consecuencia, se desequilibre el puente de Wheastone.

- Sensores catalíticos

Consiste en un pequeño elemento denominado pellistor, que está formado por un filamento de platino calentado eléctricamente. Este filamento está recubierto primeramente con una base cerámica y posteriormente por una disposición catalítica de Paladio o Rodio en un sustrato de Torio.

Cuando una mezcla de aire y gas inflamable se pone en contacto con la superficie caliente del catalizador, se produce una combustión que aumenta la temperatura del pellistor, lo cual altera la resistencia del filamento de platino que a su vez es medida en un circuito puente de Wheastone. El cambio de resistencia está directamente relacionado con la concentración de gas presente.

- Sensores infrarrojos

El dióxido de carbono y otros gases compuestos por dos o más átomos diferentes absorben la radiación infrarroja (IR) (figura 2.15) de una forma única y característica. Es posible detectar dichos gases mediante el uso de técnicas de IR.

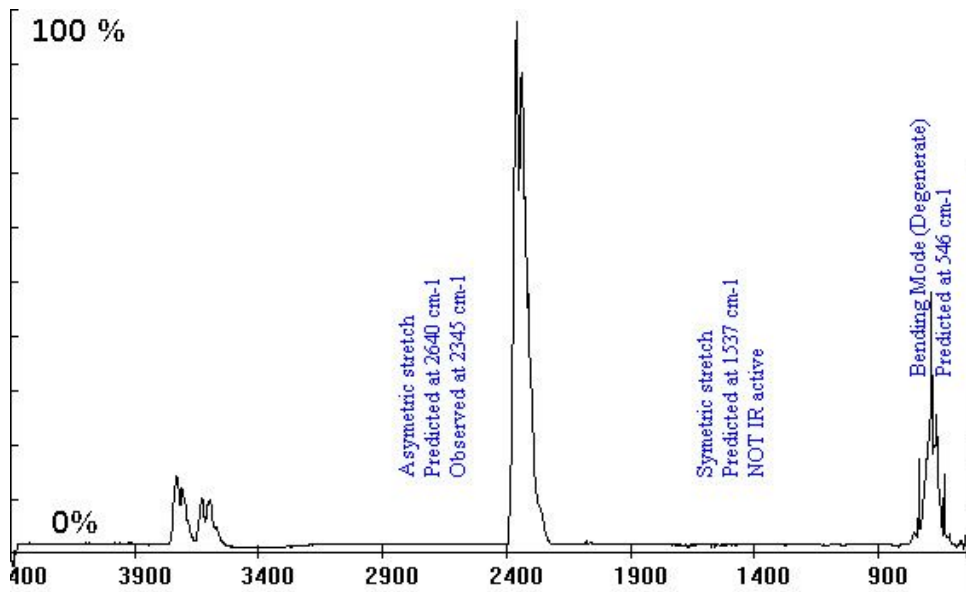


Fig 4.6. absorción de energía infrarroja por el CO₂ [48].

Esta gráfica muestra el porcentaje de absorción de la energía en función de la longitud de onda de la radiación incidente, para el CO₂. Los "picos" corresponden a los máximos de absorción. La absorción de energía electromagnética ocurre en las frecuencias de vibración que corresponden a la oscilación de los átomos de Oxígeno alrededor del átomo de Carbono.

La detección de IR es la tecnología más aplicada para la detección de CO₂. Los sensores de IR presentan muchos beneficios respecto de los sensores químicos. Son estables y altamente selectivos del gas medido. Tienen un ciclo de vida extenso y, debido a que el gas medido no interactúa en forma directa con el sensor, los sensores de IR soportan la humedad alta, el polvo, la suciedad y otras condiciones hostiles.

Los principales componentes de un detector de CO₂ de IR son la fuente de luz, la cámara de medición, el filtro de interferencia y el detector de IR. La radiación de IR se traslada desde la fuente de luz a través del gas medido hasta el detector. Un filtro ubicado en la parte de adelante del detector impide que otras longitudes de onda que no sean las específicas del gas medido pasen a través del detector. Así, se detecta la intensidad de la luz y se convierte en un valor de concentración de gases.

- Medidas seguridad en el manejo de CO₂

El dióxido de carbono es un gas no tóxico y no inflamable. Sin embargo, la exposición a concentraciones elevadas puede representar un riesgo de vida. Cuando se utiliza, produce, envía o almacena gas CO₂ o hielo seco, la

concentración de CO₂ puede elevarse a niveles muy peligrosos. Debido a que el CO₂ es inodoro e incoloro, resulta imposible detectar las fugas, con lo cual es necesario utilizar los sensores adecuados para garantizar la seguridad del personal.

- Efecto de los distintos niveles de CO₂

350 - 450 ppm	Concentración atmosférica típica
600 - 800 ppm	Calidad del aire interior aceptable
1.000 ppm	Calidad del aire interno tolerable
5.000 ppm	Límite promedio de exposición en un período de ocho horas
6.000 - 30.000 ppm	Preocupación, solo exposición breve
3 - 8%	Incremento de la frecuencia respiratoria, dolor de cabeza
>10%	Náuseas, vómitos, pérdida de conocimiento
>20%	Pérdida de conocimiento repentina, muerte

4.5.1 ELECTROVÁLVULA PARA REGULACIÓN DE CO₂

Para controlar el flujo de CO₂ hacia la incubadora se implementó el uso de una electroválvula controlada por un relevador activado por un microcontrolador.

Una electroválvula es una válvula electromecánica, diseñada para controlar el paso de un fluido por un conducto o tubería. La válvula se mueve mediante una bobina solenoide. Generalmente no tiene más que dos posiciones: abierto y cerrado[29].

Están diseñadas para poder utilizarse con agua, gas, aire, gas combustible, vapor, entre otros. Estas válvulas pueden ser de dos hasta cinco vías y pueden estar fabricadas en latón, acero inoxidable o pvc. Dependiendo del fluido en el que se vayan a utilizar es el material de la válvula.

En las válvulas de 2 vías, normalmente se utilizan las que funcionan con tres modalidades diferentes, dependiendo del uso al que están destinadas pueden ser de acción directa, acción indirecta y acción mixta o combinada. Además cada una de estas categorías puede ser Normalmente Cerrada (N.C.) o Normalmente Abierta (N.A.) dependiendo de la función que va a realizar ya sea que esté cerrada y cuando reciba la señal al solenoide abra durante unos segundos, o que esté abierta y cuando reciba la señal al solenoide corte el flujo.

En nuestro caso, utilizaremos una válvula de acción directa normalmente cerrada, puesto que solo se requerirán pequeños flujos de CO₂ cada determinado tiempo para mantener un porcentaje del gas dentro de la incubadora.

- Válvulas de acción directa

El comando eléctrico acciona directamente la apertura o cierre de la válvula, por medio de un émbolo.

La diferencia entre la válvula N.C. a la N.A. de acción directa es que, cuando la válvula N.C. no está energizada, el émbolo permanece en una posición que bloquea el orificio de tal manera que impide el paso del fluido, y, cuando se energiza la bobina, el émbolo es magnetizado de tal manera que se desbloquea el orificio y de esta manera pasa el fluido (figura 4.7).

En el caso de la válvula N.A., cuando la bobina no está energizada, mediante la acción de un resorte, el émbolo se mantiene en tal posición que siempre está abierta y cuando se energiza la bobina la acción es hacia abajo, empujando el resorte, haciendo que cierre el orificio e impida el paso del fluido.

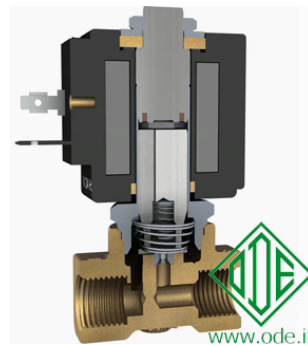


Fig. 4.7 válvula solenoide normalmente cerrada.

4.5.2 MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CO₂

Para realizar las mediciones de CO₂ se decidió utilizar el sensor MH-Z16 NDIR, el cual mide la concentración de CO₂ mediante la intensidad de luz infrarroja recibida después de que la luz atraviesa el gas bajo estudio. Las mediciones tienen una precisión inicial de +/- 50ppm + 5% .El sensor está calibrado de fábrica, sin embargo es posible recalibrar el sensor mediante programación o con un push button.

El consumo de corriente del sensor es menor a 85 mA y puede ser alimentado a 5 Volts DC, en condiciones de hasta 95% de humedad y 50 °C. Este sensor se puede comunicar con un microcontrolador mediante I2C o UART.

En las la figura 4.8 se muestran las mediciones obtenidas con el sensor MH-Z16 NDIR dentro de la mini-incubadora.

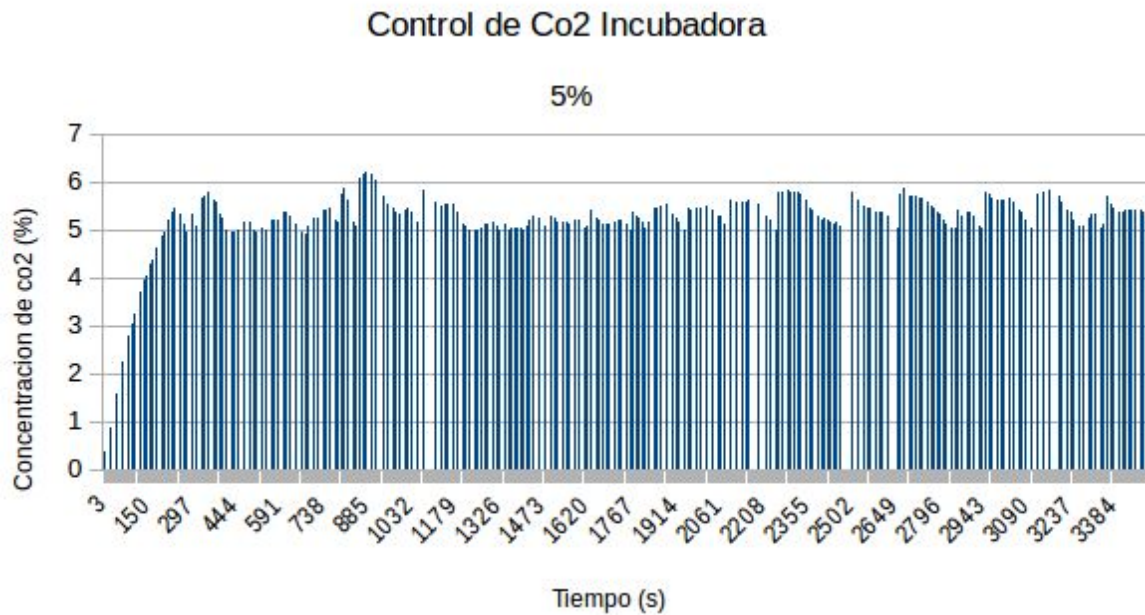


Fig 4.8. Gráfica de concentración de CO₂ dentro de la mini-incubadora

4.6 PRESENTACIÓN DE DATOS AL USUARIO

4.6.1 BLUETOOTH

Existen diferentes modelos de módulos Bluetooth para la intercomunicación con microcontroladores, entre los más populares se encuentran el módulo HC-06 y el HC-05.

Un módulo Bluetooth HC-06 se comporta como esclavo, esperando peticiones de conexión, Si algún dispositivo se conecta, el HC-06 transmite a éste todos los datos que recibe del Arduino y viceversa.

Una simple diferencia es que el módulo HC-06 funciona como Slave y el HC-05 como Master y Slave. Físicamente se diferencian por el número de pines. El HC-06 tiene un conector de 4 pines mientras que el HC-05 tiene 6 pines.

Los 4 pines del HC-06 son:

- Vcc, Voltaje positivo de alimentación, aquí hay tener cuidado porque hay módulos que solo soportan voltajes de 3.3V, pero en su mayoría ya vienen acondicionados para que trabajen en el rango de 3.3V a 6V pero es bueno revisar los datos técnicos de nuestro módulo antes de hacer las conexiones

- GND, Voltaje negativo de alimentación, se tienen que conectar al GND del Arduino o al GND de la placa que se esté usando.
- TX, Pin de Transmisión de datos, por este pin el HC-06 transmite los datos que le llegan desde la PC o Móvil mediante bluetooth y debe ir conectado al pin RX del Arduino
- RX, pin de Recepción, a través de este pin el HC-06 recibirá los datos del Arduino los cuales se transmitirán por Bluetooth, este pin va conectado al Pin TX del Arduino

4.6.2 DISPLAY

Para desplegar las condiciones de temperatura, humedad y CO₂ se utilizó un módulo de visualización de 4 dígitos que consta de 12 pines. En este módulo, se utilizó un circuito integrado TM1637 para reducir el número de pines de control a 2, es decir, controla tanto el contenido como la luminancia a través de sólo 2 pines digitales. La figura 4.9 corresponde al display utilizado.



Fig. 4.9 Display 4 dígitos.

En la figuras siguientes (4.9 y 4.10) se muestra un esquema con todos los dispositivos de los que consta la mini-incubadora y las mediciones simultáneas de todas las variables de ambiente

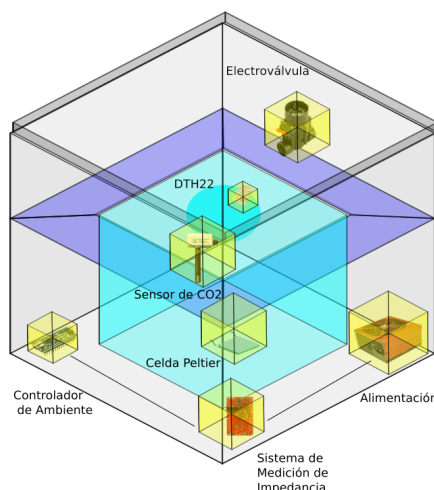


Fig. 4.9 Esquema de la mini-Incubadora.

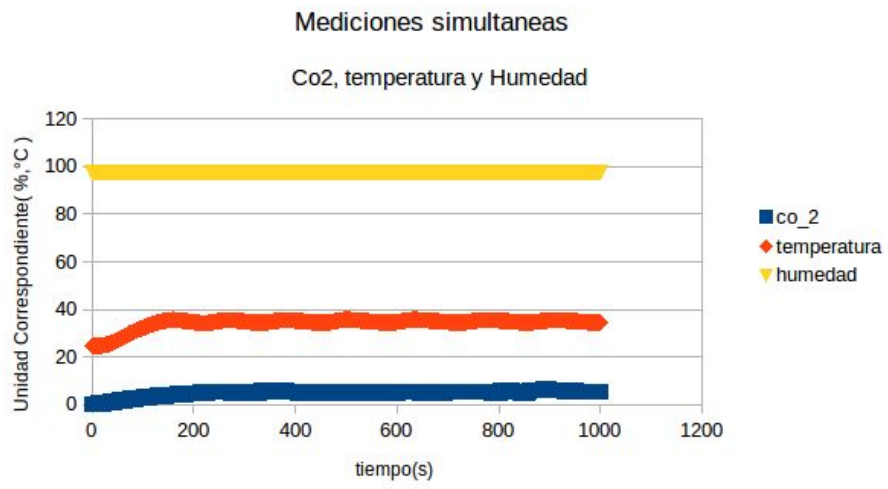


Fig. 4.10 Mediciones simultáneas mini-incubadora.

Capítulo 5.

AMPLIFICACIÓN

A partir de este capítulo el objetivo es medir la impedancia en cultivos celulares, sin embargo antes de obtener las mediciones deseadas, es necesaria la utilización de amplificadores operacionales, los cuales son parte importante del sistema. A continuación se explica su funcionamiento.

5.1 AMPLIFICADOR DIFERENCIAL.

El amplificador diferencial (AD) es un circuito pensado para amplificar la diferencia de dos señales.

La diferencia crece a medida que lo hace la tensión aplicada en una entrada y decrece si aumenta la aplicada a la otra.

En las aplicaciones usuales del amplificador diferencial, la entrada de modo diferencial es la señal deseada, la cual se amplifica, mientras la entrada de modo común debe ser suprimida o rechazada y por tanto no amplificada.

En la mayoría de los casos las señales de entrada son tensiones pero la salida puede ser tanto tensión como corriente. En el caso de que la salida sea tensión, ésta puede ser absoluta o diferencial.

Finalmente, existe la posibilidad de que exista una terminal adicional llamada "de referencia" cuyo valor se suma directamente a la salida.

El uso de esta familia de amplificadores es variado. Por un lado, pueden utilizarse para medir diferencias de tensión en el circuito. En otros casos nos permite eliminar el ruido en señales de baja calidad. Sin embargo, uno de sus usos más extendidos es la estabilización de sistemas. Así una de las entradas puede utilizarse para realimentar el sistema convirtiendo la salida en una entrada mas. Evidentemente, la realimentación debe ser negativa para que el sistema no sea inestable. La otra entrada puede utilizarse para introducir la señal de interés. Básicamente, éste es el principio fundamental de trabajo de la mayor parte de los circuitos lineales con un amplificador operacional.

Sea V_A la tensión aplicada a la entrada no inversora de un amplificador diferencial y V_B la tensión aplicada a la otra entrada. El objetivo de un amplificador diferencial es restar ambas señales y multiplicarlas por un valor mayor que cero.

Todo amplificador diferencial, sea cual sea su nivel de complejidad, está basado en una estructura llamada par diferencial. El par diferencial está compuesto por los siguientes elementos:

1 Dos transistores idénticos cuyos emisores o fuentes si son FET están conectados al mismo nodo. Pueden ser de cualquier tipo NPN, PNP, NMOS, PMOS, N-JFET, P-JFET. etc.

2 . El nodo donde se conectan los dos emisores /fuentes se drena (alimenta) por medio de una fuente de corriente(I_Q).

3. Las entradas del par diferencial, cuyas tensiones se restarán son las bases / puertas de los transistores.

4. Dos cargas se conectan a los colectores/drenadores de los transistores. Estas cargas pueden ser simples resistencias o fuentes de corriente con elevada impedancia de salida.

5.2 AMPLIFICADORES OPERACIONALES.

Los amplificadores operacionales son amplificadores diferenciales con acoplamiento DC de muy alta ganancia. Tiene dos entradas, una llamada inversora (-) y otra no-inversora (+), en los cuales se puede obtener:

$$V_{out} = A (V_+ - V_-) = A V_{in} \quad (5.1)$$

Además de amplificar una señal (o en general, llevar a un intervalo adecuado para procesamiento y análisis), los Op-amps tienen muchos otros usos:

Acondicionamiento de señales: aumentar su potencia, además de su intensidad, para que no sufra distorsión o atenuación por el proceso de medición, sobre todo si la impedancia de entrada del circuito sensor no es suficientemente alta; esto se logra garantizando que la señal a medir tenga un nivel mínimo de potencia entregada; el acondicionamiento también incluye: paso a escala logarítmica, cambiar offset, polaridad, modulación, mayor inmunidad a ruido y estabilidad, etc.;

Acoplamiento de impedancias: aunque puede considerarse parte del acondicionamiento, es más general; aislamiento de circuitos;

Filtros activos (pasa altas, pasa bajas, pasa banda, rechaza banda): circuitos osciladores, generadores de pulsos y de formas de onda;

Procesamiento analógico de señales: comparadores, sumadores, integradores, derivadores, elementos de retardo, cambios de fase, rectificadores,

etc.

Procesamiento lógico de señales: en ciertas aplicaciones se obtiene el mismo efecto de las compuertas lógicas digitales, entregando ya sea un valor de voltaje cero (falso) o de saturación (verdadero o "uno lógico");

Simulación analógica de sistemas dinámicos; ventajas de mayor velocidad y mayor resolución que con circuitos digitales;

Solución analógica de ecuaciones integro-diferenciales inclusive no lineales, entre otras.

En su forma más simple e ideal, el amplificador satisface: $V_{out} = A V_{in}$, donde A es la ganancia constante, muy elevada, independientemente de intensidad o frecuencia (y de corriente, implicando propiedades de impedancia muy útiles: da suficiente potencia al circuito al que se conecta (impedancia de salida prácticamente nula), dando para fines prácticos "toda la potencia que se le pida", sin caída del voltaje de salida; tampoco "pide potencia" al circuito precedente (impedancia de entrada "infinita") y no provoca que el potencial de entrada se caiga, si el circuito precedente no da suficiente potencia.

Tiene impedancia interna de entrada "infinita" (o modelando como un límite $r_{in} \rightarrow \infty$) y la impedancia interna de salida correspondiente es "cero" (o bien, $r_{out} = 0$). Una fuente de señal "ve" una resistencia r_{in} infinita y la señal no "se cae" si la fuente produce muy baja corriente. El amplificador "no carga" al circuito conectado a la salida, y es visto como una fuente AV_{in} , alimentando una resistencia en serie r_{out} (en Figura 5.1 del [Webster] son respectivamente " R_d y R_o ").

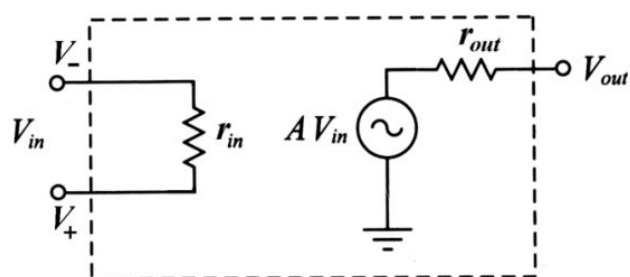


Fig 5.1 Amplificador diferencial operacional (Op-amp): circuito equivalente. V_{in} es la diferencia entre las entradas V_+ y V_- . Dichas entradas y la propia salida son referidas cada una respecto a tierra[51].

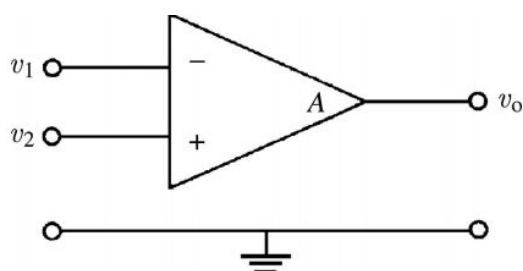


Fig 5.2 Símbolo de circuito de un Op-amp[51].

Un voltaje en v_1 , la entrada “inversora”, es amplificado e invertido para dar lugar a v_o . Un voltaje en v_2 , la entrada “no inversora”, es amplificado para dar lugar a una salida en fase en v_o . Ambas entradas y la salida son cada una medidas respecto a tierra (figura 5.2).

Existen reglas muy simples para analizar el comportamiento del amplificador operacional con realimentación externa. Dichas reglas son suficientemente buenas para casi todo lo que se intentará analizar en este trabajo.

En primer lugar, la ganancia del amplificador operacional es tan alta, que una fracción de un milivoltio aplicada entre los terminales de entrada provocará una variación de la salida sobre todo su rango, de manera que ignoramos este pequeño voltaje y establecemos la regla 1.

I. La salida intenta hacer lo que sea necesario para que la diferencia de voltajes de entrada sea cero. En segundo lugar, los amplificadores operacionales absorben muy poca corriente de entrada (0.2nA para el 411; pico amperios para los del tipo de entrada FET); si redondeamos esto, se puede establecer la regla II:

II. Las entradas no absorben corriente; una nota explicatoria muy importante: la regla 1 no significa que el amplificador operacional realmente cambie el voltaje en sus entradas. No puede hacer tal cosa, lo que hace es "mirar" en sus terminales de entrada y variar su voltaje de salida de manera que la red de realimentación hace que el diferencial de entrada sea cero (si es posible).

5.3 CONSIDERACIONES DE LOS AMPLIFICADORES OPERACIONALES

5.3.1 TENSIÓN DE OFFSET DE ENTRADA

Idealmente en los A.O. la tensión de salida es nula si no se aplica señal. En la práctica, las imperfecciones de los elementos y las asimetrías de los circuitos hacen que la tensión de salida no sea nula si se aplica tensión nula a las entradas.

Esta tensión de offset en dc a la salida se suele representar mediante una fuente de tensión equivalente en el terminal de entrada no inversora y se denomina tensión de offset de entrada, V_{os} . Es la tensión que hay que aplicar entre los terminales de entrada del amplificador operacional para obtener una tensión nula a la salida, tal como se ilustra en la figura 5.3

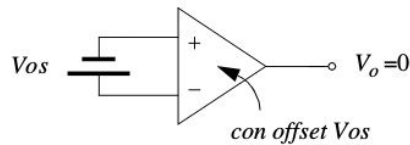


Fig 5.3 Tensión de Offset de entrada[49]

Si la tensión de offset es significativa, los rangos de señal positivos y negativos pueden ser muy diferentes y aparecerá distorsión antes de lo previsto.

5.3.2 RAZÓN DE RECHAZO DE MODO COMÚN

En un conjunto de opamp's configurados como amplificador de instrumentación, cuando el voltaje 1 (V-) y el voltaje 2 (V+) son iguales, existe una pequeña señal de salida, cuando lo ideal sería que esta fuera cero. La CMRR es una medida del rechazo que ofrece la configuración a la entrada de voltaje común.

Aunque el amplificador operacional ideal amplifica sólo la diferencia de señales de entrada, en la práctica se amplifica también las tensiones comunes a ambos terminales, como se ilustra en la figura. 5.4, pudiéndose definir una ganancia de modo común:

$$A_{CM} = \frac{V_o}{V_{CM}} \quad (5.2)$$

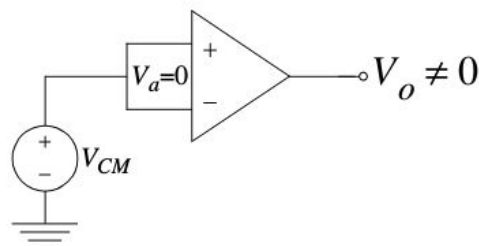


Fig 5.4 Razón de rechazo de modo común[49]

Se denomina razón de rechazo del modo común (CMRR) al cociente:

$$CMRR = \frac{A_d}{A_{CM}} \quad (5.3)$$

donde A_d es la ganancia diferencial.

5.3.3 IMPEDANCIA DE ENTRADA

Es la resistencia entre las entradas del amplificador. Tanto ésta como la impedancia de salida son en general función de la frecuencia pero normalmente se

consideran puramente resistivas. La impedancia de entrada de los actuales A.O., especialmente con etapas de entrada con transistores de efecto campo, es tan grande comparada con otros elementos que la aproximación ideal de impedancia de entrada infinita es muy precisa. Un ejemplo es que en el amplificador LF411-N que se utilizará en este trabajo tiene una impedancia de entrada de 1 Tera-Ohm.

5.3.4 IMPEDANCIA DE SALIDA

Es la resistencia que se observa a la salida del amplificador. La impedancia de salida de un amplificador operacional real a diferencia de un ideal es finita pero muy baja. Sin embargo, no puede despreciarse su efecto en la realimentación del amplificador y su influencia tiene que ser estudiada en cada caso.

5.3.5 RANGO DE SALIDA

Es la máxima amplitud que puede tener la señal de salida de los amplificadores operacionales manteniéndose un bajo nivel de distorsión.

5.3.6 SLEW RATE

Todos los amplificadores operacionales tienen un slew-rate máximo, que significa el ritmo máximo de cambio que puede tener su señal de salida. La causa se encuentra en que las distintas etapas de los amplificadores sólo disponen de intensidades finitas para cargar y descargar condensadores de carga y de compensación, internos y externos.

La violación de este límite resulta en distorsión de señales y debe evitarse en aplicaciones lineales.

Normalmente nos interesan señales sinusoidales de la forma $v(t) = V_0 \sin \omega t$, cuya pendiente máxima es $V_0 \omega$, por lo que el límite impuesto para un rango de frecuencias dado es:

$$V_0 = \frac{SR}{\omega_{max}} \quad (5.4)$$

Este valor límite significa ya una distorsión por lo que conviene permanecer alejado del límite. Otra limitación del nivel de señal viene dada por el hecho de que los amplificadores operacionales son amplificadores cuya tensión de salida debe ser menor que las tensiones de polarización, pudiendo dar también este hecho lugar a la distorsión.

5.3.7 RANGO DINÁMICO

El rango dinámico se define como el cociente entre la máxima tensión de salida utilizable y la mínima tensión de salida utilizable (suele expresarse en dB). El límite superior viene impuesto por el punto en que el slew-rate o el rango de salida empiezan a introducir distorsión. La distorsión que se permite en un sistema suele especificarse en términos de distorsión armónica total.

5.3.8 RUIDO EN OP-AMPS

En la figura 5.5 se muestran las posibles fuentes de ruido en un amplificador operacional.

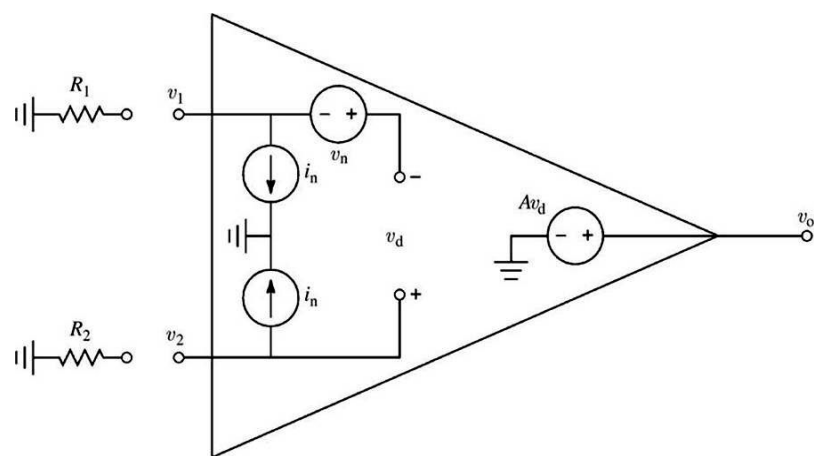


Fig 5.5. Fuentes de ruido en un op-amp[51].

La fuente de ruido en voltaje v_n se encuentra en serie con la entrada y no puede reducirse. El ruido agregado por las fuentes de ruido de corriente i_n pueden minimizarse usando pequeñas resistencias externas R_1 y R_2 .

Las variaciones en la corriente de polarización (que debería ser idealmente 0) de las entradas contribuyen al ruido total. Estas corrientes de ruido fluyen a través de las resistencias equivalentes de modo que el voltaje RMS total de ruido térmico es la raíz cuadrada de la suma de términos cuadráticos de ruido (voltajes), multiplicado por la banda de frecuencias de interés:

$$V_n \approx \left\{ \left(V_n^2 + (i_n R_1)^2 + (i_n R_2)^2 + 4kTR_1 + 4kTR_2 \right) BW \right\}^{1/2} \quad (5.5)$$

donde tenemos,

R_1 y R_2 = Resistencias equivalentes.

V_n = Valor medio del voltaje RMS de ruido, en unidades de Volts \cdot Hz^{-1/2} (a través del intervalo de frecuencias de interés)

i_n = Valor medio de la corriente RMS de ruido, en unidades de Amps \cdot Hz^{1/2} (a través del intervalo de frecuencias de interés)

k = Constante de Boltzman.

T = Temperatura en Kelvin

BW = Ancho de banda del ruido, en Hz.

5.3.9 RESPUESTA EN FRECUENCIA

La respuesta en frecuencia de un amplificador operacional es uno de sus aspectos más importantes. Se entiende por respuesta a la frecuencia el intervalo de frecuencias en las que la ganancia de tensión del amplificador operacional permanece constante.

La ganancia de los amplificadores operacionales decrece para altas frecuencias y debe sacrificarse la ganancia para obtener un intervalo de respuesta de frecuencia más grande.

Los fabricantes especifican esta característica usando el concepto de Ancho de Banda (BW).

5.4 AMPLIFICADORES BIOELÉCTRICOS.

Los amplificadores usados para procesar biopotenciales son llamados amplificadores bioeléctricos, pero esta designación se aplica a un gran número de tipos diferentes de amplificadores. La ganancia de un amplificador bioeléctrico puede ser baja, media o alta (x10, x100, x1000, x10,000). Por otra parte, algunos amplificadores bioeléctricos presentan acoplamiento para CA, en tanto que otros presentan acoplamiento para CD. La respuesta a la frecuencia de un amplificador bioeléctrico típico puede ir desde CD (o cerca de CD, como 0.05Hz) hasta arriba de 100 KHz.

Pocos amplificadores de propósito general tienen una respuesta a la frecuencia preajustada y así pueden ser usados en un amplio rango de aplicaciones.

En general, es conveniente usar solo la mínima respuesta a la frecuencia necesaria (mínimo ancho de banda) para asegurar una buena reproducción de la forma de onda en su entrada, esta práctica permite el rechazo del ruido de alta frecuencia.

Dos parámetros importantes en los amplificadores bioeléctricos, especialmente aquellos con ganancias media y alta, son el ruido y el drift. El drift es el cambio en el voltaje de la señal de salida causado por cambio en la temperatura de operación (en lugar de cambio en la señal de entrada). Ruido; en este caso, normalmente es el ruido térmico generado en resistencias y dispositivos semiconductores o el producido por interferencia electromagnética.

Los amplificadores bioeléctricos deben tener una muy alta impedancia de entrada. Este requerimiento es la característica común de todos los amplificadores bioeléctricos, debido a que casi todas las fuentes de señal bioeléctricas exhiben una alta impedancia de fuente. La mayoría de las fuentes de señales bioeléctricas tienen una impedancia entre 10^3 y $10^7 \Omega$, y la práctica ordinaria de ingeniería de diseño establece que la impedancia de entrada de un amplificador sea por lo menos un orden de magnitud mayor que la impedancia de la fuente. Amplificadores modernos con entradas de transistores de efecto de campo del tipo Metal-Óxido y transistores de efecto de campo de unión semiconductor (JFET) presentan impedancias de entrada del orden de 1 teraohm ($10^{12} \Omega$).

Como se ha constatado, debido a sus características, el sistema de medición de impedancia debe estar construido basándose en amplificadores operacionales. A continuación se mostrarán dos configuraciones mediante las cuales se planteó resolver este problema y se seleccionará la que más se adecue a las necesidades del sistema.

Capítulo 6.

INTEGRACIÓN DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA.

Para implementar la medición de impedancia en cultivos celulares por medio de microelectrodos, se decidió utilizar el circuito equivalente del capítulo 3.8 para que durante la fase de desarrollo y pruebas iniciales del sistema, no fuera necesaria la utilización de células, lo cual sería altamente costoso e innecesario ahora que se cuenta con un modelo de circuito equivalente.

Antes que nada se definieron los parámetros (basándose en las mediciones de la sección 3.3) y se generó la señal de prueba con ayuda del circuito XR2206.

La señal de prueba para el sistema de medición de impedancia es una señal senoidal de 10 khz (la frecuencia en la que se alcanza el mayor cambio de impedancia con respecto al aumento de capacitancia en el medio de cultivo) y 10 mV de amplitud (el límite de voltaje que soportan las células de estudio sin alcanzar el potencial de acción y sin que los organelos sean alterados).

Para construir el sistema de medición de impedancia en cultivos celulares, es importante tener en cuenta que se medirá la impedancia real y el ángulo de desfase entre la señal de tensión aplicada al sistema y la corriente resultante. para lo cual se utilizaron las siguientes configuraciones.

6.1 AMPLIFICADOR DE TRANSIMPEDANCIA.

A continuación se presenta un circuito especial con op-amp encontrado frecuentemente en la instrumentación biomédica[50]. Este es el amplificador de transimpedancia o convertidor de corriente a voltaje, mostrado en la Figura 6.1

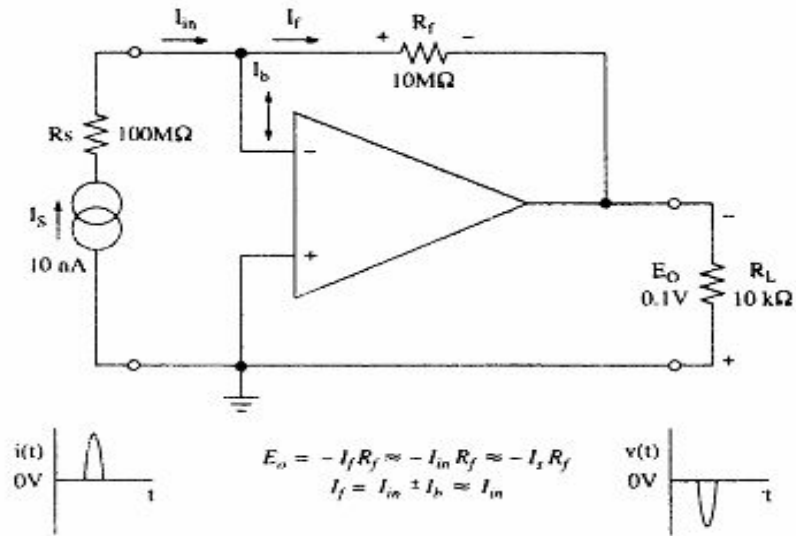


Fig 6.1 Amplificador de Transimpedancia [50].

Este circuito toma una corriente de entrada I_s , de una fuente de corriente, y lo convierte en voltaje E_o , en la salida del Amplificador Operacional. El circuito amplificador de transimpedancia más común es el amplificador de fotodiodo, en este caso se modificó el circuito para poder medir la corriente resultante de introducir la señal de prueba en el circuito equivalente.

Se hicieron simulaciones para probar el funcionamiento de este circuito y su respuesta en los valores de amplitud y frecuencia requeridos para evaluar si es una opción viable para la implementación del sistema de medición de impedancia.

A continuación se muestra el circuito que se diseñó y simuló para medir la corriente y amplificarla y medir el desfase de dicha corriente con respecto al voltaje de entrada por medio de un amplificador de transimpedancia (figura 6.2).

Tomando en cuenta las mediciones con el LCR del capítulo 4.3, los parámetros constantes serán: la frecuencia de la señal (10 KHz), la amplitud (10 mV) y los valores de $C_{dl}=100\text{nF}$ y $R_i= 1\text{k}\Omega$, la capacitancia del medio de cultivo (la más representativa las células), variará entre 1 y 10 nF, y este parámetro es el que se controlará en las mediciones siguientes con el objetivo de observar el cambio de impedancia y el desfase de la corriente que representarán para nuestro sistema la proliferación o muerte de células en el cultivo estudiado.

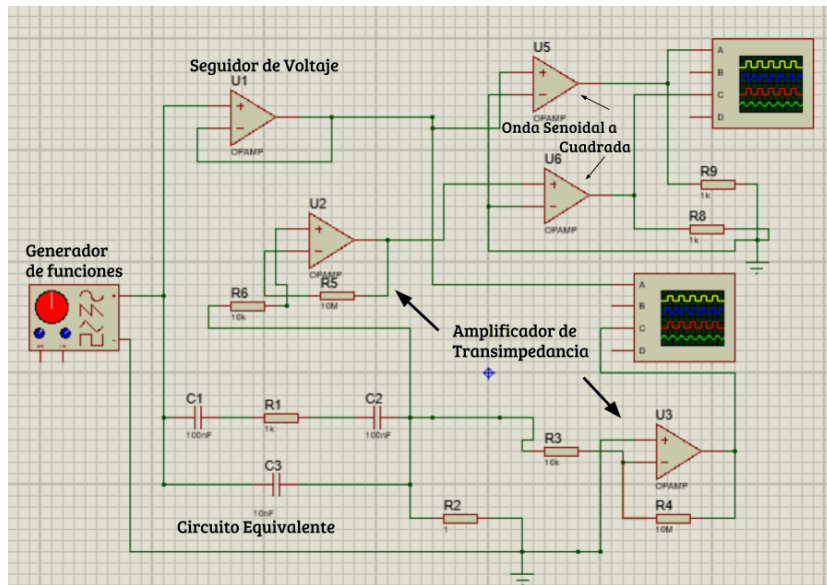


Fig. 6.2 Simulación de Circuito de Transimpedancia

En las figuras 6.3 y 6.4 se muestran las diferencias de amplitud resultantes de introducir la señal de prueba en el circuito de transimpedancia simulado

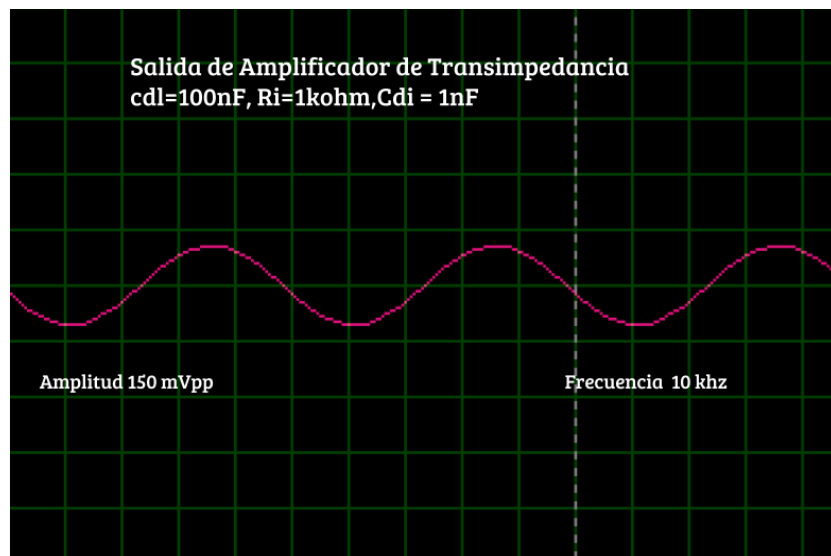


Fig 6.3 Salida de Amplificador de Transimpedancia, $C_{dl} = 100\text{nF}$, $R_i = 1\text{k}\Omega$, $C_{di} = 1\text{nF}$

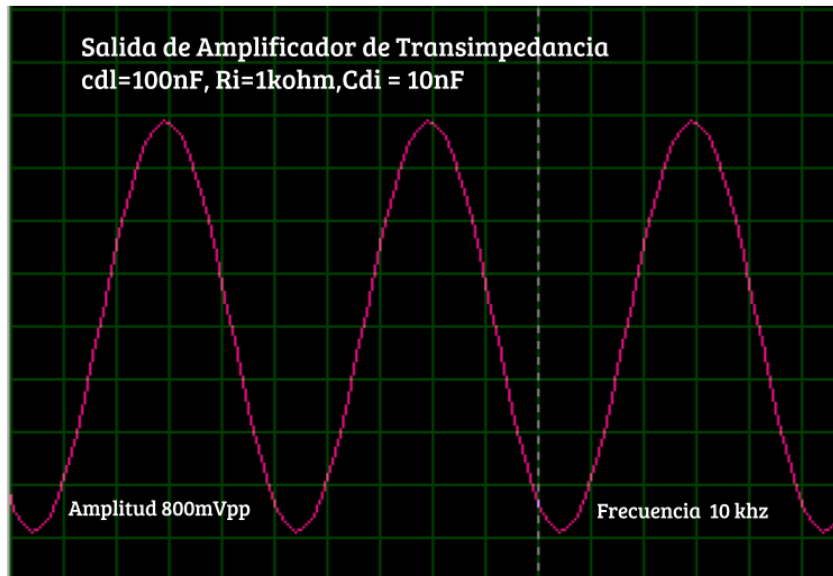


Fig 6.4 Salida de Amplificador de Transimpedancia, $C_{dl} = 100\text{nF}$, $R_i = 1\text{k}\Omega$, $C_{di} = 10\text{nF}$

En las figuras 6.5 y 6.6 se muestra la diferencia entre el desfase producido por una capacitancia simulada del medio de cultivo (C_{di}) de 1 nF y una C_{di} de 10 nF.

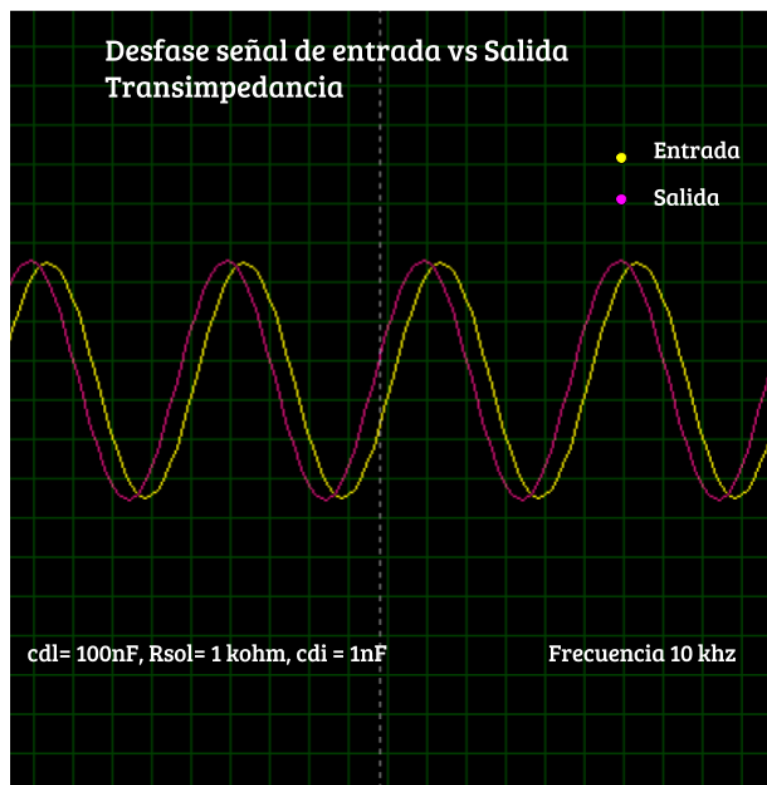


Fig. 6.5 Desfase señal de entrada vs salida transimpedancia; $C_{di}=1\text{nF}$

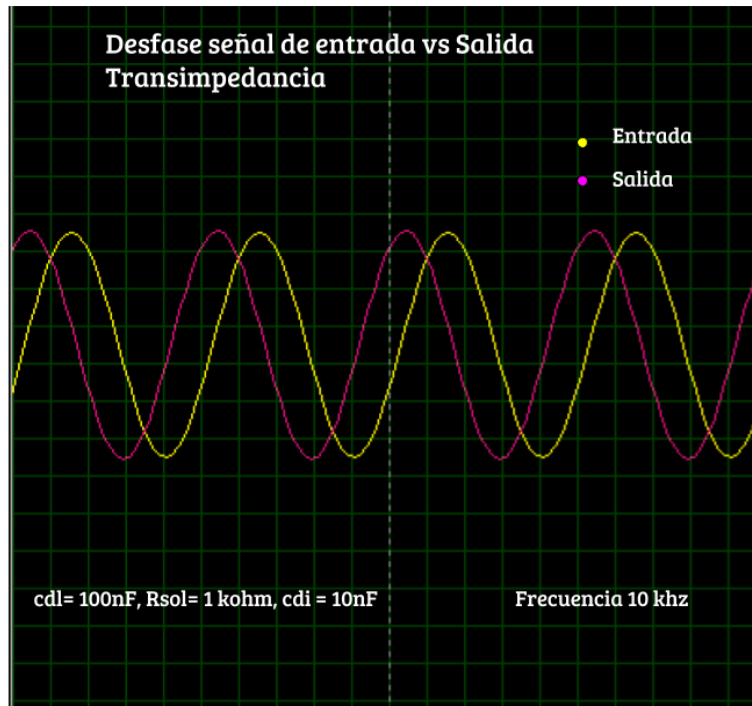


Fig. 6.6 Desfase señal de entrada vs salida transimpedancia; Cdi = 10nF

Este es el panorama ideal del circuito, sin embargo con amplificadores comerciales, este resultado no es idéntico. El principal inconveniente de la utilización de un amplificador de transimpedancia es que los amplificadores comerciales no están diseñados para amplificar señal por un factor de 1000 en un rango amplio de corrientes de polarización. Otro problema es que no hay una tierra común para todo el circuito, lo cual en nuestro caso causa mediciones erróneas. Es por eso que se buscó una alternativa para realizar la medición.

6.2 AMPLIFICADOR DE INSTRUMENTACIÓN.

Otra alternativa para implementar el sistema de medición de impedancia es la utilización de un amplificador de instrumentación que es una mejora del amplificador diferencial. A continuación se explica su funcionamiento.

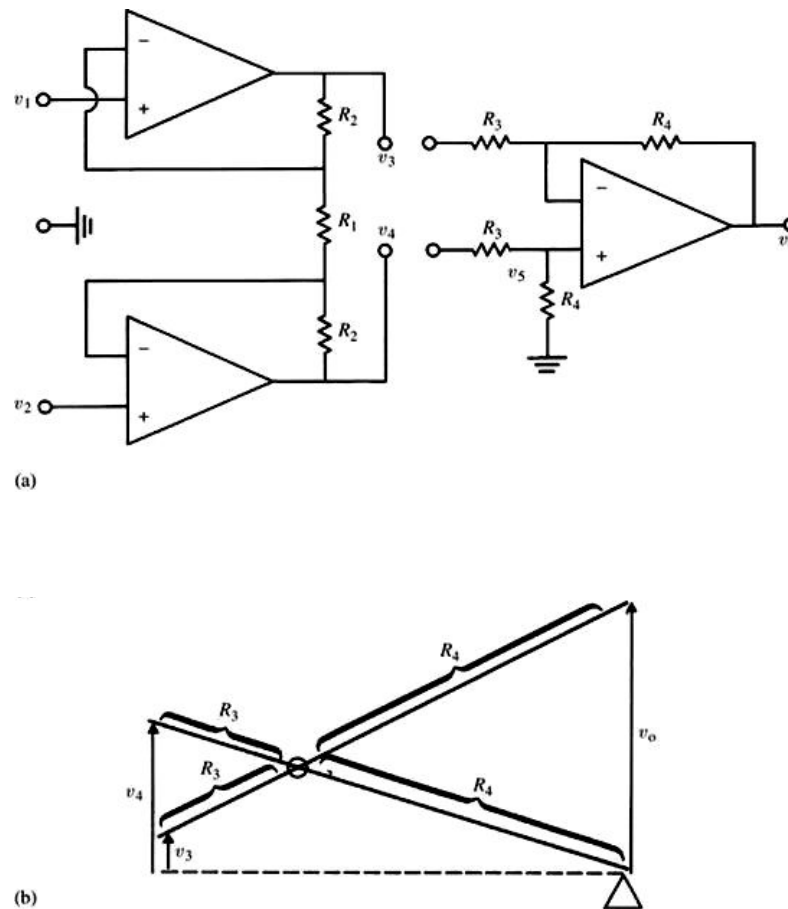


Fig 6.7. Amplificador de Instrumentación (a) A la derecha se muestra un amplificador diferencial con baja impedancia de entrada, debido a R_4 . A la izquierda, dos op-amps pueden proporcionar alta impedancia de entrada y mayor ganancia. (b) Un esquema con dos palancas acopladas como tijeras permite visualizar las características de entrada salida, en función de las impedancias, cuyos valores determinan el largo de cada brazo [51].

Las dos mitades combinadas de la Figura 6.7(a) forman ahora una configuración de tres amplificadores operacionales , denominada Amplificador de Instrumentación. Este posee muy alta impedancia de entrada ($\sim 10^9 \Omega$), alto factor CMRR (más de 10^5), un nivel de offset DC muy bajo, bajo ruido, baja deriva y una ganancia elevada que puede cambiarse ajustando R_1 . Es particularmente útil en medir bio-potenciales pues rechaza el voltaje de modo común de 60 Hz que existe en el cuerpo humano, debido a la inducción de la línea eléctrica.

Aprovechando las características de esta configuración para amplificadores operacionales se diseñó un nuevo circuito para medir la impedancia.

6.3 PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA

Está reportado que la membrana celular (con un espesor de 5–10 nm) tiene una capacitancia de $0.5\text{--}1.3 \text{ microfarad} \cdot \text{cm}^{-2}$ y una resistencia de $10^2 - 10^5 \text{ ohm} \cdot$

cm² (Pethig, 1979). Solo si la bicapa lipídica está depositada directamente en la superficie de los electrodos la capacitancia de la membrana tiene influencia significativa en la impedancia (Stelze and Sackmann, 1989).

Se ha reportado, además, que si las células se colocan en los electrodos bloquean el flujo de corriente de forma pasiva y la impedancia aumenta (Ehret et al., 1997, 1998). Cuanto mayor sea el número de células unidas, mayor es la magnitud del aumento en la impedancia.

Tomando en cuenta lo anterior, se utilizará una fuente de tensión senoidal aplicada a una celda inoculada con células, a través de un resistor serie se podrá medir la impedancia bipolar. Las tensiones medidas en el resistor serie, la celda de cultivo y la fuente permitirán calcular por medio de la ley de Ohm y el teorema del coseno, el módulo de la impedancia y sus componentes resistiva y reactiva totales [32,34].

Para realizar la medición de impedancia en cultivos celulares por el método de microbiología de impedancia(MI), es necesario inyectar, por medio de una terminal(-) de los electrodos un voltaje alterno con una amplitud de 10 mv, el cual recorrerá el medio de cultivo con células y llegará a otra terminal (+) solo que la señal que llega a esta terminal ya tendrá los efectos de la reactancia del medio de cultivo y dicha reactancia depende directamente de la cantidad y el estado de las células (vivas o muertas).

En lugar de hacer pruebas con células, se hará una simulación de la medición de impedancia utilizando el circuito equivalente definido en el capítulo 3.8.

Es importante señalar que no se mide directamente la corriente resultante sino que se mide el voltaje en una resistencia shunt (shunt es una carga resistiva a través de la cual se deriva una corriente eléctrica) en serie con el circuito equivalente. Esto nos permite determinar la intensidad de corriente eléctrica que fluye a través de esta carga utilizando para ello la ley de Ohm ($I = V/R$).

A continuación en la figura 6.8 se muestra la configuración “lowside sensing” mediante la cual se mide el voltaje en la resistencia shunt.

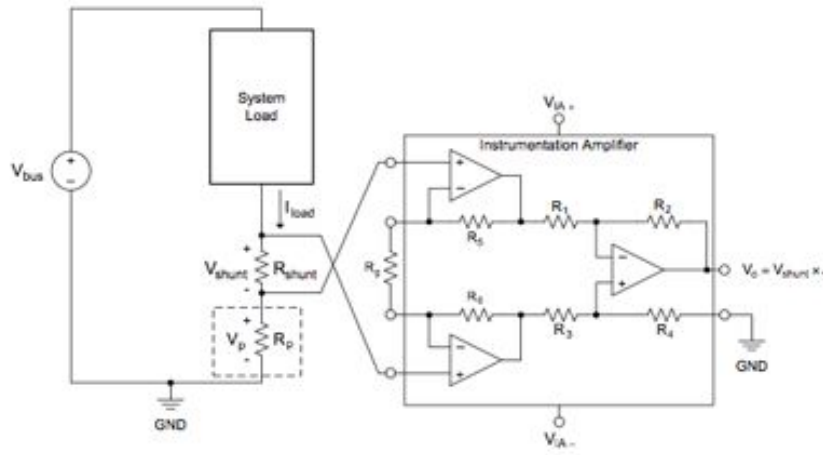


Fig 6.8 low side sensing con amplificador de instrumentación

Con ayuda de un generador de funciones se produce una señal senoidal de 10 kHz y 10 mv (V_{in}), la cual es introducida a una carga desconocida (en este caso nuestro circuito equivalente) y posteriormente, la señal se hace pasar por un elemento resistivo de valor conocido (R_{shunt}).

Teniendo la magnitud del voltaje en R_{shunt} se puede calcular la corriente que atraviesa el circuito que consta de dos impedancias en serie; la carga desconocida y R_{shunt} .

$$I = \frac{V_{shunt}}{R_{shunt}} \quad (6.1)$$

También con la magnitud del voltaje en R_{shunt} se puede calcular el voltaje en la carga desconocida (el circuito equivalente).

$$V_{Circuito\ Equivalente} = V_{in} - V_{shunt} \quad (6.2)$$

Ahora bien, dividiendo el voltaje en el circuito equivalente entre la corriente del circuito, se obtiene la impedancia de la carga desconocida.

$$Z_{desconocida} = \frac{V_{Circuito\ Equivalente}}{I} \quad (6.3)$$

Mediante un amplificador de instrumentación se puede medir y amplificar el voltaje en R_{shunt} .

A continuación (figura 6.9, 6.10, 6.11, 6.12 y 6.13) se muestra la simulación del circuito explicado anteriormente. Una vez más, los parámetros constantes serán: la frecuencia de la señal (10 KHz), la amplitud de la señal de entrada (10 mV) y los valores de $C_{dl}=100nF$ y $R_i= 1kohm$, la capacitancia del medio de cultivo, variará

entre 1 y 10 nF.

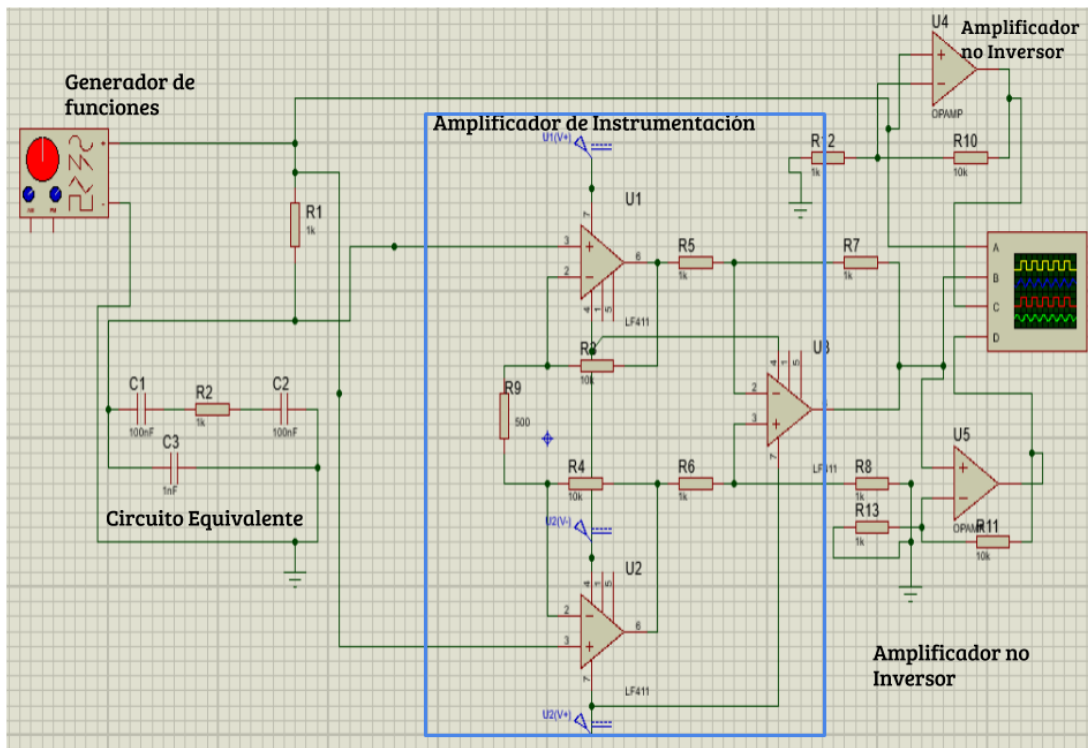


Fig 6.9 Simulación de sistema de medición de Impedancia basado en Amplificador de Instrumentación

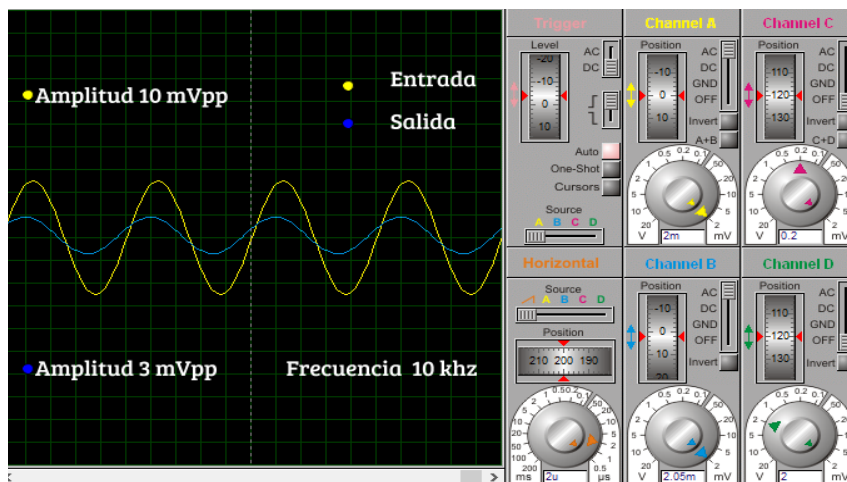


Fig 6.10 Señales de entrada y salida del sistema de medición de Impedancia basado en Amplificador de Instrumentación $C_{dl} = 100$, $R_i = 1\text{Kohm}$, $C_{di} = 1\text{nF}$



Fig 6.11 Desfase entre entrada y salida del sistema de medición de Impedancia basado en Amplificador de Instrumentación $C_{di} = 100$, $R_i = 1\text{Kohm}$, $C_{di} = 1\text{nF}$

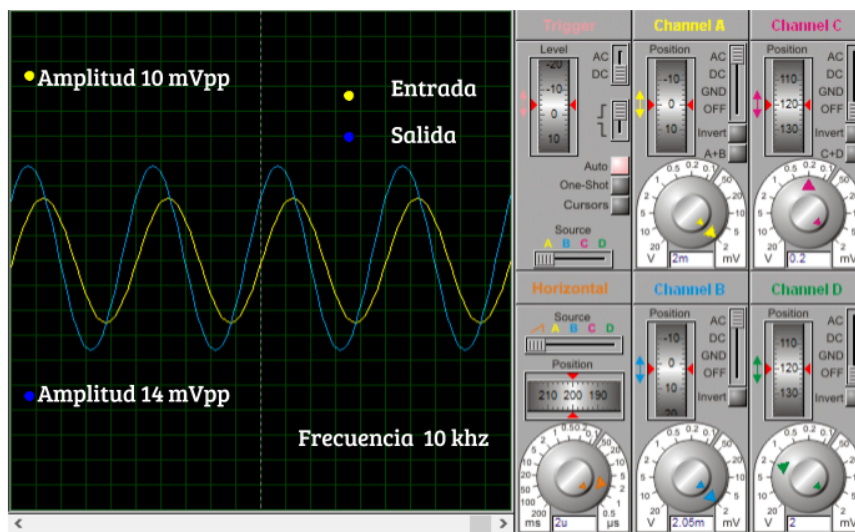


Fig 6.12 Señales de entrada y salida del sistema de medición de Impedancia basado en Amplificador de Instrumentación $C_{di} = 100$, $R_i = 1\text{Kohm}$, $C_{di} = 10\text{nF}$

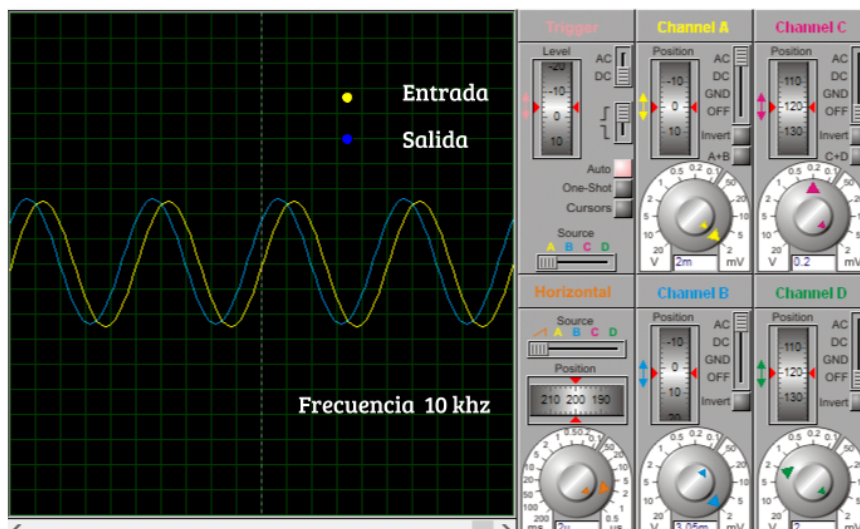


Fig 6.13 Desfase entre entrada y salida del sistema de medición de Impedancia basado en Amplificador de Instrumentación $C_{di} = 100$, $R_i = 1\text{Kohm}$, $C_{di} = 10\text{nF}$

El paso siguiente es introducir la señal obtenida en el microcontrolador y comenzar los cálculos para obtener la impedancia y el ángulo de desfase, sin embargo, es importante tomar en cuenta algunas características necesarias en el microcontrolador para que la adquisición de datos sea la correcta.

6.4 CONVERSIÓN ANALÓGICA-DIGITAL .

La conversión analógico-digital de una señal implica tomar muestras puntuales de la misma cada cierto intervalo de tiempo lo cual da lugar a una frecuencia de muestreo:

$$f_m = 1/\Delta t \quad (6.4)$$

El teorema de Shannon aplicado a este muestreo de la señal (conversión de la misma en pulsos de anchura mínima y frecuencia f_m) enuncia que para asegurar la integridad de la señal, la frecuencia de muestreo debe ser superior al doble de la frecuencia máxima presente en la señal analógica

Si no se respeta esta limitación, se corre el peligro de que la señal digitalizada sea muy diferente a la señal analógica introducida al conversor como se puede observar en la figura 6.14.



Fig 6.14 Error de tiempo de muestreo en conversión analógica-digital.

- Procesos que intervienen en la Conversión Analógica-Digital

Muestreo: el muestreo consiste en tomar muestras periódicas de la amplitud de la onda. La velocidad con que se toma esta muestra, es decir, el número de muestras por segundo, es lo que se conoce como frecuencia de muestreo.

Retención: las muestras tomadas han de ser retenidas por un circuito de retención (hold), el tiempo suficiente para permitir evaluar su nivel (cuantificación)..

Cuantificación: en el proceso de cuantificación se mide el nivel de voltaje de cada una de las muestras. Consiste en asignar un único nivel de salida a un margen de valores de una señal analizada. Incluso en su versión ideal, añade, como resultado, una señal indeseada a la señal de entrada: el ruido de cuantificación.

Codificación: la codificación consiste en traducir los valores obtenidos durante

la cuantificación al código binario. Hay que tener presente que el código binario es el más utilizado, pero también existen otros tipos de Códigos que también son utilizados.

Durante el muestreo y la retención, la señal aún es analógica, puesto que aún puede tomar cualquier valor. No obstante, a partir de la cuantificación, cuando la señal ya toma Valores finitos, la señal ya es digital.

El Convertidor analogico digital es un dispositivo no lineal, por lo que no tiene sentido la consideración de función transferencia.

6.4.1 RESOLUCIÓN DEL CONVERTIDOR ANALOGICO DIGITAL

El conversor irá de 0 a N en cuanto a valor numérico digital ($N = 2^m - 1$), siendo m el número de dígitos del conversor y de V_{\min} a V_{\max} en lo que se refiere a la tensión analógica; de forma que a una unidad digital (bit menos significativo LSB) le corresponderá una tensión analógica V_u (tensión unitaria) tal que $V_u = \frac{V_{\max} - V_{\min}}{N}$, que es el salto en tensión entre dos valores digitales consecutivos).

Así, pues, en toda conversión entre digital y analógica se aplica un proceso de cuantificación de la tensión analógica, teniendo en cuenta que los valores digitales son discretos; la tensión analógica no interviene en su forma propia de rango continuo de valores (entre dos extremos V_{\max} y V_{\min}) sino que actúa a través de escalones.

La resolución del adc utilizado es de 12 bits, lo cual implica que un voltaje de 3.3 V se representará con el número 4095 y 0 volts con el número 0, esto quiere decir que con esa resolución se pueden detectar cambios de .8 milivolts.

6.4.2 ERRORES DEL CONVERTIDOR ANALOGICO DIGITAL

En la conversión A/D, a cada número binario de salida le corresponde todo un intervalo horizontal de tensiones analógicas; las tensiones situadas en un mismo intervalo son indistinguibles ya que proporcionan la misma salida digital. Esto causa un error de cuantificación o discriminación, pues valores de tensión próximos pero diferentes corresponden al mismo valor digital (figura 6.15).

De esta forma las funciones de transferencia (salida – entrada: V_{o-n} en el conversor son de tipo escalonado; si la conversión es lineal la anchura de los escalones es constante de longitud (V_u).

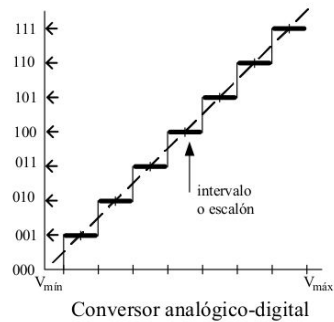


Fig. 6.15 Error de cuantificación en el convertidor analógico-digital

Error de offset. En un convertidor digital analógico real la señal analógica está desplazada con respecto al valor que le correspondería en el convertidor ideal. Este desplazamiento equivale a que para una entrada digital igual a cero se tiene un valor de la tensión de salida del convertidor (error de cero). En general, puede compensarse mediante las técnicas habituales aplicadas a los amplificadores operacionales. Es importante destacar que el offset varía notablemente con la temperatura.

Error de amplificación. La discrepancia entre la salida real y la salida teórica aumenta con el valor de la entrada. Ello se debe a que la red de resistencias de los amplificadores operacionales de salida no está bien ajustada. Este error es fácilmente corregible y todos los circuitos de conversión digital analógica presentan estas resistencias accesibles desde el exterior. Otra causa de este error es la fuente de la tensión de referencia, la cual debe ajustarse con sumo cuidado.

Error de linealidad. La relación entre la señal digital y la señal analógica discrepa ligeramente de la dependencia lineal que deberían presentar. Se debe a pequeñas discrepancias entre los valores de las distintas resistencias que componen la red R-2R. En general un mismo fabricante suministra un mismo tipo de convertidor con distintas precisiones en linealidad. Sólo se puede compensar por software.

Error de monotonidad. A una señal creciente en la entrada digital no siempre le corresponde una señal de salida creciente. Este error se debe a desajustes en la red R-2R y no se puede corregir. Es especialmente acusado en las series económicas de los convertidores de alta resolución. En general son dispositivos de muchos bits pero en los que sólo los más significativos están correctamente ajustados. A esto debemos añadir la dependencia de la temperatura de estas características. Otros factores importantes al seleccionar un determinado tipo de convertidor es la velocidad máxima de operación y el requerimiento energético de todo el sistema.

Al seleccionar un adecuado conversor digital analógico se deben tener presente los márgenes que presentan estos errores, teniendo en cuenta que la información dada por el fabricante corresponde a datos de laboratorio y en la práctica se presentan valores ligeramente superiores. Hay que tener presente que la precisión de un conversor analógico digital ideal es de +/-1 bit menos significativo lo que exige precisiones superiores al 0.05% para un conversor de 12 bits en todos los componentes.

El convertidor analógico digital del microcontrolador tiva TM4C1294 es de 12 bits lo cual permite obtener el siguiente muestreo de una señal de 10 kHz (figura 6.16).

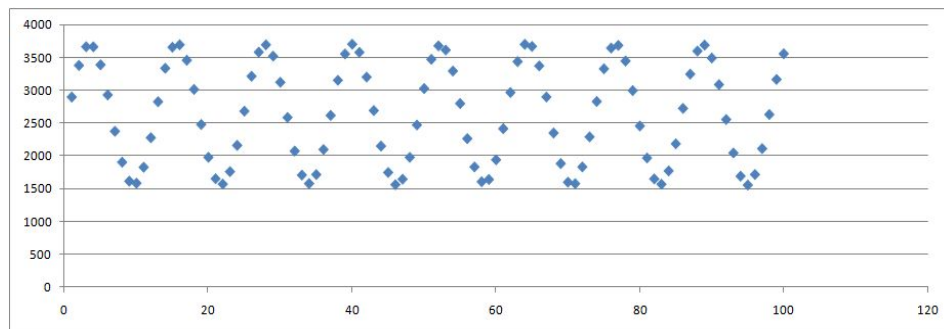


Fig 6.16. Señal de 10kHz adquirida por el convertidor analógico digital del TMC1294

6.5 EEPROM

Con el fin de guardar los datos obtenidos de la adquisición de datos con el ADC para posteriormente realizar el cálculo de la impedancia, es necesaria la utilización de una memoria EEPROM.

EEPROM o E²PROM son las siglas de Electrically Erasable Programmable Read-Only Memory (ROM programable y borrable eléctricamente).

Es un tipo de memoria ROM que puede ser programada, borrada y reprogramada eléctricamente, a diferencia de la EPROM que ha de borrarse mediante un aparato que emite rayos ultravioleta. Son memorias no volátiles.

Las celdas de memoria de una EEPROM están constituidas por un transistor MOS, que tiene una compuerta flotante (estructura SAMOS), su estado normal está cortado y la salida proporciona un 1 lógico.

Aunque una EEPROM puede ser leída un número ilimitado de veces, sólo puede ser borrada y reprogramada entre 100.000 y un millón de veces.

Estos dispositivos suelen comunicarse mediante protocolos como I²C, SPI y Microwire. En otras ocasiones, se integra dentro de chips como microcontroladores y DSPs para lograr una mayor rapidez.

El Microcontrolador Tiva TMC1294 cuenta con una memoria eeprom de 6KB, esta memoria se utilizó para almacenar los datos provenientes del convertidor analogico digital y hacer los cálculos después sin afectar la frecuencia de muestreo.

6.6 MEDICIÓN DE IMPEDANCIA DE FORMA EXPERIMENTAL EN EL PROYECTO.

Una vez que se han tomado en cuenta las especificaciones requeridas para una adquisición correcta de la señal de voltaje V_{shunt} por medio del microcontrolador, procedemos a muestrear las señales procedentes de la implementación del circuito low side sensing (fig 6.8) con el circuito equivalente de la sección 3.8

En la figura 6.17 se muestran las diferencias de amplitud entre una señal con Cdi = 1 nF, 5 nF y 10 nF.

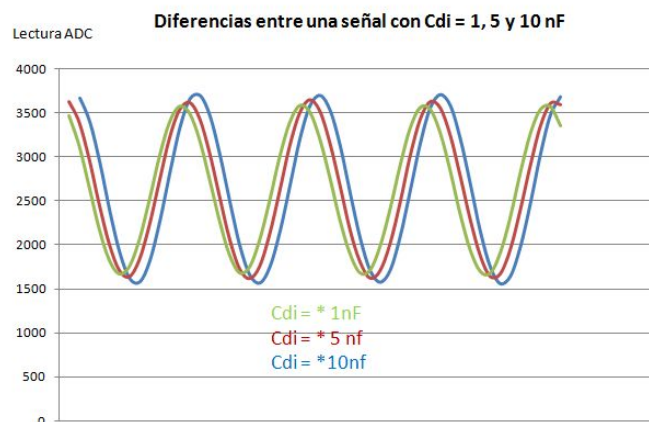


Fig 6.17 Diferencias entre una señal con Cdi = 1 nF, 5 nF y 10 nF; Medición realizada con el Sistema de Medición de Impedancia incorporado al Microcontrolador Tiva TM4C1294.

Con el muestreo obtenido y conociendo la frecuencia y amplitud de la señal de entrada, es posible realizar un programa que calcule la impedancia real tomando en cuenta las ecuaciones de la sección 5.7. el programa desarrollado se muestra en el Anexo A.

6.7 VALIDACIÓN DE RESULTADOS

Para comprobar la veracidad de los resultados se hizo una comparación de las mediciones: teórica, y las obtenidas con el medidor de impedancias comercial

(Agilent LCR meter E4980A) y el sistema de medición de impedancia desarrollado en este trabajo de tesis para capacitancias entre 1 y 10nF

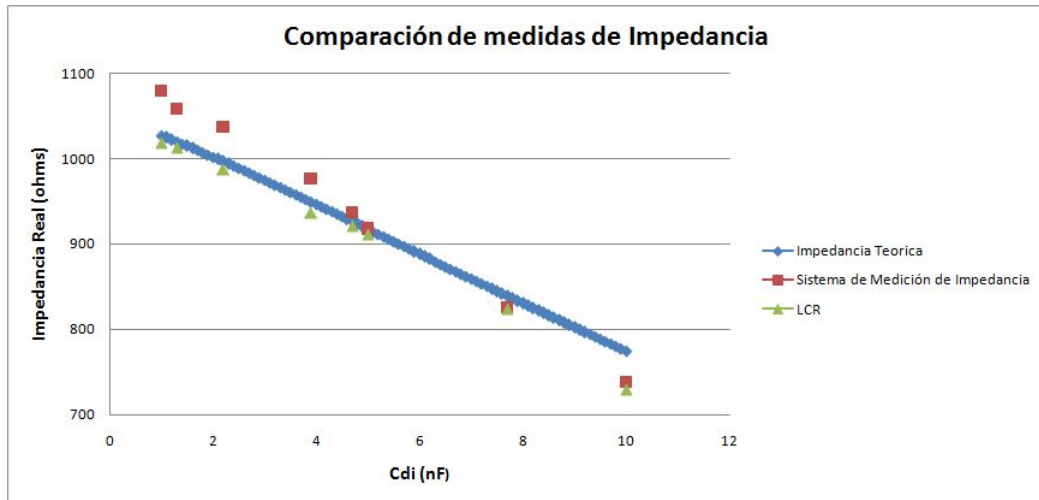


Fig 6.18 Comparación de Impedancia teórica vs Impedancia Experimental

La figura 6.18 muestra una gran similitud entre los tres grupos de valores lo cual indica que las mediciones obtenidas con el sistema de medición de impedancia son confiables y puede ser utilizado en la medición de impedancia de células en cultivo.

La siguiente figura 6.19 muestra qué tanto varían las mediciones en el ADC del microcontrolador, se puede apreciar que la variación es mínima, esto se logró gracias al oversampling implementado en el programa de adquisición de datos.

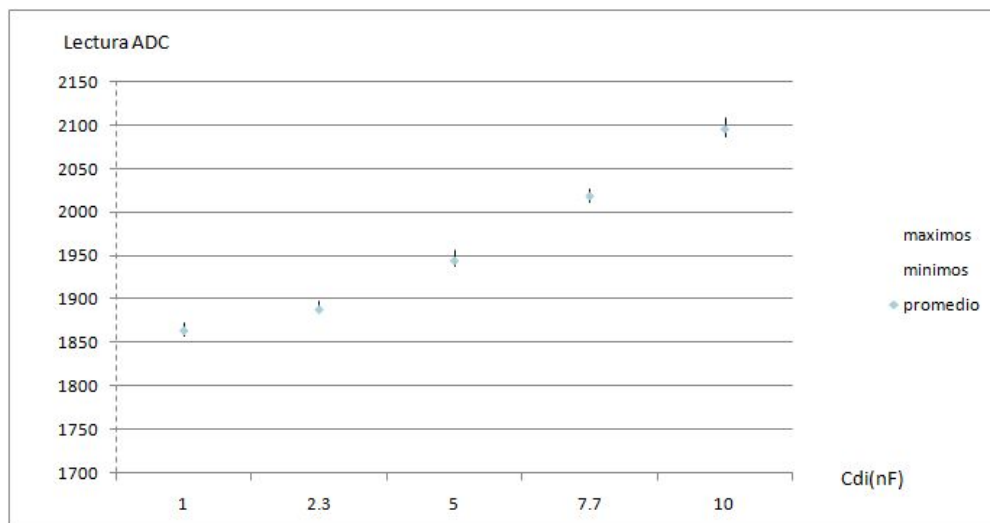


Fig 6.19 Variación en las medidas del microcontrolador

6.8 MEDICIÓN DEL ÁNGULO DE DESFASE

La parte de la impedancia que más interesa conocer es el desfase de la

corriente, lo cual nos dará información sobre la naturaleza de la impedancia como se explica en la sección 2.3 y tomando en cuenta que el comportamiento de las membranas celulares es predominantemente capacitivo.

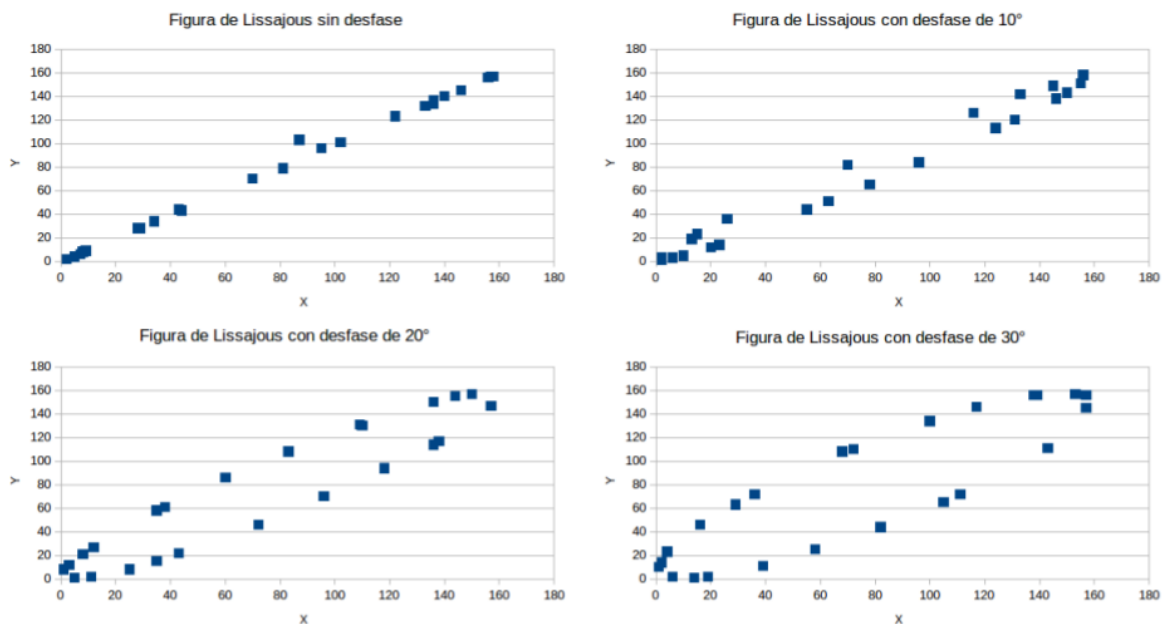
Para medir el desfase entre dos señales senoidales, al igual que en la medición de la impedancia, se requirió el uso de un microcontrolador solo que en este caso se necesitó contar con dos convertidores analógico digital para poder obtener mediciones simultáneas de las dos señales bajo estudio.

Para llevar a cabo esa tarea se utilizó el microcontrolador teensy 3.2 ya que cuenta con dos ADC's que pueden realizar mediciones independientes al mismo tiempo además tiene un procesador de 32 bits ARM Cortex-M4 de 72 MHz.

Se utilizaron dos técnicas para la medición de ángulo de desfase: la obtención de figuras de lissajous y el cálculo de la diferencia de tiempos entre máximos de señal.

- Figuras de Lissajous

Este método consiste en graficar los valores de las dos señales, tomando el valor de la primera como las abscisas y la segunda como las ordenadas. La gráfica resultante corresponde a una figura de Lissajous la cual permite apreciar el desfase entre dos señales senoidales. A continuación se muestran las figuras de Lissajous (figura 6.20) obtenidas de las mediciones tomadas con el microcontrolador teensy para desfases de 0 a 90° con una relación X:Y de 1:1.



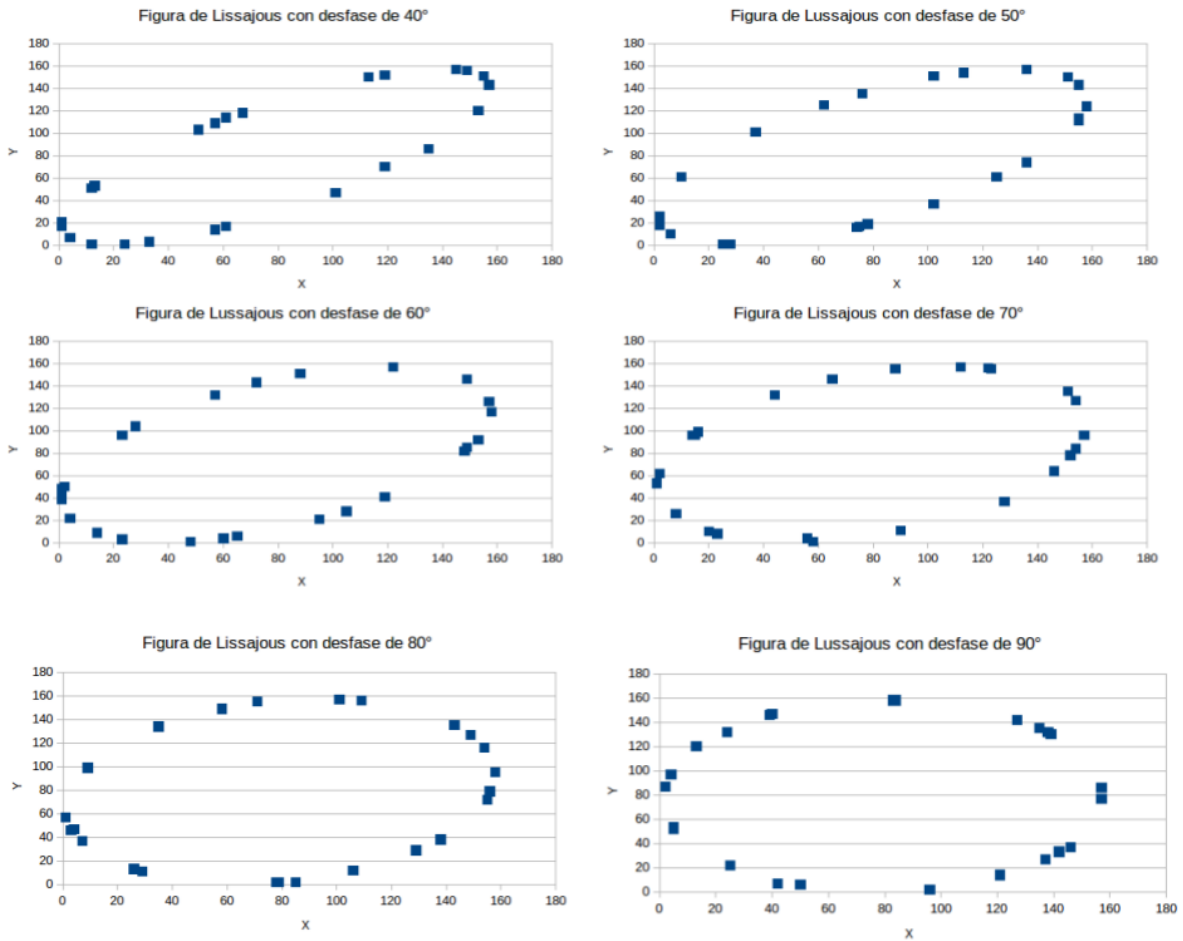


Fig 6.20 Figuras de Lissajous de 0° a 90°

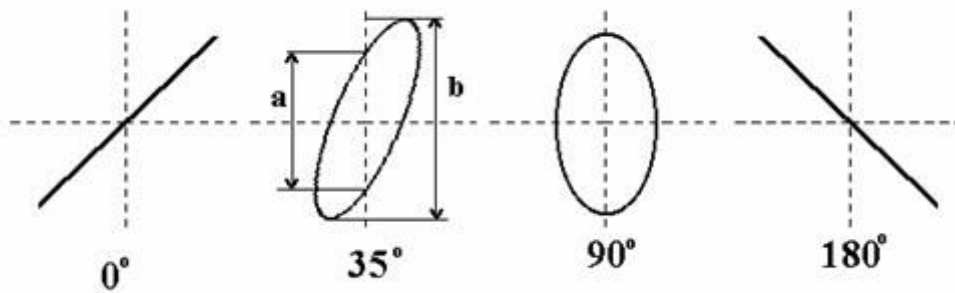


Fig 6.21 Medición del ángulo en Figuras de Lissajous

Para medir el ángulo de desfase entre las dos señales se mide las distancias a y b (figura 6.21), después se calcula con las siguiente fórmula:

$$\varphi = \arcsen a/b$$

El inconveniente de este método es que para calcular el ángulo, las señales adquiridas se tendrían que analizar por separado lo cual no permitiría una medición en tiempo real, es por eso que se busco otra forma de medir el desfase entre dos señales senoidales.

- Desfase de tiempo

Consiste en medir la diferencia de tiempo en la que dos señales senoidales alcanzan un punto de referencia que puede ser la cresta, el valle o el cruce por cero, para medir ese tiempo y el ángulo de desfase optimizó el código para alcanzar una frecuencia de muestreo simultánea en los 2 ADCs de 1000000 muestras por segundo.

A continuación se muestran imágenes del muestreo de las dos señales con distintos ángulos de desfase(figuras 6.22,6.23,6.24).

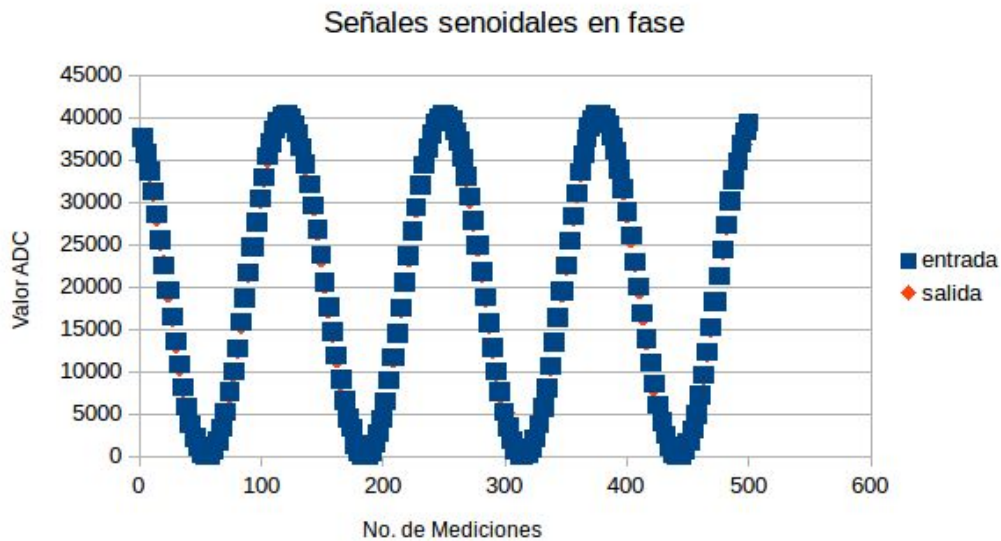


Fig 6.22 Señales senoidales de 1 Vpp de Amplitud y 10 kHz de frecuencia sin desfase, introducidas al ADC_0 y ADC_1 respectivamente del microcontrolador teensy 3.2.

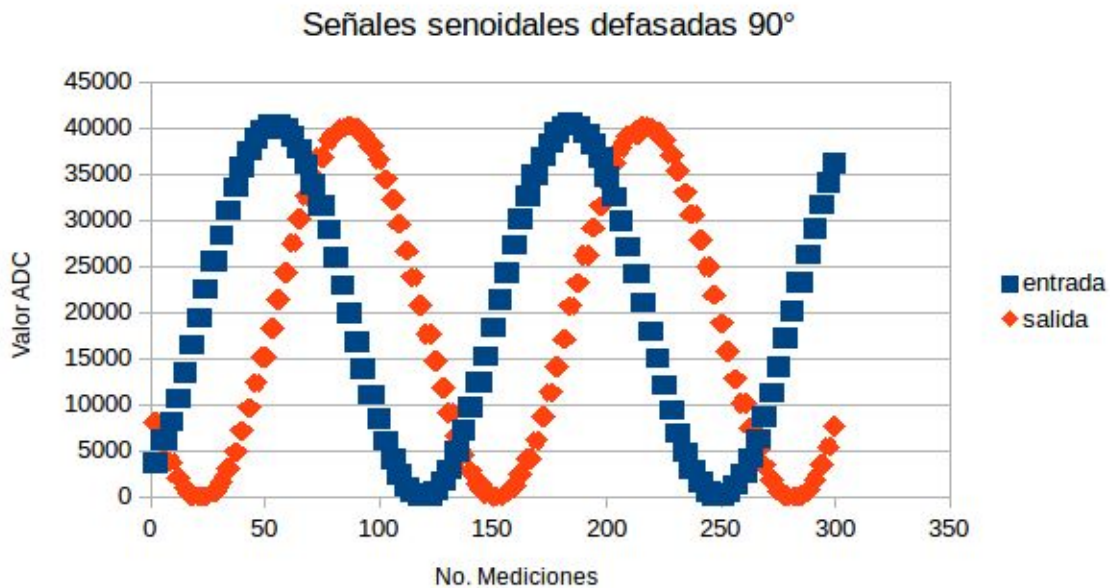


Fig 6.23 Señales senoidales de 1 Vpp de Amplitud y 10 kHz de frecuencia con 90 ° de desfase, introducidas al ADC_0 y ADC_1 respectivamente del microcontrolador teensy 3.2.°

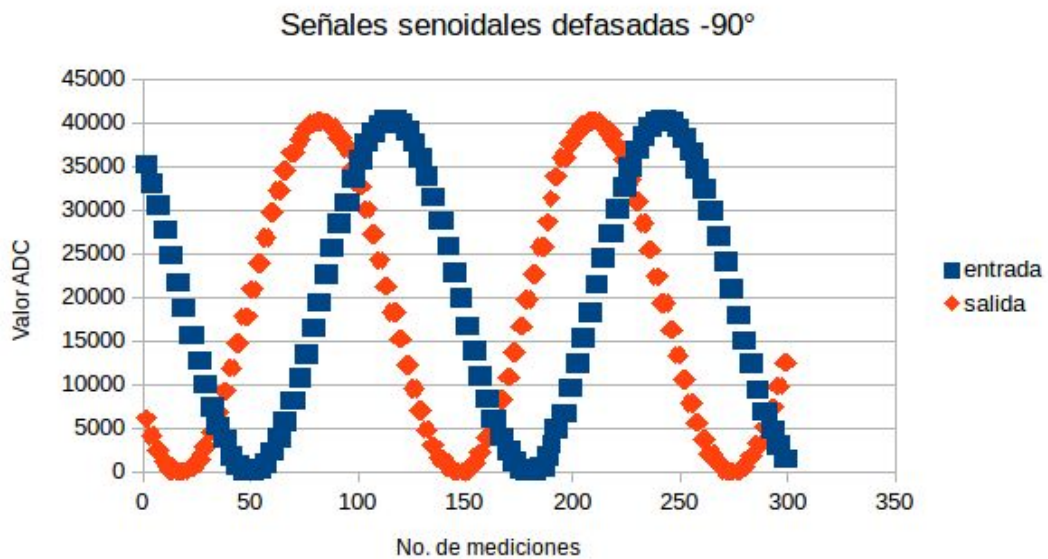


Fig 6.24 Señales senoidales de 1 Vpp de Amplitud y 10 kHz de frecuencia con -90 ° de desfase, introducidas al ADC_0 y ADC_1 respectivamente del microcontrolador teensy.

Una vez que se optimizó la frecuencia de muestreo, se programó una función que mida la diferencia de tiempos entre el máximo de la primer señal y el máximo de la segunda señal introducida y después se asoció dicha diferencia a un ángulo de desfase.

Es importante mencionar que el lapso mínimo de muestreo es de 1 microsegundo, lo cual para una señal de 10kHz como la que se está usando, solo permite medir cambios de 3.6 grados de desfase.

Se compararon las medidas de este sistema para medir desfase con las de un osciloscopio DSO-X 2004A de Agilent Technologies y se obtuvieron las gráficas de la figura 6.25 y 6.26.

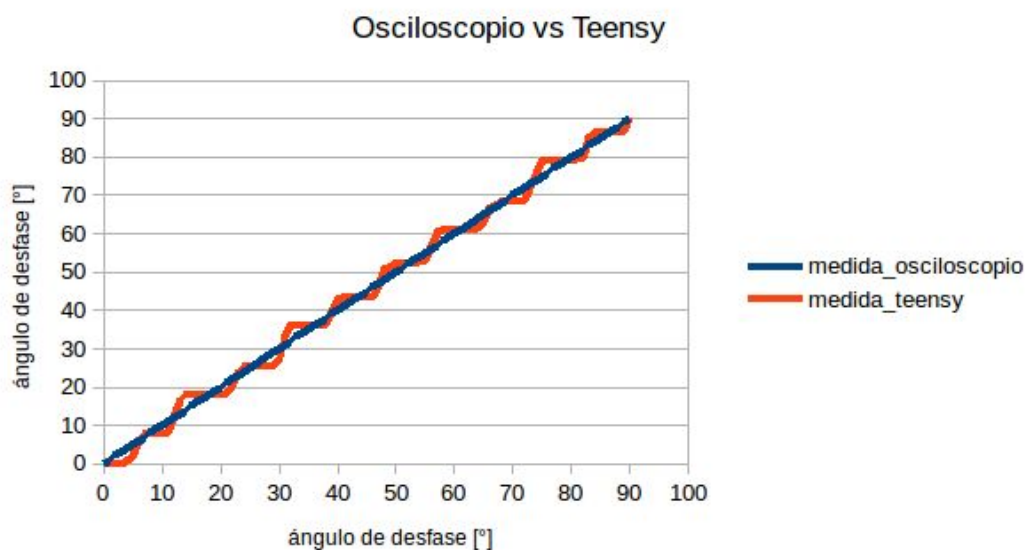


Fig 6.25 Comparación con osciloscopio desfases de 0 a 90°

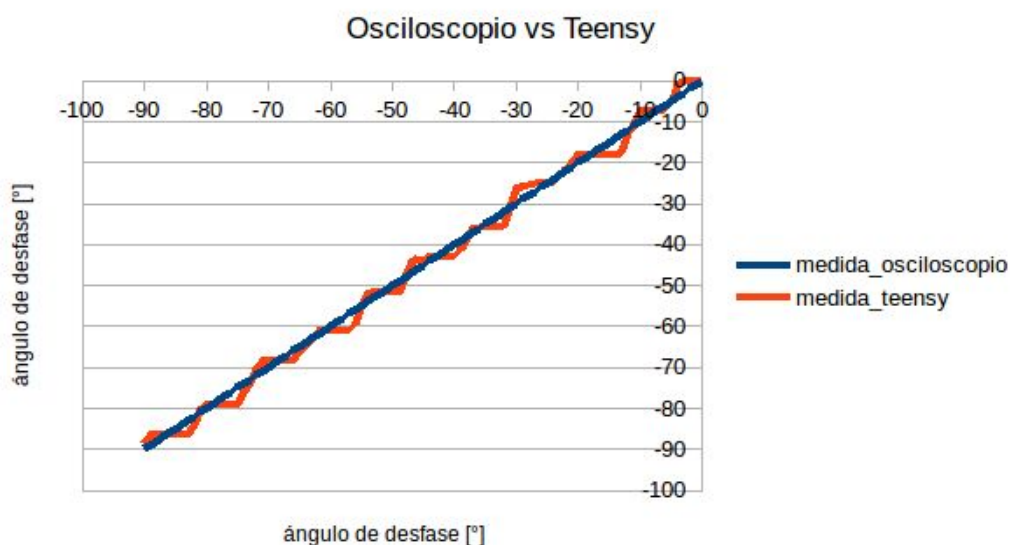


Fig 6.26 Comparación con osciloscopio desfases de 0 a -90°

La señal escalonada que se aprecia en la medición con el microcontrolador teensy, es debido a la resolución mínima alcanzada de aproximadamente 5 grados, por lo cual, se tiene la misma medida para distintos valores de desfase. sin embargo el comportamiento se ajusta a la medida de referencia.

Capítulo 7

PLATAFORMA FINAL

A lo largo del desarrollo de este proyecto de tesis, se diseñó y construyó una mini-incubadora capaz de mantener condiciones controladas de temperatura, humedad y concentración de CO₂. Se probó la supervivencia y proliferación de células en dicho entorno. Las condiciones se monitorean mediante un display y una aplicación comunicada vía bluetooth con la mini-incubadora de la figura 7.1.

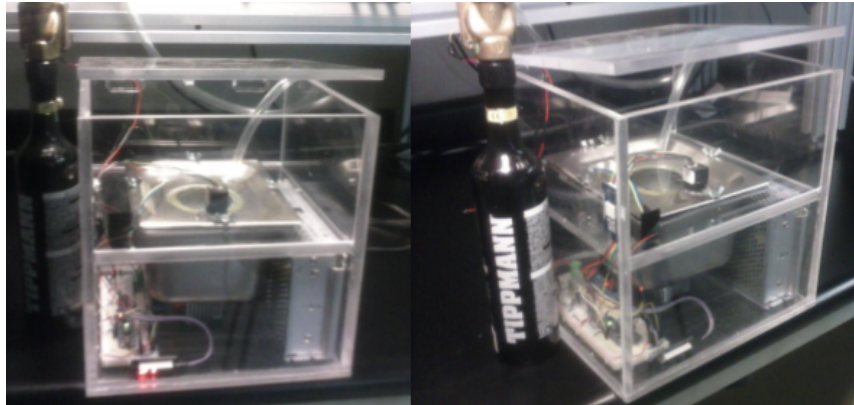


Fig 7.1 Mini-incubadora en funcionamiento

Simultáneamente se desarrolló un sistema diseñado para medir la impedancia real y el ángulo de desfase en un medio de cultivo con células por el método de microbiología de impedancia con ayuda de un arreglo de microelectrodos. Dicho sistema (figura 7.2) se probó utilizando un circuito equivalente encontrado en la literatura que simula el comportamiento de un arreglo de microelectrodos con diferentes concentraciones de células en cultivo.

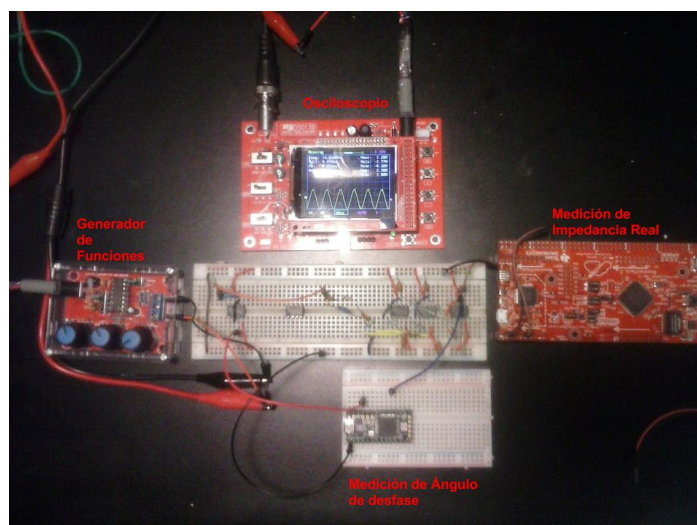


Fig 7.2 Bloques del sistema de medición de impedancia.

Capítulo 8

CONCLUSIONES

La presente tesis tuvo como objetivo desarrollar un sistema que permitiera monitorizar la proliferación o muerte celular en cultivo. Para construir el sistema se desarrollaron de forma paralela 2 subsistemas: una mini-incubadora y un sistema de medición de impedancia, el cual a su vez consistió de dos partes; medición de impedancia real y medición de ángulo de desfase.

La razón de subdividir el sistema en varios más pequeños es que cada subsistema tiene requerimientos muy particulares en cuanto a conocimientos requeridos para su desarrollo, materiales utilizados, hardware y software; un ejemplo de ello es que el sistema completo hace uso de 3 microcontroladores de distintas características que se adecuan a la realización de cada tarea específica.

El primer subsistema; la mini-incubadora, está enfocado al manejo de sensores y actuadores y el despliegue de información al usuario. En este sistema la prioridad es mantener las condiciones ambientales requeridas por las células durante largos periodos de tiempo; por lo tanto, la parte crítica recae en los materiales y sustancias utilizadas y en la precisión de los sensores. También es importante la energización del sistema y los algoritmos de control para cada variable de ambiente. Por último, la comunicación bluetooth permite monitoreo inalámbrico constante del funcionamiento del sistema, esta no es una parte crítica pero es con lo que el usuario puede interactuar, de ahí su importancia.

El segundo subsistema; El medidor de impedancia real, tiene requerimientos muy distintos, ya que está compuesto en su totalidad por elementos electrónicos y de procesamiento. En este sistema el punto medular es la precisión de las mediciones, y los cálculos, es por ello que está compuesto por amplificadores de precisión y se tiene especial cuidado con el ruido tanto exterior como de los componentes electrónicos y es por ello que también se utiliza el oversampling, todo con el fin de que la medición final sea lo más precisa posible.

El tercer subsistema; El medidor de desfase, en esencia es similar al segundo subsistema, sin embargo en este sistema la característica más importante es la velocidad de adquisición de datos para dos señales simultáneas. Tan importante es la velocidad para este sistema que cada conjunto de datos debe tardar la millonésima parte de un segundo en pasar por todos los procesos de la conversión analógica digital que se explican en la sección 5.8.

Para validar las mediciones se utilizó un LCR meter E4980A y el osciloscopio DSO-X 2004A ambos de Agilent Technologies.

Hay que tomar en cuenta que para el desarrollo de este sistema se contó con tiempo y presupuesto limitados; por ello se considera que cada subsistema puede ser mejorado, sin embargo los objetivos planteados en un principio se cumplieron y el sistema es totalmente funcional y confiable.

El trabajo a futuro es sembrar y cultivar células en la mini-incubadora, permitiendo así la proliferación de las células y al mismo tiempo realizar una medición de la proliferación utilizando el sistema de medición de impedancia con un arreglo nuevo de electrodos de platino u oro los cuales tienen mejores resultados en periodos de medición largos.

REFERENCIAS.

- [1] Organización Mundial de la Salud. (2017). *Cáncer*. [online] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> [Accessed 24 May 2017].
- [2] National Cancer Institute. (2017). *Tratamiento*. [online] Available at: <https://www.cancer.gov/espanol/investigacion/areas/tratamiento> [Accessed 6 Jun. 2017].
- [3] Rangel, E. R., Amparo, J., García, R., Peña, E. M., & Hernández, J. L. (2012). Biomimética : innovación sustentable inspirada por la naturaleza Biomimetic : sustainable innovation inspired by nature, 56–61.
- [4] Aston. A., Saffie-Siebert, R., Canham, L., Ogden, J. 2005. Nanotechnology Applications for Drug Delivery. *Pharm. Tech. Eur.* 17 (4), 21–28.
- [5] Francisco, D., Arrebola, A., Alfredo, L., & Fernández, R. (n.d.). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia , algunas consideraciones y su utilidad ., 40–52.
- [6] Lei, K. F. (2014). Review on impedance detection of cellular responses in micro/nano environment. *Micromachines*, 5(1), 1–12. <http://igdoi.org/10.3390/mi5010001>
- [7] Yeon, J. H., & Park, J. (2005). Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip, 341, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.03.047>
- [8] Zujew, I. C. (n.d.). Impedancias, corrientes y fasoriales, 1–4.
- [9] Mungia, H(2017)Available at: http://paginas.fisica.uson.mx/horacio.munguia/aula_virtual/Cursos

- /Instrumentacion%20I/Documentos/Introduccion%20Circuitos.pdf [Accessed 7 Jun. 2017].
- [10] Davoine, F. (n.d.). Análisis de circuitos de CA con impedancias Complejas, 1–9.
- [11] Elias S.E.(n.d.) Corriente Alterna. Universidad Nacional de San Juan
- [12] Ronconi, M. (2011). Medicina del Deporte, 4(4), 167–174.
- [13] Nuñez R, Escalona J. Ciclo celular. UNAM, Facultad de Medicina, Departamento de embriología. 2015.
- [14] Zedon M. (2007). TEMA 7: Proliferación celular.
- [15] Iqb.es. (2017). *Fisiología. Capítulo III*. [online] Available at: http://www.iqb.es/cbasicas/fisio/cap04/cap4_1.htm [Accessed 8 Jun. 2017].
- [16] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Molecular Biology of the Cell. 4^a ed. New York: Garland Publishing (200).
- [17] Hille, B. Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 1984
- [18] Facmed.unam.mx. (2017). *Biofísica*. [online] Available at: <http://www.facmed.unam.mx/Libro-NeuroFisio/04-NeuroFisioCelular/Membrana/MembranaCarac.html> [Accessed 8 Jun. 2017].
- [19] Hugo, B. Y., Arid, F., & Morse, S. (1925). THE ELECTRIC RESISTANCE AND CAPACITY OF BLOOD, (1), 153–167.
- [20] Hodgkin AL, Huxley AF. Nature. 1939;144:710–711.
- [21] Curtis, H.J. & Cole, K. S. (1940) Membrane action potentials from the squid giant axon. J. Cell. & Comp. Physiol. 15: 147-157
- [22] Cole, B. Y. K. E. N. N. E. T. H. S., & Baker, R. F. (1941). Longitudinal i m p e d a n c e of t h e squid giant axon, 771–788.
- [23] Es.wikipedia.org. (2017). Irritabilidad (biología). [online] Available at: [https://es.wikipedia.org/wiki/Irritabilidad_\(biolog%C3%ADa\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Irritabilidad_(biolog%C3%ADa)) [Accessed 30 Jul. 2017].
- [24] Lopez (2017). *Excitabilidad. potenciales de membrana..* [online] Es.slideshare.net. Available at: <https://es.slideshare.net/blackberrysexy/excitabilidad-potenciales-de-membrana-9550312> [Accessed 12 Jun. 2017].
- [25] Bragós R, Sarro E, Fontova A, Soley A, Cairó J, BayésGenís A, Rosell J. Four versus two-electrode measurement strategies for cell growing and differentiation monitoring using electrical impedance spectroscopy. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2006; 1: 2106-9.

- [26] Gemini V, Correa E, Gallegos A, Korol S. Degradación microbiana de 2,4-dinitrofenol en efluentes líquidos: efecto de factores bióticos y abióticos. *Higiene y Sanidad Ambiental* 2008; 8: 320-324.
- [27] Ferrer JR, Davalillo Y, Chandler C, Páez G, Mármol Z, Ramones E. Producción de proteína microbiana a partir de los desechos del procesamiento de la caña de azúcar (bagacillo). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 2004; 12(2): 59-65.
- [28] Microinmuno.qb.fcen.uba.ar. (2017). [online] Available at: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioRecuento.htm> [Accessed 9 Jun. 2017].
- [29] *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* • volumen XXX • número 2 • Diciembre 2009
- [30] Ivora A. Bioimpedance monitoring for physicians: an overview. Centre Nacional de Microelectrónica, Biomedical Applications Group. 2002.
- [31] Salazar, Y. (2009). espectroscopia de impedancia eléctrica, 98–108.
- [32] Schwan HP (1963). "Determination of biological impedances", Chap 6 in *Physical Techniques in Biological Research*, edited by WL Nastuk, vol VI, Part B, *Electrophysiological Methods*, Academic Press, New York, pp 323-407.
- [33] Baeza, A. (2002). *Sensores y Biosensores Electroquímicos*, 1–15.
- [34] Lei, K. F. (2014). Review on impedance detection of cellular responses in micro/nano environment. *Micromachines*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/mi5010001>
- [35] Yang, L., Li, Y., Griffis, C. L., & Johnson, M. G. (2004). Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*, 19, 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.10.009>
- [36] Gerwen, P. Van, Laureyn, W., Laureys, W., Huyberechts, G., Beeck, M. Op De, Baert, K., ... Mertens, R. (1998). Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors, 49, 73–80.
- [37] Es.wikipedia.org. (2017). *Doble capa eléctrica*. [online] Available at: https://es.wikipedia.org/wiki/Doble_capa_el%C3%A9ctrica [Accessed 12 May 2017].
- [38] By Larryisgood - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=17639292>
- [39] Ehret, R.; Baumann, W.; Brischwein, M.; Schwinde, A.; Stegbauer, K.; Wolf, B. Monitoring of cellular behavior by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 29–41.

- [40] Pethig, R.; Markx, R.H. Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1997, 15, 426–432.
- [41] Huang and D.W. Greve, Impedance Based Biosensor Array for Monitoring Mammalian Cell Behavior, *Sensors* (2003 DOI: 10.1109)
- [42] J. G. Webster and D. Beebe, *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation Vol 1*, vol. 1. 2006, pp. 120–145.
- [43] Pimpin, A., & Srituravanich, W. (n.d.). Review on Micro- and Nanolithography Techniques and their Applications, 16(1), 37–55.
<https://doi.org/10.4186/ej.2012.16.1.37>
- [44] Razo-de-le, A., Rojas-benito, M. C. I., Centeno-sierra, M., Fiordelasio-coll, T., & Stern-forgach, C. E. (2017). Use of a CD laser pickup head to fabricate microelectrodes in polymethylmethacrylate substrates for biosensing.
<https://doi.org/10.1007/s10544-016-00145-0>
- [45] López, J., Cruz-ramírez, A., & Hautefeuille, M. (2014). Carbon Paste Microelectrodes Microfabrication Using a Low-Cost Laser, (1), 4–6.
- [46]]Es.wikipedia.org. (2017). *Efecto termoeléctrico*. [online] Available at: https://es.wikipedia.org/wiki/Efecto_termoel%C3%A9ctrico [Accessed 12 May 2017].
- [47] Raynaud, D., J. Jouzel, J.M. Barnola, J. Chappellaz, R.J. Delmas & C. Lorius, 1993. *The ice core record of greenhouse gases*. *Science*, 259:926-934
- [48] Ambienteysociedadenvicentelopez.blogspot.mx. (2017). *La absorción de energía infrarroja por el CO₂*. [online] Available at: <http://ambienteysociedadenvicentelopez.blogspot.mx/2012/04/la-absorcion-de-energia-infrarroja-por.html> [Accessed 12 May 2017].
- [49] Fernández F.V, A. (2003). *Amplificadores operacionales*.
- [50] Bioeléctricos, I. A. A. (n.d.). Tema 8 introducción a amplificadores bioeléctricos. 8-1, 1–33.
- [51] Jorge A. Márquez Flores.(2013). *Amplificadores Operacionales. Introducción a Instrumentación y Señales -CCADET-UNAM* o, 1–51.
- [52] Schiavon, I. (2010). *AMPLIFICADOR DIFERENCIAL*, 1–20.
- [53] Huircán, J. I. (2015). *Aplicaciones del Amplificador Operacional*, 1–12.
- [54] Widlar, B., & Semiconductor, N. (1965). *Amplificadores operacionales*, 2, 1–50.
- [55] J.J., G. (n.d.). *Amplificadores diferenciales, de instrumentación y de puente 3.1. Circuitos Analógicos Aplicados*, (1), 1–8.
- [56] .Curiosidades de un químico soñador. (2017). *Electroquímica de procesos biológicos (I): el potencial de acción*. [online] Available at:

<https://quimicosonador.wordpress.com/2012/09/12/electroquimica-de-procesos-biologicos-i-el-potencial-de-accion/> [Accessed 8 Jun. 2017].

[57]S., Meza, U., Romero-méndez, A. C., & Licón, Y. (2010). *L p m b s*, 29(4), 125–134.

ANEXO A (PROGRAMAS)

// Programa para medir impedancia real por medio del microcontrolador TM4C1294

// ***Desarrollado por Ing. Arturo Abner Jiménez Aguilar ***

```
// librerías incluidas
#include "driverlib/pin_map.h"
#include <stdint.h>
#include <stdbool.h>
#include "inc/hw_gpio.h"
#include "inc/hw_types.h"
#include "inc/hw_memmap.h"
#include "driverlib/sysctl.h"
#include "driverlib/pin_map.h"
#include "driverlib/gpio.h"
#include "driverlib/pwm.h"
#include "driverlib/eeprom.h"
#include "eeprom.h"
#include "driverlib/adc.h"
#include <lm4f120h5qr.h>
#include "inc/lm4f120h5qr.h"

// variables utilizadas
uint32_t ui32EEPROMInit;
uint32_t pui32Data[1500]; // data señal 1
uint32_t pui32Read[1500]; // read señal 1
uint32_t regreso;
uint32_t mayor, menor, mayor_1, menor_1, diferencia, diferencia_1;
float voltaje, voltaje_1, VSA, VI_O, corriente, impedancia;
float factor = 0.000809; // factor de amplificación del sistema de medición de impedancia

void setup() {
    Serial.begin(9600); // baud rate
    SysCtlPeripheralEnable(SYSCTL_PERIPH_ADC0); // habilitar el modulo ADC0.
    while(!SysCtlPeripheralReady(SYSCTL_PERIPH_ADC0)) // Esperar a que el modulo
ADC0 este listo.
    {
        SysCtlPeripheralEnable(SYSCTL_PERIPH_EEPROM0); // habilitar la eeprom0
        while(!SysCtlPeripheralReady(SYSCTL_PERIPH_EEPROM0)) // esperar a que este lista
la memoria EEPROM
        {
            ui32EEPROMInit = EEPROMInit(); // Esperar a que se inicialize completamente la
```


EEPROM

```
if(ui32EEPROMInit != EEPROM_INIT_OK)//Checar si hubo un error en la inicialización de la eeprom
```

```
{
    while(1){}
}
```

```
// duplicar el muestreo en el ADC0(aumenta la precisión en las mediciones aunque reduce la capacidad de muestras tomadas por segundo)
```

```
ADCHardwareOversampleConfigure(ADC0_BASE,2);
ADCSoftwareOversampleConfigure(ADC0_BASE,1,4);
```

```
}
```

```
void loop() {
```

```
    // realizar 1500 lecturas en el ADC0 y guardarlos en la eeprom
```

```
    for (int i=0;i<1500;i++){
```

```
        // analog read ADC0 (voltaje resultante de circuito medidor de impedancia)
```

```
        // guardar en un arreglo llamado Pui32Data
```

```
        pui32Data[i] = analogRead(A0);
```

```
    }
```

```
    EEPROMProgram(pui32Data, 0x001, sizeof(pui32Data)); // programar los datos del arreglo en la eeprom
```

```
    //leer los datos almacenados en la eeprom y guardarlos en el arreglo pui32Read
```

```
    EEPROMRead(pui32Read, 0x001, sizeof(pui32Read));
```

```
    //se calcula el mayor y menor voltaje leídos para obtener el VPP de la señal de voltaje obtenida
```

```
    mayor = pui32Read[0]; //Le asignamos el primer elemento del array
```

```
    menor = pui32Read[0]; //Así empezamos a comparar
```

```
    // en este ciclo se obtendrán los valores mayor y menor de la lectura del ADC
```

```
    for (int i=0; i<1500; i++){
```

```
        if (pui32Read[i]> mayor){
```

```
            mayor=pui32Read[i];
```

```
        }
```

```
        if (pui32Read[i]< menor){
```

```
            menor=pui32Read[i];
```

```
        }
```

```
    }
```

```
    // en esta sección se calcula la impedancia del circuito medido, se toma en cuenta la resistencia shunt(2200 ohms)
```

```
    // el factor de amplificación (0.000809) y un voltaje de entrada de 10 mv
```

```
    diferencia = mayor-menor;
```

```
    voltaje = diferencia*factor;
```

```
    VSA=voltaje/210; //voltaje sin amplificar
```

```

VI_O=.010-VSA; // vin - vout falta obtener voltaje de entrada
corriente = VSA/2200; // vout / R...2200;
impedancia = VI_O/corriente;
Serial.print("la impedancia es "); // se manda el valor a el puerto serial
Serial.println(impedancia,6);

```

```

delay(10000); //tiempo para visualizar los resultados del cálculo
}

```

// Programa para medir ángulo de desfase por medio del microcontrolador Teensy 3.2

// ***Desarrollado por Ing. Arturo Abner Jiménez Aguilar ***

```

// librerías incluidas
#include <Average.h>
#include <ADC.h>
// variables utilizadas
const int readPin = A9;
const int readPin2 = A3;
unsigned long time[150];
ADC *adc = new ADC(); // adc object
void setup() {

    pinMode(LED_BUILTIN, OUTPUT);
    pinMode(readPin, INPUT);
    pinMode(readPin2, INPUT);

    Serial.begin(2000000); // baud rate

    ///// ADC0 /////
    // reference can be ADC_REFERENCE::REF_3V3, ADC_REFERENCE::REF_1V2 (not
for Teensy LC) or ADC_REFERENCE::REF_EXT.
    //adc->setReference(ADC_REFERENCE::REF_1V2, ADC_0); // change all 3.3 to 1.2 if
you change the reference to 1V2

    adc->setAveraging(1); // set number of averages
    adc->setResolution(16); // set bits of resolution

    // it can be any of the ADC_CONVERSION_SPEED enum: VERY_LOW_SPEED,
LOW_SPEED, MED_SPEED, HIGH_SPEED_16BITS, HIGH_SPEED or
VERY_HIGH_SPEED
    // see the documentation for more information
    // additionally the conversion speed can also be ADACK_2_4, ADACK_4_0, ADACK_5_2
and ADACK_6_2,
    // where the numbers are the frequency of the ADC clock in MHz and are independent on
the bus speed.
    adc->setConversionSpeed(ADC_CONVERSION_SPEED::HIGH_SPEED); // change the
conversion speed

```

```

// it can be any of the ADC_MED_SPEED enum: VERY_LOW_SPEED, LOW_SPEED,
MED_SPEED, HIGH_SPEED or VERY_HIGH_SPEED
adc->setSamplingSpeed(ADC_SAMPLING_SPEED::HIGH_SPEED); // change the
sampling speed

// always call the compare functions after changing the resolution!
//adc->enableCompare(1.0/3.3*adc->getMaxValue(ADC_0), 0, ADC_0); // measurement
will be ready if value < 1.0V
//adc->enableCompareRange(1.0*adc->getMaxValue(ADC_0)/3.3,
2.0*adc->getMaxValue(ADC_0)/3.3, 0, 1, ADC_0); // ready if value lies out of [1.0,2.0] V

// If you enable interrupts, notice that the isr will read the result, so that isComplete() will
return false (most of the time)
//adc->enableInterrupts(ADC_0);

///// ADC1 /////
adc->setAveraging(1, ADC_1); // set number of averages
adc->setResolution(16, ADC_1); // set bits of resolution
// change the conversion speed
adc->setConversionSpeed(ADC_CONVERSION_SPEED::HIGH_SPEED, ADC_1);
// change the sampling speed
adc->setSamplingSpeed(ADC_SAMPLING_SPEED::HIGH_SPEED, ADC_1);
//adc->setReference(ADC_REFERENCE::REF_1V2, ADC_1); change the voltage
reference
// always call the compare functions after changing the resolution!
//adc->enableCompare(1.0/3.3*adc->getMaxValue(ADC_1), 0, ADC_1); // measurement
will be ready if value < 1.0V
//adc->enableCompareRange(1.0*adc->getMaxValue(ADC_1)/3.3,
2.0*adc->getMaxValue(ADC_1)/3.3, 0, 1, ADC_1); // ready if value lies out of [1.0,2.0] V
adc->startSynchronizedContinuous(readPin, readPin2); // medición sincronizada en
readPin1 y 2
delay(100);
Serial.println("end setup");
}
//la funcion retraso calcula la diferencia de tiempo entre los máximos de la primera y
segunda señal
int retraso () {
// declaración de variables
unsigned long time1=0;
unsigned long time2=0;
long desfase=0;
ADC::Sync_result result[150];
// adquisición de señales

for (int x = 0; x < 150; x++) {
time[x] = micros();
}

```

```

        result[x] = adc->readSynchronizedContinuous();
    }
/*
    for (int x = 0; x < 150; x++) { // desplegar la señal en el plotter
        Serial.print(time[x]);
        Serial.print(",");
        Serial.print((uint16_t)result[x].result_adc0);
        Serial.print(",");
        Serial.println((uint16_t)result[x].result_adc1);
    }
*/

    // se obtienen los mayores de las dos señales y los tiempos de esos mayores, luego
    se comparan

    int mayor = (uint16_t)result[0].result_adc0; //Le asignamos el primer elemento de la
    señal 1
    int mayor1 = (uint16_t)result[0].result_adc1; //Le asignamos el primer elemento de la
    señal 2

    for (int x=0; x<150; x++){ // obtiene el mayor de la primer señal

        if ((uint16_t)result[x].result_adc0 > mayor){
            mayor=(uint16_t)result[x].result_adc0;
            time1 =time[x]; // guarda el instante de tiempo en que sucede el mayor
        }
    }
    for (int x=0; x<150; x++){ // obtiene el mayor de la segunda señal

        if ((uint16_t)result[x].result_adc1 > mayor1){
            mayor1= (uint16_t)result[x].result_adc1;
            time2 = time[x]; // guarda el instante de de tiempo en que sucede el mayor
        }
    }

    // calcula el desfase en función de la diferencia de tiempos de los máximos de las dos
    señales
    desfase=time1-time2;
    return desfase;

}

void loop() {

    Average<int> prom(100); // variables de la librería average.h

```

```

Average<int> ave(100);
// con este ciclo se pretende por medio de estadística descartar los valores incongruentes
resultantes de la adquisición de datos
for(int j=0;j<100;j++){
    for (int i=0;i<100;i++){
        ave.push(retraso());
    }
    prom.push(ave.mode()); //moda
}
Serial.println(prom.mean()*3.6);// imprime por el puerto serial el ángulo de desfase
delay(10000);
}

```

// Programa para controlar ambiente de mini-incubadora por medio del microcontrolador Arduino Nano

// ***Desarrollado por Ing. Arturo Abner Jiménez Aguilar **

```

#include "DHT.h"           // librería DHT22
#include "SevenSegmentTM1637.h" // librería display cuatro dígitos
// librerías para el CO2
#include <Wire.h>
#include <SPI.h>
#include <SC16IS750.h>
#include <string.h>
#include <NDIRZ16.h>

// comunicación i2c sensor de CO2
SC16IS750 i2cuart =
    SC16IS750(SC16IS750_PROTOCOL_I2C,SC16IS750_ADDRESS_BB);
NDIRZ16 mySensor = NDIRZ16(&i2cuart);

#define DHTPIN 2 // pin sensor de temperatura y humedad
#define DHTTYPE DHT22 // DHT 22 (AM2302), AM2321
DHT dht(DHTPIN, DHTTYPE); // inicializar sensor de temperatura y humedad

// datos bluetooth
char NOMBRE[10] = "HULK";
char BPS = '4'; // 1=1200 , 2=2400, 3=4800, 4=9600, 5=19200, 6=38400,
    7=57600, 8=115200
char PASS[10] = "0000";
int i=0;

// pines del display de 4 dígitos

```

```

const byte PIN_CLK = 4; // define CLK pin (any digital pin)
const byte PIN_DIO = 5; // define DIO pin (any digital pin)
SevenSegmentTM1637 display(PIN_CLK, PIN_DIO);

// pin peltier
int peltier = 3; //The N-Channel MOSFET is on digital pin 3
int valvula = 6; // puerto de la valvula
int power = 0; //Power level fro 0 to 99%
//int peltier_level = map(power, 0, 99, 0, 255); //This is a value from 0 to 255 that actually
    controls the MOSFET

void setup()
{
    Serial.begin(9600); //baudrate

    // inicializar bluetooth
    pinMode(13,OUTPUT);
    digitalWrite(13,HIGH);
    delay(10000);
    digitalWrite(13,LOW);
    Serial.print("AT");
    delay(1000);

    Serial.println("AT+NAME");
    Serial.print(NOMBRE);
    delay(1000);

    Serial.println("AT+BAUD");
    Serial.print(BPS);
    delay(1000);

    Serial.println("AT+PIN");
    Serial.print(PASS);
    delay(1000);

    display.begin(); // initializes the display
    display.setBacklight(100); // set the brightness to 100 %
    display.print("INIT"); // display INIT on the display
    delay(1000); // wait 1000 ms

// inicializar CO2
i2cuart.begin(9600);

if (i2cuart.ping()) {
    display.print("CO2");
} else {
    display.print("ERR");
}

```

```

    while(1);
}

powers(1);
//Wait for the NDIR sensor to initialize.
delay(10000);
pinMode(peltier, OUTPUT);
pinMode(valvula,OUTPUT);

}

void loop()
{

//medición co2
if (mySensor.measure()) {
    // Serial.print("CO2 Concentration is ");
    Serial.print(mySensor.ppm);
    Serial.print(",");
    //Serial.println("ppm");
    display.print(mySensor.ppm);
    delay(1500);
    display.clear();

} else {
    Serial.println("Sensor communication error.");
}
// variables temperatura y humedad
float humedad = dht.readHumidity();
float cel = dht.readTemperature();
float f = dht.readTemperature(true);
// Check if any reads failed and exit early (to try again).

if (isnan(humedad) || isnan(cel) || isnan(f)) {
    Serial.println("Failed to read from DHT sensor!");
    return;
}

float tempe=35; // temperatura objetivo
int tiempo=1000; // tiempo de encendido de celda peltier
int t = (int) cel; // cast de temperatura para display
float temperatura;
float co2;
float concentracion_limite = 50000;

temperatura = Peltier(tempe, tiempo, cel); // llamada a funcion temperatura (controla celda
en funcion de la lectura del sensor DTH22)

```

```
co2 = electrovalvula(concentracion_limite, mySensor.ppm);
```

```
//variables de humedad
```

```
int h = (int) humedad; // cast humedad para display
// digitalWrite(13, !digitalRead(13));
//Serial.println("encendido");
//Serial.println(i);
// Serial.println("Temperatura:");
Serial.print(temperatura);
display.print(temperatura);
delay(1000);
display.clear();
// Serial.println("Humedad:");
Serial.print("Humedad:");
Serial.println(humedad);
display.print(humedad);
delay(1500);
display.clear();
}
```

```
//Power control function for NDIR sensor. 1=ON, 0=OFF
```

```
void powers (uint8_t state) {
    i2cuart.pinMode(0, INPUT); //set up for the power control pin

    if (state) {
        i2cuart.pinMode(0, INPUT); //turn on the power of MH-Z16
    } else {
        i2cuart.pinMode(0, OUTPUT);
        i2cuart.digitalWrite(0, 0); //turn off the power of MH-Z16
    }
}
```

```
//Zero Point (400ppm) Calibration function for NDIR sensor. Only used when necessary.
```

```
//Make sure that the sensor has been running in fresh air (~400ppm) for at least 20 minutes
before calling this function.
```

```
void calibrate() {
    i2cuart.pinMode(1, OUTPUT); //set up for the calibration pin.
    i2cuart.digitalWrite(1, LOW); //start calibration of MH-Z16 under 400ppm
    delay(10000); //5+ seconds needed for the calibration process
    i2cuart.digitalWrite(1, HIGH); //toggle the pin HIGH back to normal operation
}
```



```

float Peltier(float temp, int tiempo, float cel) // función que controla la temperatura
{
  if (cel <temp*0.8){
    // Serial.println(" Temperatura=");
    // Serial.println(cel);
    power =240;
    //peltier_level = map(power, 0, 99, 0, 255);
    analogWrite(peltier, power); //Write this new value out to the port
    delay(tiempo);
    return cel;
  }
  else if (cel>temp*0.8 && cel<=temp*0.9){
    // Serial.println(" Temperatura=");
    //Serial.println(cel);
    power = 210;
    analogWrite(peltier, power); //Write this new value out to the port
    delay(tiempo);
    return cel;
  }
  else if (cel>temp*0.9 && cel<=temp*0.99){
    // Serial.println(" Temperatura=");
    // Serial.println(cel);
    power = 180;
    analogWrite(peltier, power); //Write this new value out to the port
    delay(tiempo);
    return cel;
  }
  else if (cel>temp*0.99 && cel<=temp*0.998){
    // Serial.println(" Temperatura=");
    // Serial.println(cel);
    power = 80;
    analogWrite(peltier, power); //Write this new value out to the port
    delay(tiempo);
    return cel;
  }
  else if (cel>temp*0.998 && cel<=temp){
    // Serial.println(" Temperatura=");
    // Serial.println(cel);
    power = 50;
    analogWrite(peltier, power); //Write this new value out to the port
    delay(tiempo);
    return cel;
  }
  else if (cel > temp){

    // Serial.println(cel);
    power = 0;
  }
}

```

```

    analogWrite(peltier, power); //Write this new value out to the port
    delay(tiempo);
    return cel;
}
}

int electrovalvula (float concentracion, float PPM)
{
    if (PPM <concentracion*0.5){

        digitalWrite(valvula, LOW); // sets the LED on
        delay(100);                // waits for a second
        digitalWrite(valvula, HIGH); // sets the LED off
        return PPM;
    }
    else if (PPM>concentracion*0.5 && PPM<=concentracion*0.9){

        digitalWrite(valvula,LOW ); // sets the LED on
        delay(50);                  // waits for a second
        digitalWrite(valvula, HIGH); // sets the LED off
        return PPM;
    }
    else if (PPM>concentracion*0.9 && PPM<=concentracion*0.95){

        digitalWrite(valvula, LOW); // sets the LED on
        delay(20);                  // waits for a second
        digitalWrite(valvula, HIGH); // sets the LED of
        return PPM;
    }
    else if (PPM>concentracion*0.95 && PPM<=concentracion*0.999){

        digitalWrite(valvula, LOW); // sets the LED on
        delay(10);                  // waits for a second
        digitalWrite(valvula, HIGH); // sets the LED of
        return PPM;
    }
    else if (PPM>concentracion*0.999 && PPM<=concentracion){

        digitalWrite(valvula, LOW); // sets the LED on
        delay(5);                   // waits for a second
        digitalWrite(valvula, HIGH); // sets the LED of
        return PPM;
    }
    else if (PPM > concentracion){

```

```
digitalWrite(valvula, HIGH); // sets the LED of
return PPM;
}
else if (PPM == 34464){
  PPM +1;
  return PPM;
}
}
```