



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIEROS  
INDUSTRIALES VALENCIA

**TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA INDUSTRIAL**

# **ESTUDIO DE UN DISPOSITIVO BASADO EN MICROFLUÍDICA PARA LA MANIPULACIÓN Y LA INSPECCIÓN DE C. ELEGANS**

AUTOR: JOSE ALBERTO CANO CARNERO

TUTOR: ANTONIO JOSÉ SÁNCHEZ SALMERÓN

**Curso Académico: 2018-19**

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres, por todo el apoyo y ayuda que me han brindado, ya que sin ellos no hubiera sido posible llegar hasta aquí. Por otro lado, agradecer a mi tutor toda la ayuda y soporte proporcionados durante el transcurso del presente proyecto y a los técnicos del laboratorio, por la ayuda prestada durante las diferentes pruebas. Por último, agradecer a mis compañeros y a mis amigos por el apoyo proporcionado.

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

---

## **RESUMEN**

El presente trabajo final de master tiene como objetivo el diseño, fabricación y evaluación de un dispositivo para la clasificación de *C. elegans*. Para ello se aborda el concepto de microfluídica, el cual es necesario para llevar a cabo la clasificación mediante microcanales. Dichos dispositivos conocidos como lab on a chip (LOC), integran varias funciones en un espacio muy pequeño, y su uso cada vez es más extendido en campos tales como el estudio y manipulación de células o ADN, debido al gran número de ventajas que proporcionan como la facilidad de uso y manipulación, además de permitir análisis más rápidos, logrando avances los cuales no hubieran sido posibles sin la ayuda de estos dispositivos y la microfluídica.

Se parte desde un estudio inicial de las diferentes opciones existentes, y en base a ello se han propuesto diferentes soluciones. Dichas soluciones se han evaluado tanto en simulación como en prueba experimental con el fin de verificar su correcto funcionamiento y si cumplen con los objetivos establecidos. El estudio se ha realizado con herramientas de simulación como por ejemplo Ansys. A parte del diseño, dicho proyecto también aborda la fabricación y puesta en funcionamiento de un dispositivo, seleccionando los sistemas de bombeo necesarios para su funcionamiento. Finalmente han analizado los diferentes resultados obtenidos.

**Palabras Clave:** Microdispositivos, Microfluídica, Lab on a Chip, *C. elegans*, Visión Artificial, Automatización, Control.

## RESUM

El present treball final de màster té com a objectiu el disseny, fabricació i avaluació d'un dispositiu per a la classificació de *C. elegans*. Per a això s'aborda el concepte de microfluídica, el qual és necessari per a dur a terme la classificació per mitjà de microcanals. Dites dispositives coneguts com lab on a xip (LOC), integren diverses funcions en un espai molt xicotet, i el seu ús cada vegada és més estès en camps com ara l'estudi i manipulació de cèl·lules o ADN, a causa del gran nombre d'avantatges que proporcionen com la facilitat d'ús i manipulació, a més de permetre anàlisi més ràpids, aconseguint avanços els quals no hagueren sigut possibles sense l'ajuda d'estos dispositius i la microfluídica.

Es partix des d'un estudi inicial de les diferents opcions existents, i basant-se en això s'han proposat diferents solucions. Les dites solucions s'han avaluat tant en simulació com en prova experimental a fi de verificar el seu funcionament correcte i si complixen amb els objectius establits. L'estudi s'ha realitzat amb ferramentes de simulació com per exemple Ansys. A part del disseny, el dit projecte també aborda la fabricació i posada en funcionament d'un dispositiu, seleccionant els sistemes de bombament necessaris per al seu funcionament. Finalment han analitzat els diferents resultats obtinguts

**Paraules clau:** Microdispositius, Microfluídica, Lab on a Chip, *C. elegans*, Visió Artificial, Automatització, Control.

## **ABSTRACT**

The objective of the present final work is the design, manufacture and evaluation of a device for the classification of *C. elegans*. For this purpose, the concept of microfluidics is addressed, which is necessary to carry out the classification by means of microchannels. These devices known as lab on a chip (LOC), integrate several functions in a very small space, and its use is increasingly widespread in fields such as the study and manipulation of cells or DNA, due to the large number of advantages they provide such as the ease of use and manipulation. In addition they allow faster analysis, achieving advances which would not have been possible without the help of these devices and the microfluidic.

The starting point is an initial study of the different existing options, and based on this different solutions have been proposed. These solutions have been evaluated both in simulation and in experimental testing in order to evaluate their correct operation and whether they meet the established objectives. The study was carried out using simulation tools such as Ansys. Apart from the design, this project also deals with the manufacture and commissioning of the device, selecting the pumping systems necessary for its operation. Finally, the different results have been analysed.

**Keywords:** Microdevices, Microfluídics, Lab on a Chip, *C. elegans*, Machine Vision, Automation, Control.

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

---

# ÍNDICE

## DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFM

- Memoria
- Presupuesto
- Planos

## ÍNDICE DE LA MEMORIA

1. Introducción .....	1
1.1. Introducción y Objeto del Proyecto .....	1
1.2. Alcance del Proyecto .....	2
2. Estado del Arte .....	3
2.1. Antecedentes de manipulación y monitorización de <i>C. elegans</i> .....	3
2.2. Concepto de Lab on a Chip .....	3
2.3. Concepto de Microfluídica .....	4
2.4. <i>C. elegans</i> .....	8
2.5. Sistemas Existentes .....	10
2.5.1. Dispositivos y técnicas para la inmovilización de <i>C. elegans</i> .....	10
2.5.2. Cultivo de <i>C. elegans</i> .....	12
2.5.3. Dispositivos basados en electrotaxis .....	12
2.5.4. Dispositivo en Y para la clasificación de <i>C. elegans</i> .....	14
2.5.5. Sistema comercial COPAS .....	16
3. Diseño del dispositivo .....	19
3.1. Introducción al Problema .....	19
3.2. Diseño .....	20
3.3. Fabricación .....	22
3.3.1. PDMS.....	22
3.3.2. Impresión 3D.....	23
3.4. Equipos y Materiales necesarios .....	24

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

---

3.4.1.	M9 Buffer .....	24
3.4.2.	Raspberry Pi .....	25
3.4.3.	Cámara .....	26
3.4.4.	OpenCV .....	27
3.4.5.	Bomba NE-300 .....	28
3.4.6.	Bomba Piezoeléctrica SDMP 320 .....	29
3.4.7.	Driver MPD-200A .....	30
3.4.8.	Tubos de conexión .....	31
3.4.9.	Arduino Uno .....	31
4.	Simulación del dispositivo .....	33
4.1.	Introducción .....	33
4.2.	Simulación con Ansys .....	33
4.2.1.	Configuración de los parámetros en Ansys.....	33
4.2.2.	Simulación del dispositivo para <i>C. elegans</i> L1.....	38
4.2.3.	Simulación del dispositivo para <i>C. elegans</i> L4.....	48
4.3.	Simulación con Comsol Multiphysics .....	56
4.3.1.	Configuración de Comsol Multiphysics .....	57
4.3.2.	Resultados.....	61
5.	Programación y puesta en marcha .....	63
5.1.	Programación .....	63
5.1.1.	Configuración y manejo de Raspberry Pi .....	63
5.1.2.	Señales PWM y filtrado .....	65
5.1.3.	Comunicación Arduino-Raspberry .....	69
5.1.4.	Descripción del Código y funcionamiento .....	70
5.2.	Puesta en marcha y montaje .....	76
5.2.1.	Descripción del Montaje .....	77
5.2.2.	Modo de operación.....	80
5.2.3.	Condiciones de operación.....	82
5.2.4.	Configuración del sistema de visión.....	84
6.	Resultados y conclusiones .....	87
6.1.	Resultados .....	87
6.2.	Conclusiones y trabajos futuros .....	90

7. Referencias..... 93

**ÍNDICE DEL PRESUPUESTO**

1. Presupuesto ..... 1  
2. Valoración económica del presupuesto ..... 4

**ÍNDICE DE PLANOS**

1. Plano 1 ..... 1  
2. Plano 2 ..... 2  
3. Plano 3 ..... 3  
4. Plano 4 ..... 4  
5. Plano 5 ..... 5  
6. Plano 6 ..... 6  
7. Plano 7 ..... 7

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

---

DOCUMENTO N°1:

---

MEMORIA

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

---

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETO DEL PROYECTO**

Hoy en día debido al constante desarrollo de la biotecnología, es de vital importancia la capacidad de controlar los diferentes experimentos que se realizan sobre animales en áreas tales como la medicina, la alimentación y la cosmética. Dichos experimentos permiten evaluar infinidad de sustancias con propiedades terapéuticas y/o saludables.

Los *C. elegans* son ampliamente usados en el estudio de diversos campos tales como la neurociencia o para evaluar el efecto de medicamentos, gracias en parte a su simple sistema nervioso y a que su genoma está secuenciado. Además, poseen genes homólogos a los humanos, lo cual permite el estudio de enfermedades degenerativas cuyos resultados en *C. elegans* pueden extrapolarse a los humanos.

Los experimentos llevados a cabo con *C. elegans* requieren de personal experto en la manipulación e inspección de estos pequeños nematodos. Dicho trabajo manual es enorme, ya que cada experimento requiere de cientos de *C. elegans* que deben ser manipulados y monitorizados a diario. Debido a ello, surge la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías de automatización para manipular y monitorizar *C. elegans* en experimentos tan diversos como longevidad (lifespan), crecimiento, ensayo energizante, ensayo de estrés oxidativo agudo, etc.

El presente trabajo se ha desarrollado dentro del contexto del proyecto de investigación CRIBA (UPV-LaFe), cuyo objetivo es diseñar, desarrollar y evaluar nuevos dispositivos capaces de dosificar y separar automáticamente diferentes cepas de *C. elegans* in vivo.

Concretamente, en el presente documento se propone el diseño de un microdispositivo (Lab on a Chip) para la clasificación de *C. elegans* en base a la existencia de fluorescencia o no. El uso de este sistema frente a la manipulación manual, permite la reducción de tiempos aumentando el rendimiento y la evita la necesidad de personal con amplia experiencia, lo cual también reduce la posibilidad de errores y la variabilidad en los resultados.

Se ha tratado de diseñar un dispositivo de reducido tamaño, de bajo coste y fácil de usar, con el fin de facilitar la clasificación de *C. elegans* durante las fases preparatorias de los ensayos. Cabe destacar que en el mercado ya existe un sistema (sistema COPAS) que permite clasificar, sin embargo, su coste es muy elevado para la mayoría de laboratorios que actualmente están investigando con estos nematodos.

## **1.2. ALCANCE DEL PROYECTO**

El alcance del proyecto abarca desde el diseño del propio dispositivo hasta la programación del sistema, además de las diferentes pruebas y el análisis de los resultados con el fin de valorar el rendimiento y determinar si el funcionamiento es correcto o no.

Cabe destacar que previamente al inicio del proyecto se hizo una investigación de los diferentes estudios y sistemas existentes para este propósito, lo cual fue necesario para tener un punto de partida y para valorar qué solución llevar a cabo para el propósito del proyecto. Mencionar que se probaran diferentes diseños en simulación antes de imprimir el dispositivo, con el fin de determinar cuál se comporta mejor tal y como se comentará más adelante.

Por último, en el apartado planos, podrán verse los diferentes planos de los diseños destacables, los cuales si proporcionaron resultados adecuados en simulación, además del plano con el esquema de la interconexión entre los diferentes dispositivos electrónicos necesarios para el funcionamiento del dispositivo.

## CAPÍTULO 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1. ANTECEDENTES DE MANIPULACIÓN Y MONITORIZACIÓN DE *C. ELEGANS*

Actualmente, se están aplicando tecnologías automáticas de micromanipulación y microinspección en diversos sectores como la microfabricación [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9]. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías de automatización en ensayos con *C. elegans* ha empezado a explorarse con gran interés.

Algunos trabajos de investigación realizados para intentar automatizar los procesos de monitorización de los *C. elegans*, son los descritos en [10] [11] y [12]. Además, en los últimos años, están surgiendo alternativas que plantean métodos que discrepan acerca del cultivo de nematodos, como son el uso de micro canales controlados por microfluidos, descritos en las referencias 13 y 14.

### 2.2. CONCEPTO DE LAB ON A CHIP

Los Lab on a chip (LOC), son dispositivos que integran procesos como muestreo, tratamiento, detección y análisis dentro de un dispositivo diminuto, con dimensiones que van desde unos pocos milímetros hasta centímetros [15]. Esto implica un menor consumo de materiales, por lo que reduce el coste además de disminuir el tiempo necesario y permitir su fácil transporte.

A continuación (figura 1), puede verse un ejemplo de LOC, el cual integra varios procesos:

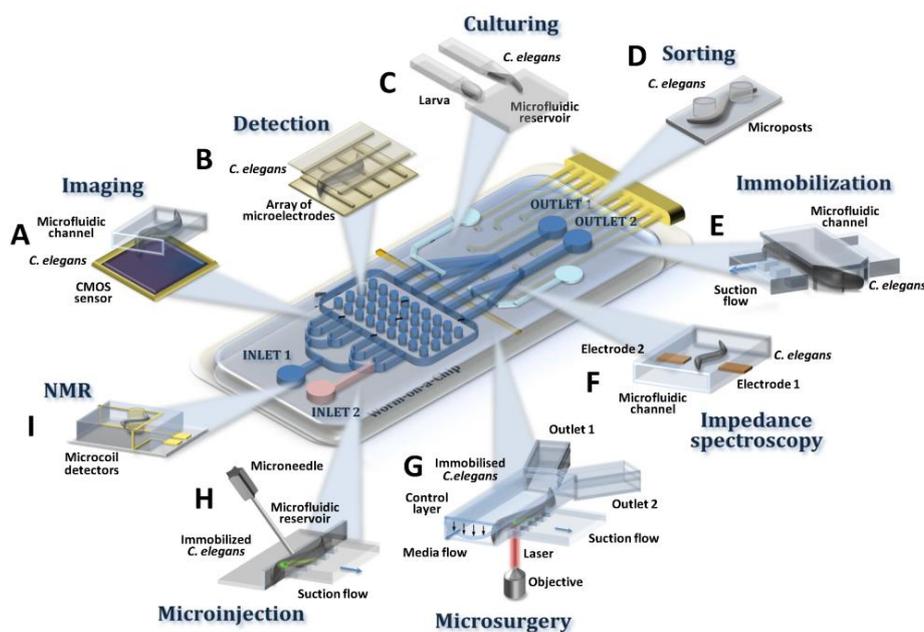


Figura 1: Ejemplo de chip para *C. elegans*. Fuente [16]

Dado su pequeño tamaño, es relevante el concepto de la microfluídica, de la cual se hablará con mayor detalle en el siguiente apartado. En cuanto a sus ventajas, tienen un bajo coste y presentan una alta facilidad de uso. Permiten realizar análisis en menos tiempo y su pequeño tamaño facilita el traslado. Por otro lado, permite la automatización del proceso permitiendo reducir tiempos y posibles errores.

Debido a su versatilidad y al gran número de ventajas que proporcionan, su uso se ha incrementado, siendo utilizado en campos tales como:

- Investigación con ADN
- Microreactores
- Análisis y diagnóstico. En este campo se está tratando de desarrollar pequeños dispositivos que permitan diagnosticar enfermedades infecciosas rápidamente con pocos recursos [17].
- Cultivo, estudio y manipulación de células.

Este último campo resulta de especial importancia para el presente proyecto. De hecho, existen muchas investigaciones recientes en las que se utilizan estos dispositivos junto a la microfluídica para la cría, manejo y estudio de *C. elegans*. En este caso, el uso de estos dispositivos evita el riesgo de dañar el animal, además de que ya no es necesario el uso de mano de obra especializada frente a técnicas de manipulación manual.

La manipulación tradicional de *C. elegans* implica el uso de técnicas donde el rendimiento es bajo corriéndose un alto riesgo de dañar al animal, además de necesitar personal con amplia experiencia, aspectos que son corregidos mediante el uso de dispositivos LOC.

Por último, en cuanto a inconvenientes, destaca la existencia fuerzas capilares. Además, se trata de tecnología todavía en desarrollo. Por otro lado, en algunos casos su fabricación puede complicarse si incluyen pequeñas válvulas, o se trata de sistemas multicapa, además de la necesidad del uso de equipos externos como sistemas de bombeo [15] [18].

### **2.3. CONCEPTO DE MICROFLUÍDICA**

La microfluídica es la disciplina que se encarga del estudio de los fluidos a pequeña escala. Al reducir tamaño, el comportamiento del fluido cambia debido a la pequeña escala. En este caso de acuerdo con González F. [19], las fuerzas de la gravedad e inercia dejan de ser dominantes, pasando a ser predominantes factores como la tensión superficial o la viscosidad.

Al poner al fluido en movimiento, existe una resistencia al esfuerzo aplicado, esta resistencia se conoce como viscosidad ( $\mu$ ) (también nombrada dinámica para diferenciarla de la cinemática). Considérese el caso práctico de dos placas entre las cuales se encuentra un fluido siendo una de ellas fija (figura 2), de acuerdo con [20] [21], al aplicar una fuerza sobre la placa móvil, debido a la condición de adherencia, el fluido en contacto con la capa superior se moverá a la velocidad de esta, mientras que el fluido en contacto con la placa fija permanecerá en reposo. Esto provoca que se genere un gradiente de velocidades, siendo este proporcional al esfuerzo cortante aplicado:

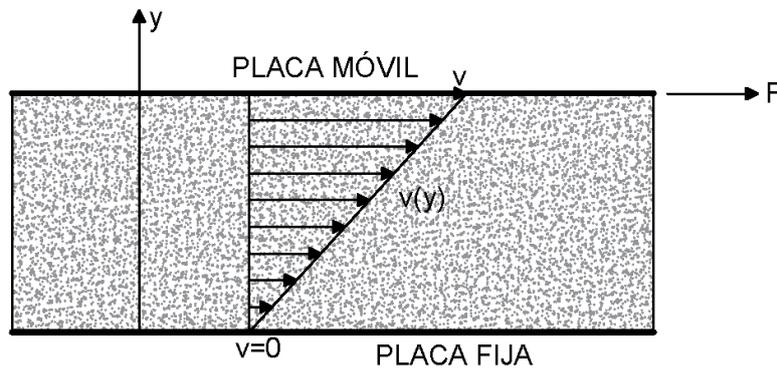


Figura 2: Relación Esfuerzo cortante-Gradiente de velocidades. Elaboración propia.

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (\text{ec. 1})$$

Donde F es la fuerza aplicada y A el área donde se aplica. En cambio, si introducimos la viscosidad, la anterior expresión (ec. 1) se puede reescribir en función de la velocidad (v) y la distancia entre placas (h):

$$\tau = \mu \cdot \frac{v}{h} \quad (\text{ec. 2})$$

De la ecuación anterior (ec.2) obtenemos la viscosidad ( $\mu$ ) mediante:

$$\mu = \frac{\tau}{\left(\frac{v}{h}\right)} \quad (\text{ec. 3})$$

Otro parámetro importante que permite determinar el tipo de flujo, es el número de Reynolds. Dicho parámetro relaciona las fuerzas de inercia y las fuerzas viscosas en un fluido. Se calcula a partir de la densidad ( $\rho$ ), el diámetro (d), la velocidad (v) y la viscosidad ( $\mu$ ) mediante:

$$Re = \frac{\rho \cdot d \cdot v}{\mu} \quad (\text{ec. 4})$$

En función del número de Reynolds podemos caracterizar el flujo de modo que:

Re<2000	Flujo Laminar
2000<Re<4000	Flujo Transición
Re>4000	Flujo Turbulento

Tabla 1 Tipo de flujo en función del número de Reynolds

Para aquellos casos en los que la sección no sea cilíndrica, el diámetro se sustituye por el diámetro hidráulico ( $D_h$ ):

$$D_h = \frac{4 \cdot A}{P_{wet}} \quad (\text{ec. 5})$$

Donde A es la sección transversal y  $P_{wet}$  es el perímetro mojado.

En el caso que se está tratando debido al carácter del flujo y a las reducidas dimensiones de canal, el número de Reynolds será menor a 2000, luego se tratará de flujo laminar como más adelante se mostrará. De hecho, en muchos casos el número de Reynolds llega a ser inferior a 100 [22].

Otro fenómeno que pasa a ser importante es la difusión, mediante la cual, las partículas pasan de zonas de alta concentración a otras con menos concentración [23]. A continuación, se muestra la ecuación que modela este fenómeno en una dimensión:

$$L_d = \sqrt{2 \cdot D \cdot t} \quad (\text{ec. 6})$$

Donde  $L_d$  es la distancia de difusión,  $D$  la constante de difusión y  $t$  el tiempo.

Para determinar la relación entre el transporte por difusión o convección existe el número de Péclet:

$$P_e = \frac{v \cdot L}{D} \quad (\text{ec. 7})$$

Donde  $L$  es la longitud característica,  $D$  la constante de difusión y  $v$  la velocidad. Puesto que normalmente los sistemas microfluídicos presentan pequeñas longitudes (del orden de micras), el número de Péclet suele ser menor a 1, por lo que en estos casos predomina la difusión.

Por otro, destacan los fenómenos de tensión superficial y la capilaridad importantes en la microfluídica, tal y como se ha comentado anteriormente. El primero ocurre debido a las fuerzas de cohesión entre las moléculas del fluido, siendo dicha tensión la energía necesaria para aumentar la superficie del fluido por unidad de área [24] [25]. La capilaridad ocurre como consecuencia de tensión superficial, mediante la cual un fluido puede subir o bajar por un tubo. Subirán aquellos fluidos que mojen el tubo (como el agua), y bajarán por el tubo aquellos que no lo logren. Este fenómeno pasa a ser importante en tubos verticales con diámetros menores a 10 mm [25].

Por último, otro parámetro adimensional destacable es el número Knudsen. Dicho parámetro relaciona la longitud de camino libre promedio molecular y una escala de longitud física representativa [26] [27]. De este modo permite determinar el cambio de comportamiento de los flujos al pasar del medio continuo al estado molecular, por lo que indica la validez de suponer continuidad:

$$K_n = \frac{\lambda}{L} = \frac{k_B \cdot T}{\sqrt{2} \cdot \pi \cdot \sigma^2 \cdot P \cdot L} \quad (\text{ec. 8})$$

Donde  $\lambda$  es el camino medio libre molecular,  $L$  la longitud característica (Longitud del canal o diámetro según el caso),  $k_B$  la Constante de Boltzman ( $1,3806488 \cdot 10^{-23}$  J/K),  $T$  la temperatura (K),  $\sigma$  el diámetro (m) y  $P$  la presión (Pa).

De acuerdo con [27] [28], en función del número Knudsen, se deberá hacer un planteamiento distinto del problema a tratar, aplicando diferentes hipótesis y ecuaciones a cada caso, de este modo existen los siguientes casos:

Kn<0.01	Válida la hipótesis de flujo continuo y análisis mediante Navier-Stokes con la condición de no deslizamiento (no-slip boundary).
0.01<Kn<0.1	<u>Régimen Slip Flow</u> : análisis mediante Navier-Stokes y con la condición de deslizamiento.
0.1<Kn<10	<u>Régimen de Transición</u> : a partir de Kn=0.1 la hipótesis de flujo continuo y el análisis mediante Navier-Stokes comienza a no ser válido.
Kn>10	<u>Régimen libre Molecular</u> : la hipótesis de flujo continuo y análisis mediante Navier-Stokes deja de ser válida por completo.

**Tabla 2 Casos de análisis en función del número Knudsen**

Para agua, el cual es un fluido muy similar al que se utilizará en la práctica (M9 buffer), una buena aproximación es tomar  $\lambda \approx 0.31$  nm de acuerdo con [29]. De este modo aquellos casos con longitud característica mayor a 300nm cumplen sin problema que  $K_N < 0.01$ . En el caso del presente trabajo, dicha condición se cumple perfectamente, luego es válida la condición de no deslizamiento junto con las ecuaciones de Navier-Stokes para el estudio y simulación del dispositivo.

La forma de llevar a cabo el estudio de forma teórica, es mediante las ecuaciones de Navier-Stokes. A partir de la ley de conservación de la masa y la segunda ley de Newton se obtienen las ecuaciones de Navier-Stokes [30] [31], las cuales pueden verse a continuación en notación vectorial para un flujo incompresible y viscoso:

$$\rho \left( \frac{\partial u_i}{\partial t} + u \cdot \nabla u_i \right) = - \frac{\partial p}{\partial x_i} + \mu \Delta u_i + f_\varepsilon^i \quad (\text{ec. 9})$$

$$\nabla \cdot u = 0 \quad (\text{ec. 10})$$

Donde:

-  $\nabla$  es el operador gradiente, siendo este:

$$\nabla = \left( \frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right) \quad (\text{ec. 11})$$

-  $\Delta$ , el operador laplaciano:

$$\Delta = \nabla \cdot \nabla \quad (\text{ec. 12})$$

-  $f_\varepsilon^i$  el termino referido a la fuerza externa,  $f_\varepsilon = (f_\varepsilon^x, f_\varepsilon^y, f_\varepsilon^z)$ .

Para el caso de viscosidad ( $\mu$ ) nula, se llega a las ecuaciones de Euler [32].

Actualmente existe solución solo para unos cuantos casos. Un ejemplo de ello, es el caso de flujo laminar estacionario a través de una tubería (Ley de Poiseuille) [33], mediante la cual la velocidad es máxima en el centro y nula en las paredes. Dicha ley es muy importante en el campo de la hemodinámica (ec. 13):

$$Q = \frac{\pi \cdot R^4}{8 \cdot \mu \cdot L} \cdot \Delta P \quad (\text{ec. 13})$$

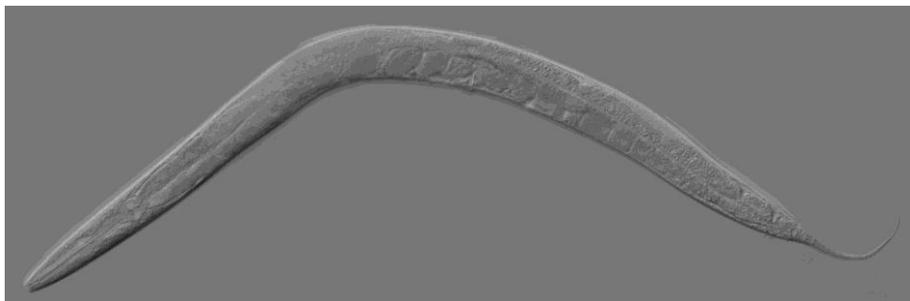
Donde  $\mu$  es la viscosidad, L la longitud a lo largo del conducto, R el radio y  $\Delta P$  la diferencia de presión en los extremos.

Se adoptan como hipótesis para la resolución mediante programas CFD, la condición de no deslizamiento (velocidad del fluido en la pared nula), y flujo continuo de acuerdo con las hipótesis sobre el número de Knudsen.

Una vez descritos los diferentes parámetros y conceptos destacables para la microfluídica, resulta interesante mencionar las diferentes ventajas que proporciona el uso de la microfluídica. De acuerdo con San Miguel A *et al* [34], la microfluídica nos proporciona una serie de ventajas tales como un bajo número de Reynolds, lo cual permite que el flujo sea laminar, por lo que el flujo es fácilmente controlable y predecible. Por otro lado, al utilizar pequeños dispositivos, la relación área volumen es elevada, lo que permite una rápida transferencia de calor y masa, siendo esta muy eficiente. Además, el volumen de líquido necesario es menor, lo cual permite reducir el coste.

#### 2.4. C. ELEGANS

El *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es una especie de nematodo, no peligroso y no parasito que suele habitar en zonas templadas y húmedas [35]. Tal y como se ha mencionado en la introducción, los *C. elegans* son muy utilizados en investigación, siendo empleados en campos tales como el estudio de enfermedades degenerativas, pruebas de fármacos o alimentación [36] [37].



**Figura 3: Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) Adulto. Fuente [38]**

Desde su establecimiento en la década de 1960 como organismo modelo por Sydney Brenner [39], su uso ha crecido considerablemente llegando a desbancar en algunos casos a otros como la mosca del vinagre o los ratones tal y como se indica en [38], debido en parte a su gran simplicidad y al gran número de ventajas que proporciona, tales como su transparencia o que poseen uno de los sistemas nerviosos más simples, además de estar completamente caracterizado. Cabe mencionar que, debido a su rápido ciclo de vida, de entre 2 y 3 semanas [35], permite obtener resultados con mayor rapidez ya que los efectos aparecen antes que en otros sujetos de estudio.

De acuerdo con Bakhtina *et al* [16], pueden llegar a tener una longitud de hasta entre 1 y 1.2 mm y un ancho de 80  $\mu\text{m}$  en fase adulta. Su cuerpo es transparente y se alimentan

principalmente de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*). Se trata de un organismo hermafrodita, aunque existe un pequeño porcentaje de individuos masculinos.

A lo largo de su ciclo de vida pasan por cuatro fases larvales (L1-L4) antes de llegar a la fase adulta. A continuación (figura 4), puede verse la transición entre las diferentes etapas junto con el tiempo de duración de cada una de ellas, siendo el tiempo total de este proceso de dos a tres semanas:

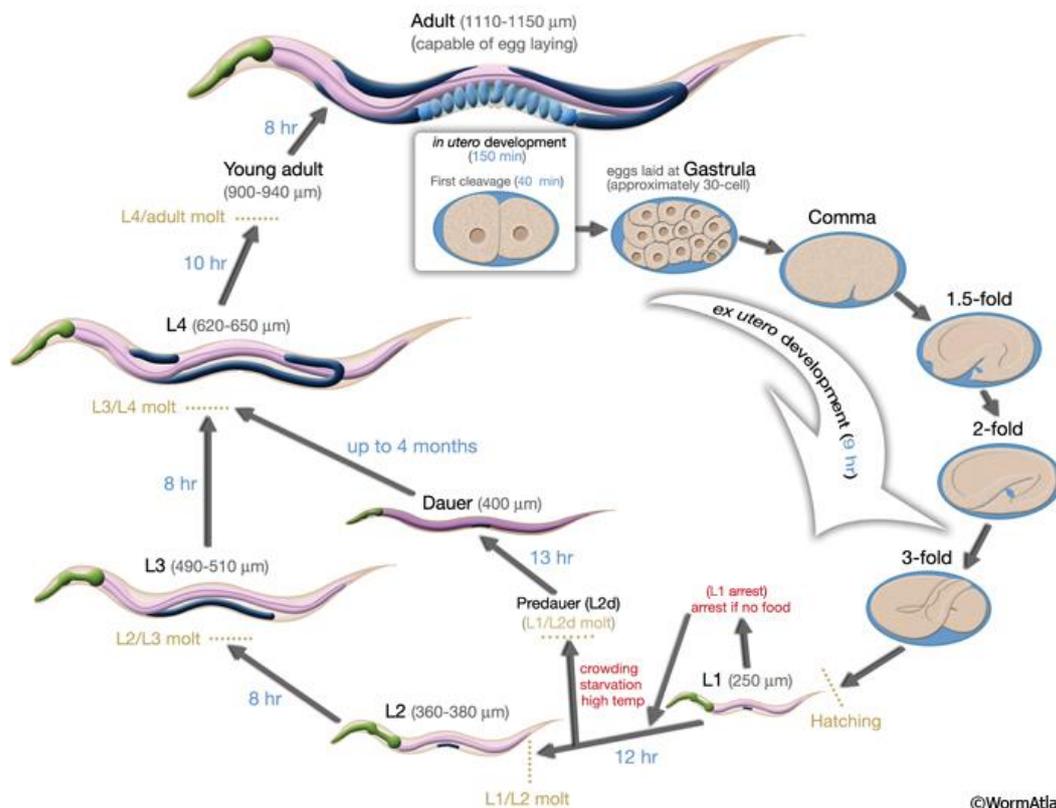
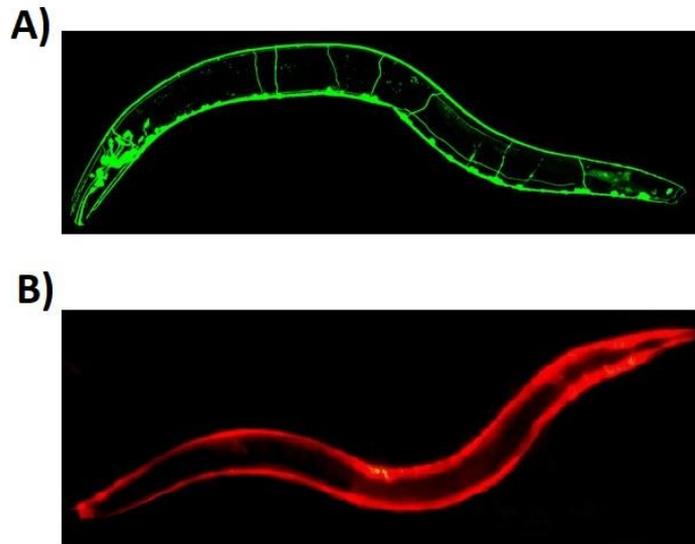


Figura 4: Ciclo de vida de los *C. elegans*. Fuente [40]

Observando la imagen, destaca que a partir de la fase L1, pueden tomar dos caminos diferentes en función del entorno [41]. En el caso de abundancia de alimentos y reducida densidad de población, los gusanos L1 continúan a la fase L2. Sin embargo, en el caso de escasez de alimentos y exceso de población, entran en una fase alternativa conocida como “dauer” o de hibernación, en la cual pueden permanecer varios meses hasta que las condiciones mejoren, pasando después a la fase L4. Los gusanos de la fase L1 tienen una longitud de hasta 250  $\mu\text{m}$  y un ancho de entre 15 y 18  $\mu\text{m}$  [40] [42]. En cambio los gusanos en fase L4 tienen una anchura entre 60 y 80  $\mu\text{m}$  [40] [43], siendo este último parámetro vital para el diseño del ancho de los canales.

Por otro lado, los *C. elegans* y los humanos comparten numerosos genes, de hecho el 40% de los genes de los *C. elegans* tienen un homólogo en los humanos [16]. Dicho aspecto permite por ejemplo, el estudio de un gran número de enfermedades en humanos con *C. elegans*, ya que su genoma está completamente secuenciado. Dicho aspecto junto a su simplicidad, permite generar modificaciones genéticas más fácilmente, introduciendo por ejemplo la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) (figura 5A) con el objetivo de monitorizar la actividad de

determinadas neuronas [44] o bien la proteína mCherry (figura 5B) [92], la cual es de importancia en el presente proyecto.



**Figura 5: A) Expresión proteína GFP, fuente [39]. B) Expresión mCherry, fuente [92]**

Por último, los *C. elegans* van investigando su entorno y se mueven de acuerdo a los estímulos que perciben. Dichos seres responden a estímulos tales como:

- Temperatura
- Químicos como metales pesados o antibióticos
- Electricidad: si se someten a los *C. elegans* a un campo eléctrico, estos tienden a moverse hacia el polo negativo.
- Luz
- Sensibilidad a gases tales como oxígeno, nitrógeno y CO<sub>2</sub>.

## 2.5. SISTEMAS EXISTENTES

Tradicionalmente los *C. elegans* se han manipulado manualmente incrementando los tiempos y la dificultad, aumentando el riesgo de fallos. Además, en muchos procesos era necesario el uso de pegamentos o anestésicos para inmovilizar los *C. elegans*, lo cual podía dañar a estos. El uso de microfluídica junto a los Lab on a chip, ha permitido acelerar la manipulación.

A continuación, se van a mencionar diferentes sistemas existentes, los cuales han servido como base para proponer una solución al problema a resolver en el presente proyecto. Normalmente aquellos dispositivos diseñados y fabricados en laboratorio, suelen estar fabricados de PDMS (Polidimetilsiloxano). En cuanto a los sistemas comerciales, destaca el Copas Biosorter, del cual también se hablará en el presente apartado.

### 2.5.1. Dispositivos y técnicas para la inmovilización de *C. elegans*

La necesidad de inmovilización surge cuando, por ejemplo, se requiere obtener imágenes precisas con el fin de realizar un mejor análisis o para estudios tales como neurología, en los

cuales es necesario la monitorización de la actividad de una o varias neuronas. De este modo destacan las siguientes técnicas y dispositivos:

**-Compresión:** aprovecha la flexibilidad del PDMS. En dispositivos de dos capas, por acción de la presión, el canal superior se deforma, por lo que realiza presión sobre el canal inferior, inmovilizando el gusano contra las paredes del mismo. A continuación, puede verse una imagen donde se detalla el proceso:

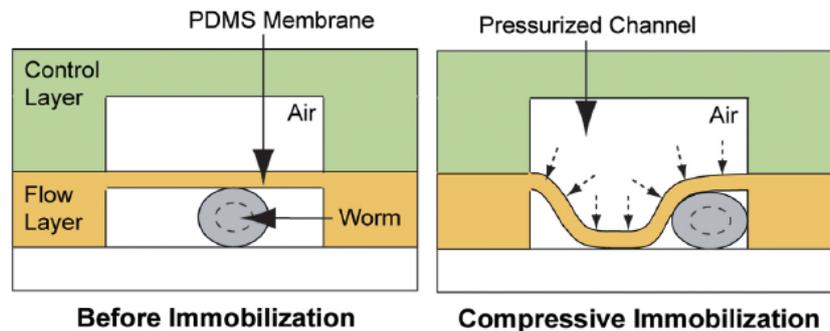


Figura 6: Inmovilización por presión. Fuente [45]

**-Restricción física:** en este caso, el dispositivo cuenta con un canal el cual se va estrechando a medida que el gusano va avanzando (figura 7), de modo que va quedando atrapado. Para liberarlos se puede invertir el flujo o inyectar presión en el canal.

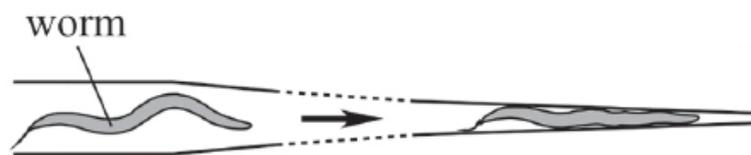


Figura 7: Inmovilización por restricción física. Fuente [45]

**-Por enfriamiento:** permite inmovilizar por completo al sujeto. Se introduce un flujo en una cámara adyacente hasta reducir la temperatura a 4°C, permitiendo así inmovilizarlos [45] [46]. Cabe destacar que solo se pueden mantener a esta temperatura durante aproximadamente 2 segundos.

**-CO<sub>2</sub>:** en este caso se inyecta CO<sub>2</sub> en una canal adyacente, el cual por difusión pasa a través de la membrana de PDMS llegando a los gusanos. Mediante este método se pueden llegar a inmovilizar hasta 2 horas de acuerdo con [45]. A continuación, puede verse un esquema simple de funcionamiento:

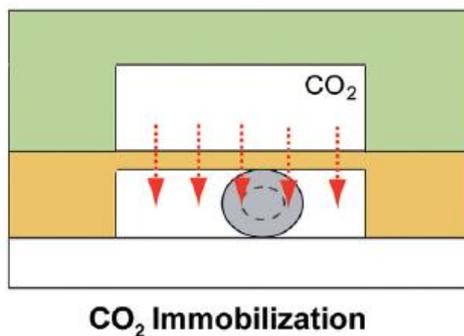


Figura 8: Inmovilización mediante  $CO_2$ . Fuente [45]

**-Electricidad:** tal y como se ha comentado en un apartado anterior, los *C. elegans* tienden a moverse hacia el polo negativo al ser sometidos a un campo eléctrico. Además, si la magnitud del campo es lo suficientemente grande puede llegar a inmovilizarlos [47].

### 2.5.2. Cultivo de *C. elegans*

Para el cultivo de *C. elegans* en la mayoría de casos los individuos son introducidos sobre una superficie sólida de agar. Para ello previamente se han cultivado bacterias (*E. coli*), las cuales servirán de alimento a los *C. elegans*. Dichos dispositivos permiten además de cultivar *C. elegans*, monitorizar su ciclo de vida completo.

A continuación, puede verse un ejemplo de dispositivo (figura 9), en el cual se generan una especie de “corrales” cultivados previamente con bacterias que sirven de alimento. Tras esto los embriones son introducidos en dichos corrales, en los cuales se irán desarrollando y creciendo:

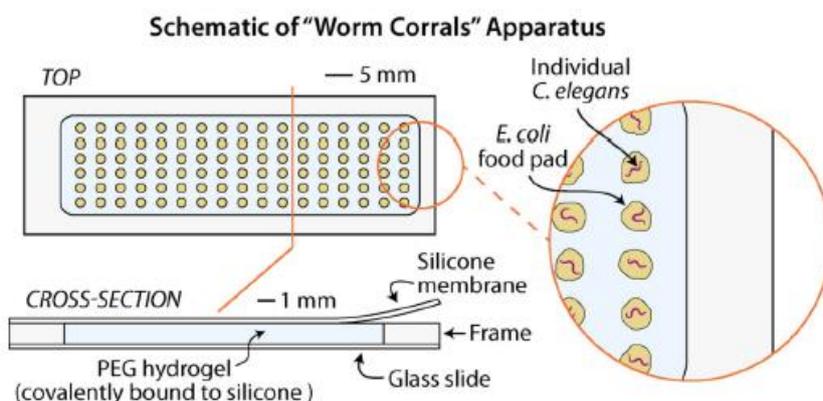


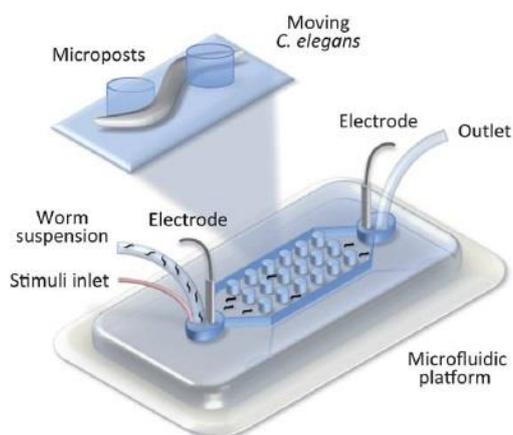
Figura 9: Sistema para el cultivo de *C. elegans*. Fuente [48]

### 2.5.3. Dispositivos basados en electrotaxis

De acuerdo a lo indicado anteriormente, los *C. elegans* al ser sometidos a un campo eléctrico, tienden a moverse hacia el polo negativo. Dicha característica ha sido utilizada en diferentes estudios y dispositivos, forzando a dichos individuos a moverse a hacia la dirección deseada.

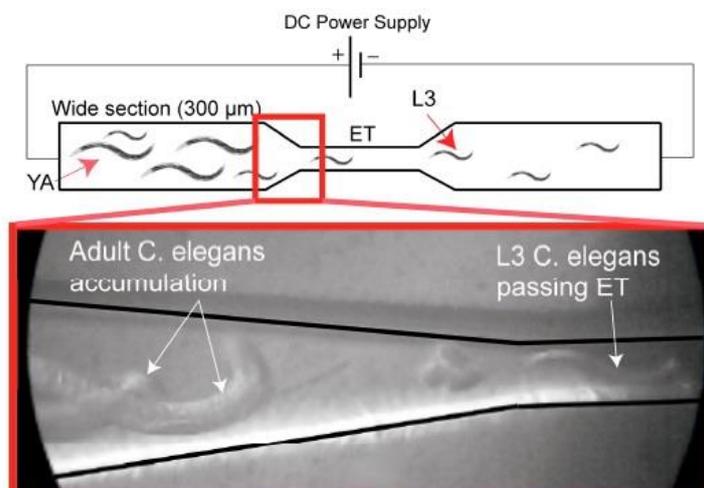
En el primero de ellos [47], los gusanos se someten a un campo eléctrico generado por dos electrodos. Los gusanos se van distinguiendo por su movimiento, permitiendo diferenciar entre adultos y fases anteriores, además de distinguir entre individuos sanos y no sanos. Sin embargo,

tal y como sugiere Bakhtina *et al.* [47], el principal inconveniente es que se trata de un método lento y no presenta un alto rendimiento, lo cual es un inconveniente si se desea un estudio de corta duración, además impide el trabajo con grandes poblaciones. Se propone como valores de campo entre 3,5 y 7 V/cm. A continuación, se muestra una imagen del sistema:



**Figura 10: Dispositivo basado en electrotaxis. Fuente [47]**

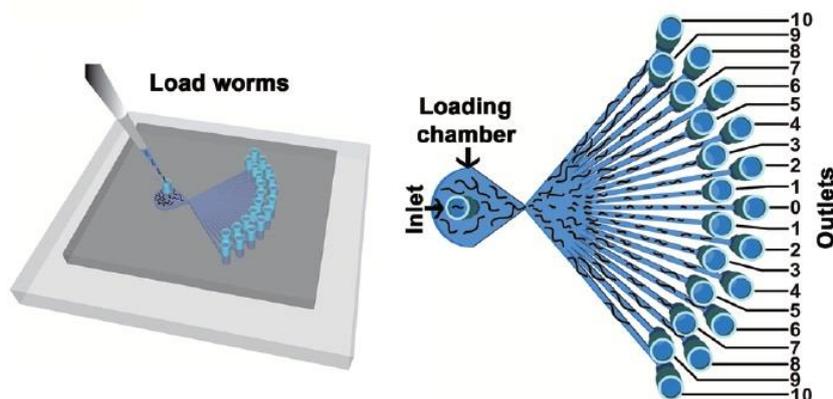
A continuación, se muestra una simplificación del anterior sistema, el cual aplicando un voltaje de 16,8 V permite separar *C. elegans* L3 del resto:



**Figura 11: Dispositivo para separar *C. elegans* L3 mediante electrotaxis. Fuente [49]**

Por otro lado destaca el siguiente sistema, el cual es muy similar a los anteriores, sin embargo en este caso aprovecha el hecho de que al aplicar un campo eléctrico, los *C. elegans* se desplazan desde el ánodo al cátodo con un ángulo de desviación proporcional a la magnitud del campo aplicado. De hecho, dicho ángulo de inclinación es diferente según en la etapa en la que se encuentran, incluso bajo el mismo campo eléctrico.

De acuerdo con Wang *et al.* [50], el dispositivo propuesto consiste en canales simétricos con ángulos que varían entre  $-50^\circ$  y  $50^\circ$  tal y como se muestra en la figura 12:



**Figura 12: Separación mediante electro taxis a partir del ángulo. Fuente [50]**

De este modo, el sistema permite separarlos en función de la etapa en la que se encuentran. Por otro lado, de acuerdo con [50], se indica que el campo necesario para afectar a los más pequeños es mayor que el necesario para los grandes. Con una magnitud de entre 6 y 10 V/cm, es posible guiar a los L2 y adultos a los canales correspondientes. En cambio, para distinguir entre los *C. elegans* L2 y L3, es necesario una magnitud de 10 V cm<sup>-1</sup>.

Cabe destacar que, en todos los casos, una excesiva magnitud de campo eléctrico puede provocar que los *C. elegans* queden inmovilizados impidiendo su movimiento, lo cual resulta útil como técnica de inmovilización, tal y como se ha visto anteriormente.

#### **2.5.4. Dispositivo en Y para la clasificación de *C. elegans***

El siguiente dispositivo propone la clasificación individuos en dos diferentes tipos sin necesidad de inmovilización, usando fibra óptica para su detección, evitando de este modo la posibilidad de provocar daños a los sujetos.

Variando las presiones y los flujos de entrada de los canales de control, es posible dirigir los gusanos hacia una salida u otra en función de si presentan fluorescencia, sin necesidad de válvulas, lo cual simplifica notablemente el diseño, permitiendo así extender la vida útil del dispositivo, además de reducir su coste.

Consta de 9 canales, de los cuales A, B y C van variando la presión y los flujos del sistema con presiones  $P_A$ ,  $P_B$  y  $P_C$  respectivamente. Los conductos D y E son las salidas por las cuales abandonan los gusanos el sistema en función del tipo. Por último, los conductos F, G, H e I son los que alojan la fibra óptica necesaria para la detección. A continuación, puede verse un esquema del sistema:

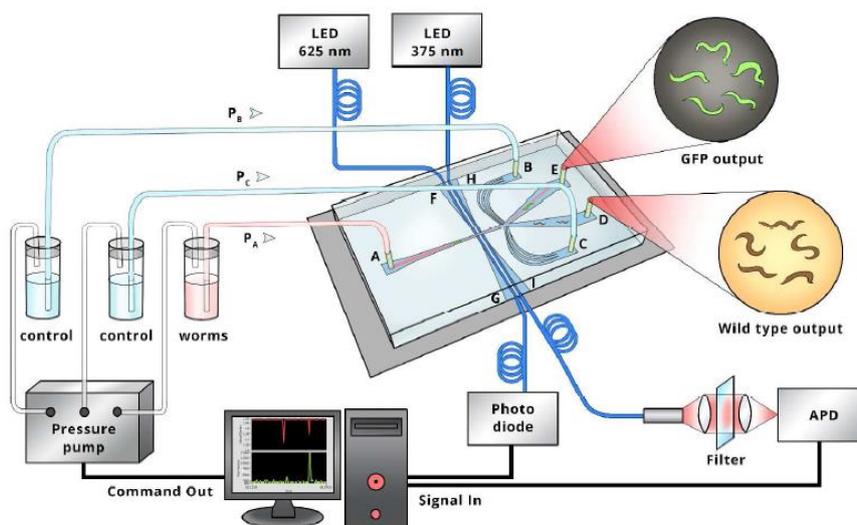


Figura 13: Sistema de clasificación en Y por presión. Fuente [51]

Tal y como puede verse en la figura, los gusanos entran por la entrada A. En función del tipo mediante las entradas B y C, se varía la presión y el flujo en dichas entradas manteniendo la de A constante, generando una diferencia de presión ( $\Delta P = P_B - P_C$ ). De este modo se fuerza a que los flujos que tienen un comportamiento laminar, discurran o bien por el conducto D o el E en función de la situación.

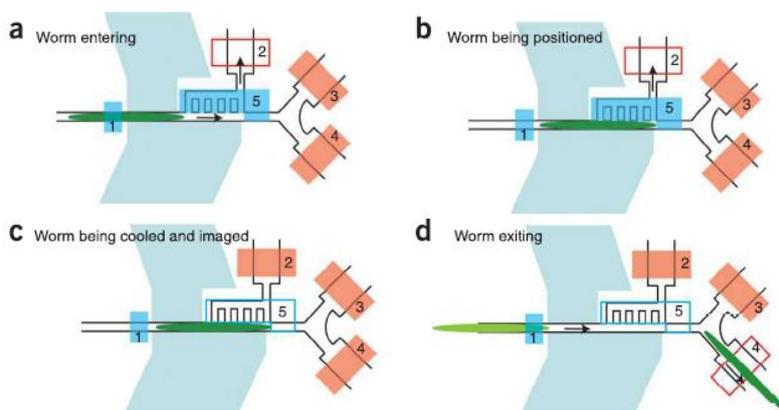
De acuerdo con Yan *et al.* [51], las presiones por defecto son  $P_B = 20 \text{ mBar}$  y  $P_C = 0 \text{ mBar}$ . La presión en A puede ser cambiada para variar el caudal. En caso de detectar otro tipo (fluorescente), las presiones cambian a  $P_B = 0 \text{ mBar}$  y  $P_C = 20 \text{ mBar}$ . En cuanto a la velocidad de operación, con una velocidad de  $3 \text{ mm/s}$ , las bombas y la toma de imágenes pueden operar sin problemas. Sin embargo, con flujos altos ( $10 \text{ mm/s}$ ), es probable que el sistema pueda llegar a saltarse algún gusano.

Por último, indicar que el sistema puede alcanzar una precisión de clasificación del 96,6%, lo cual hace que sea un sistema con una alta precisión.

Cabe destacar que dicho sistema ha sido el que más ha influido en el diseño del dispositivo del presente proyecto.

Otro sistema similar al anterior es el propuesto por Chung *et al.* [52], sin embargo, dicho sistema emplea válvulas en lugar de generar una diferencia de presión para el control de los gusanos, enviándolos de este modo por una salida u otra, en función del tipo mediante la apertura y cierre de válvulas.

El procedimiento descrito en [58] es el siguiente. Mediante un flujo constante de entrada se introduce el gusano en el dispositivo. Tras eso es inmobilizado bajando la temperatura, mientras se toman imágenes de él. Posteriormente, dichas imágenes son analizadas y en función del caso, el gusano es enviado por una salida u otra mediante las válvulas.



**Figura 14: Sistema de clasificación basado en válvulas. Fuente [52]**

Los elementos numerados de 1 a 5 son las válvulas. Cabe destacar que el uso de válvulas plantea una serie de problemas técnicos los cuales se detallarán en el apartado 3. Al igual que el caso anterior, presenta una alta precisión (96.5 %).

### 2.5.5. Sistema comercial COPAS

A diferencia de los sistemas anteriores los cuales han sido diseños y fabricados en laboratorio para un solo uso mediante PDMS, el sistema Copas se trata de un sistema comercial.

Desarrollado por Union Biometrica, permite automatizar el proceso permitiendo clasificar en varios tipos atendiendo a aspectos visuales, pudiendo clasificar hasta 50 muestras por segundo. A continuación (figura 15), puede verse un modelo del sistema de clasificación (Copas FP):



**Figura 15: Copas Biosorter. Union Biometrica. Fuente [53]**

De acuerdo con [54], permite clasificar muestras de entre 10 y 1500 micras con cuatro modelos de dispositivos diferentes. Dicha clasificación se realiza atendiendo a 5 variables, tamaño, densidad óptica y tres colores diferentes de fluorescencia, los cuales se corresponden con las proteínas GFP (verde), YFP (amarillo) Y DsRed (rojo).

El proceso comienza con el paso de los individuos axialmente a través del dispositivo [54], siendo enfocados por un láser de 488nm o incluso 2 o tres láseres de forma opcional. La señal resultante

es detectada por un fotodiodo y por tres filtros pasa banda, detectando hasta tres longitudes de onda, los cuales detectan los tres tipos de fluorescencia mencionados anteriormente. A continuación, se muestra un esquema de los diferentes sensores que incluye:

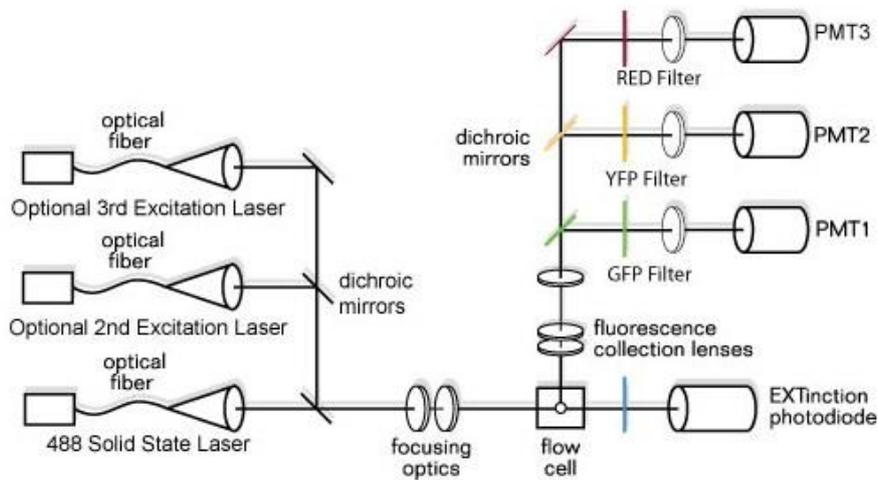


Figura 16: Inmovilización por presión. Fuente [53]

El tamaño se determina a partir del tiempo que hay bloqueo de luz por encima de un cierto valor establecido (tiempo de vuelo TOF). La densidad óptica se determina a partir de la intensidad de luz bloqueada.

Por otro lado, una vez identificado el tipo, una corriente de aire a presión envía al individuo a su lugar correspondiente. En cambio, si no cumplen con ningún criterio son desechados. En la siguiente figura (figura 17), puede verse el esquema de funcionamiento:

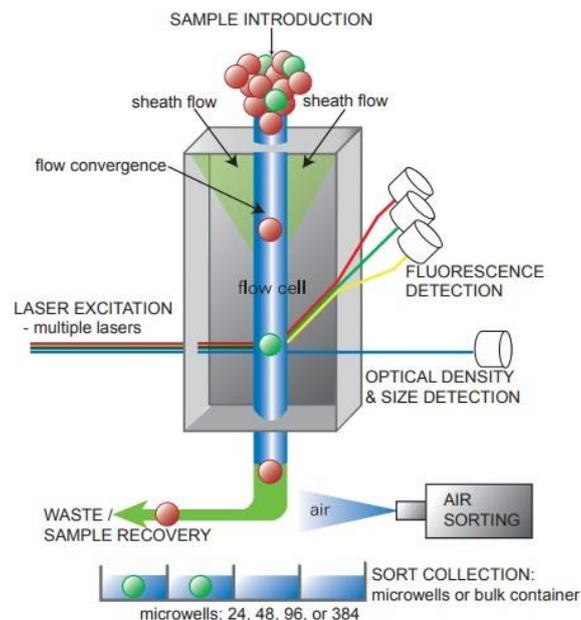


Figura 17: Principio Funcionamiento sistema Copas. Fuente [55]

Como principal inconveniente destaca su elevado coste, lo cual no lo hace viable para la gran mayoría de laboratorios que trabajan con *C. elegans*. Por otro lado, de acuerdo con Rezai *et al.*

[49], el sistema Copas no permite realizar una clasificación atendiendo a otros criterios que no sean visuales, lo cual impide por ejemplo clasificar *C. elegans* en función de su comportamiento, lo cual resulta un inconveniente si se desean valorar otros aspectos en la clasificación.

Cabe destacar que para la aplicación que se está desarrollando sería válido, sin embargo, debido a su elevado coste, se ha optado por el diseño de un dispositivo de bajo coste y fácil uso, de modo que facilite su uso en investigación además de abaratar costes.

## **CAPÍTULO 3. DISEÑO DEL DISPOSITIVO**

### **3.1. INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA**

Tal y como se ha comentado al comienzo de la presente memoria, se desea separar *C. elegans* en función de si presentan fluorescencia o no, para ello se propone el diseño de un dispositivo que permita automatizar el proceso, reduciendo tiempos y posibles errores humanos. En este caso la fluorescencia a analizar es mCherry (color rojo). Cabe destacar que, debido a que fue imposible la obtención de este tipo de *C. elegans*, se optó por intentar clasificarlos enviando los gusanos pares por una salida y los impares por la otra.

Previamente al diseño, fue necesario realizar una investigación sobre los diferentes estudios y artículos existentes, con el fin de obtener un punto de partida. De todos ellos el sistema que más ha inspirado al diseñado en el presente proyecto, es el que se encuentra disponible en [51]. Tal y como se ha comentado en el apartado 2.5.4 del presente documento, se trata de un diseño en Y, en el que mediante detectores de fibra óptica se detecta el tipo y mediante una serie de canales de presión, se fuerza al gusano a salir por una salida u otra.

Una vez obtenida una idea global, se propone el sistema a diseñar. Partiendo de la idea descrita anteriormente, se opta por un diseño en Y. Para hacer la distinción entre un tipo u otro, se opta por implementar un sistema de visión artificial mediante una Raspberry Pi y la librería OpenCv, de la cual se hablará con mayor detalle en adelante. En este caso una vez detectado el tipo, mediante una diferencia de presión y caudal, los gusanos saldrán por una salida u otra.

A continuación (figura 18), puede verse una imagen del dispositivo finalmente diseñado:



**Figura 18: Dispositivo fabricado. Fuente propia**

Una posible alternativa al uso de bombas y diferencias de flujos, podría haber sido el uso de la electrotaxis. Cerrando el circuito hacia una salida u otra, podría haberse guiado a los gusanos según el tipo, hacia una u otra. Como principal inconveniente de esta alternativa, es que se trata de un método lento. Además, no es posible trabajar con grandes poblaciones, ya que la

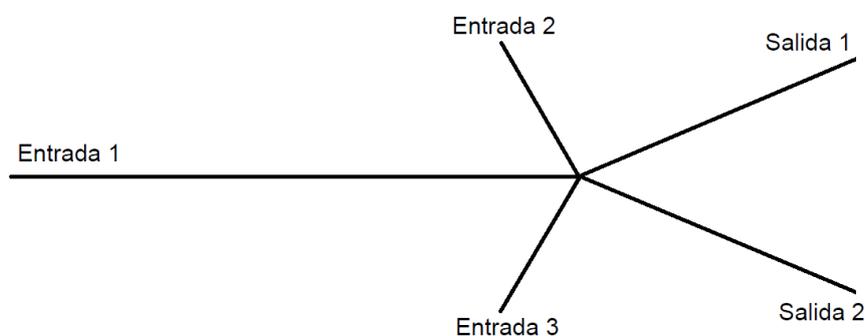
clasificación depende en gran medida de lo separados que se encuentren los gusanos, por lo que finalmente esta alternativa fue descartada.

En primer lugar se plateó el diseño para *C. elegans* L1, validando los diseños en simulación. Sin embargo su puesta en práctica no fue posible con la tecnología de microfabricación disponible. Tras esto, todo lo desarrollado para *C. elegans* L1, se extrapola para el diseño de un dispositivo que permitiera trabajar con *C. elegans* L4, el cual si fue posible fabricar. De este modo en los siguientes capítulos, se mostrará el diseño para *C. elegans* L1 junto a su validación en simulación y el diseño para *C. elegans* L4, junto con las pruebas tanto en simulación como en la realidad.

### 3.2. DISEÑO

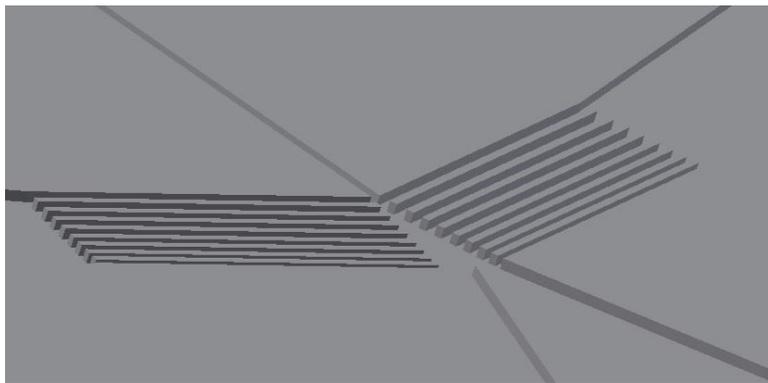
El diseño del dispositivo ha consistido en un proceso iterativo. Partiendo de una idea inicial, se han ido realizando modificaciones en función de los resultados obtenidos en simulación mediante Ansys Fluent, con el fin de lograr el comportamiento deseado. Además, como resultado de dichas simulaciones, se han podido determinar los valores de caudal y presión necesarios para el correcto funcionamiento del dispositivo.

Tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, se opta por un diseño en Y. Los gusanos son introducidos por la entrada 1. Cuando estos llegan a la intersección, dos entradas de presión y flujos controlables (entradas 2 y 3), fuerzan a los gusanos a salir por la salida 1 o 2 en función del tipo. Cabe destacar que se hará el control mediante la variación de los caudales, puesto que en microfluídica es mucho más recomendable que trabajar con presiones. A continuación (figura 19), puede verse un esquema simplificado de las diferentes entradas y salidas:



**Figura 19: Esquema entradas-salidas del dispositivo. Fuente propia**

Los canales encargados de generar la diferencia de presión y flujos (entradas 2 y 3) que envían a los gusanos por una salida u otra, se encuentran dispuestos en diagonal. En el caso del diseño para L1, debido a sus reducidas dimensiones y con el objetivo de evitar que los *C. elegans* salgan por estos canales cuando la presión y el flujo son muy elevados, se han dividido en canales más pequeños de entre 30 y 15 micras. A continuación, puede verse una imagen del plano 1, donde pueden apreciarse dichos canales:



**Figura 20: Detalle canal de presión dispositivo para L1. Fuente propia**

En cuanto a la forma de los canales, se ha optado por canales rectangulares, porque es más conveniente a la hora de trabajar con la impresora 3d, ya que a esta le resulta más fácil crear superficies prismáticas que circulares, obteniendo mayor precisión con la primera.

Por otro, lado a la hora de dimensionar los canales, ha sido necesario tener en cuenta las dimensiones de los *C. elegans*, junto con los resultados que se han ido obteniendo en simulación. De este modo en el diseño para *C. elegans* L1, se ha partido desde una entrada de 2,6 mm, hasta llegar a canales de 30 micras. Se ha optado por 30 micras, para permitir el movimiento de los sujetos e impedir que puedan llegar a pasar dos a la vez, ya que su diámetro puede llegar hasta los 18  $\mu\text{m}$ . En el caso del diseño para *C. elegans* L4, partiendo de una entrada de 1,8 mm, se va reduciendo hasta el ancho del canal, el cual en este caso es de 360 micras. Estas mayores dimensiones de microcanales permiten su fabricación con tecnologías de impresión 3D, abaratando muchísimo los costes de su fabricación.

Cabe mencionar que, con el fin de facilitar el proceso de visión, los canales quedan al descubierto, siendo sellada la cara superior por cinta adhesiva transparente.

En cuanto al sistema de bombeo, se opta por la bomba de jeringa NE-300 para introducir los *C. elegans* dentro del dispositivo microfluídico. En el caso de las bombas necesarias para generar la diferencia de presión y flujos, se utilizan las bombas piezoeléctricas SDMP 320 de Takasago Electric. Ambos tipos de bombas se detallarán en el apartado 3.4.

Como alternativa al uso de bombas para controlar el flujo, en varios artículos se propone el uso de válvulas con el fin de controlar el paso de los *C. elegans*. Sin embargo, dicha metodología aumenta la complejidad del dispositivo, además de aumentar el riesgo de fallo debido a la existencia de partes móviles y por lo tanto fatiga de materiales. Por otro lado la presencia de dichas válvulas, limita el número de actuaciones que pueden realizar en un tiempo determinado, debido al tiempo de actuación necesario, reduciendo por tanto el número de seres que pueden clasificarse. En chips de PDMS, dichas válvulas suelen fabricarse también de este material. En este caso la complejidad de la fabricación se incrementa considerablemente.

En el caso del presente proyecto, el sistema que se pretende diseñar debe ser lo más simple posible, por lo que se ha preferido evitar el uso de válvulas, controlando el paso de los gusanos mediante dispositivos de bombeo, lo cual simplifica la fabricación del dispositivo.

### 3.3. FABRICACIÓN

A continuación, se van a mencionar las dos tecnologías de fabricación más utilizadas, de las cuales una es la que finalmente se utiliza en el presente proyecto.

#### 3.3.1. PDMS

El PDMS (Polidimetilsiloxano) es un polímero orgánico inerte e inocuo, lo que lo hace ideal para su uso en laboratorio [34] [56]. Ha sido ampliamente usado en la fabricación de chips microfluidos.

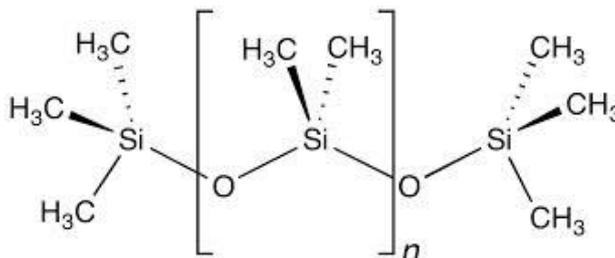


Figura 21: Fórmula Estructural PDMS. Fuente [56]

Es transparente, por lo que permite visualizar los procesos que se llevan a cabo en el chip. Además, es permeable a gases, lo cual permite el cultivo en estos dispositivos. Por otro lado es flexible, lo que permite fabricar válvulas y chips de doble capa, los cuales son utilizados por ejemplo para inmovilizar *C. elegans* tal y como se vio en un apartado anterior.

Se adhiere fácilmente a materiales como el vidrio, por lo que permite dejar una parte descubierta la cual es tapada por este último.

Los chips de PDMS suelen fabricarse a partir de moldes hechos mediante litografía, aunque también pueden fabricarse a partir de un molde impreso en 3D (figura 22).

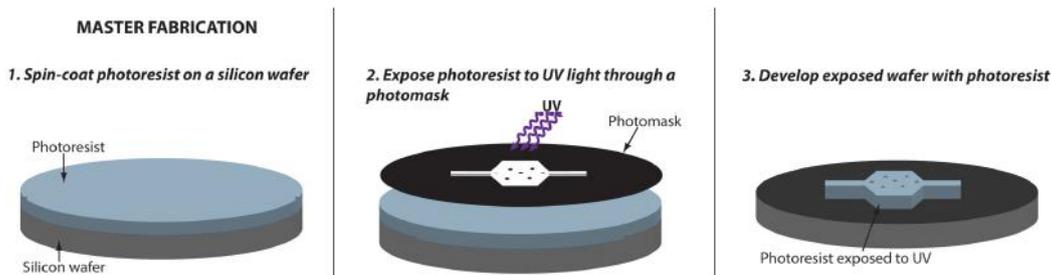


Figura 22: Proceso fabricación del molde. Fuente [57]

En un principio se plateó fabricar el dispositivo mediante PDMS, sin embargo, esta idea se descartó ya que implicaba disponer de material y equipos específicos para poder fabricarlo, lo cual incrementaba excesivamente el precio al no disponer de ellos. De acuerdo con San-Miguel *et al* [57], sería necesario equipos tales como un equipo de litografía por haz de electrones (para fabricar molde), cámara vacío, grabador de plasma, etc. A continuación (figura 23), puede verse una imagen que describe el proceso simplificado para la fabricación:

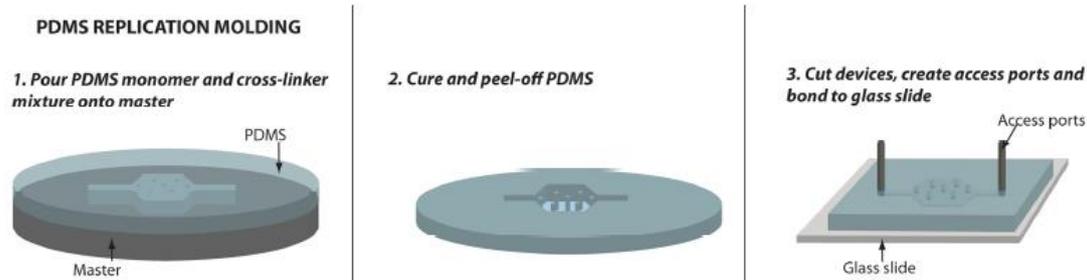


Figura 23: Proceso fabricación mediante PDMS. Fuente [57]

Para mayor detalle del proceso de fabricación tanto del molde como del chip mediante PDMS, se puede consultar la referencia 57.

### 3.3.2. Impresión 3D

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la fabricación mediante PDMS implicaba disponer de una serie de equipos específicos, lo cual incrementaba excesivamente el precio. De este modo, se ha optado por la fabricación mediante impresión 3D, debido al hecho de que las dimensiones del dispositivo no eran excesivamente pequeñas y la técnica lo permitía.

Tras numerosas pruebas en simulación, se fue redefiniendo un modelo 3D, obteniendo finalmente el diseño final. Una vez definido el diseño, mediante un software de diseño CAD (Autodesk Inventor), se creó un modelo 3D en formato stl, el cual fue el enviado para su impresión.

Tal y como se comentó en el apartado 3.1, en un principio se planteó el diseño *C. elegans* L1. Sin embargo, su fabricación no fue posible con la tecnología disponible, por lo que todo lo desarrollado se utilizó para diseño de un dispositivo para *C. elegans* L4, cuyo modelo fue el que finalmente se fabricó.

A la hora de la fabricación, surgieron dos posibles alternativas, el uso de una impresora Objet Stratasys mediante la técnica Polyjet y material VeroClear, o bien el uso de otra impresora más económica y como material el PLA. La principal ventaja que presentaba el VeroClear era su transparencia y la posibilidad de llegar a medidas de micras, sin embargo, su coste era elevado.

Finalmente se optó por la segunda opción puesto que era una técnica mucho más económica y por lo tanto se pudieron fabricar más prototipos. Además, la primera implicaba enviar el diseño a una fuente externa, por lo que el coste se incrementaba considerablemente. Cabe mencionar que la impresión del dispositivo microfluídico fue llevada a cabo por unos colaboradores del Instituto de Automática e Informática industrial (ai2) en el Politécnico di Bari (Italia).

La impresora finalmente utilizada fue la Ultimaker 3 (figura 24), la cual puede verse a continuación:



**Figura 24: Ultimaker 3. Fuente [58]**

Como principales características destacan su doble extrusor, lo cual permite reducir tiempos, además de permitir imprimir en varios colores si se desea. Por otro lado, tiene una resolución de capa entre 20 y 200 micras (boquilla de 0.4 mm) y una precisión (x, y, z) de 12.5, 12.5, 2.5 micras [58], lo que la hace bastante precisa junto con su bandeja de impresión con sistema de nivelación automático. Respecto a la conectividad incluye conexión WiFi, Ethernet y Usb, además de integrar una cámara de video.

Por otro lado, el material usado es el PLA. El ácido poliláctico (PLA), es un polímero termoestable biodegradable fabricado con materiales renovables tales como el trigo, maíz, productos ricos en almidón, etc [59]. Es resistente a la humedad, rayos UV y a la grasa. Sus aplicaciones van desde la industria del empaquetado (bolsas, recipientes, etc), textil y médica, siendo esta última de importancia para el presente proyecto.

### **3.4. EQUIPOS Y MATERIALES NECESARIOS**

A continuación, se van a describir los materiales y equipos necesarios para llevar a cabo la clasificación.

#### **3.4.1. M9 Buffer**

El fluido a utilizar para la manipulación en el dispositivo es M9 (M9 buffer). Dicho fluido es ampliamente utilizado para la manipulación y lavado de *C. elegans* [60], [61]. Consiste en una mezcla de sales, de modo que está compuesto por:

- 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 5 g  $\text{NaCl}$
- 1 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$

Dichas sales se añaden a 1 litro de agua, y posteriormente se esteriliza mediante un autoclave.

En cuanto a sus propiedades, tiene una densidad de  $1 \text{ g/cm}^3$  y una viscosidad de  $1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  [62], por lo que posee características similares al agua, lo cual permite realizar la simulación con agua.

### 3.4.2. Raspberry Pi

Se trata de un ordenador de pequeñas dimensiones y bajo coste desarrollado en Reino Unido. En torno a esta placa existe una gran comunidad, y debido a su gran versatilidad, existe un gran número de proyectos en campos tales como robótica, domótica, entretenimiento, etc.

Fue ideada en el 2006 y su desarrollo estuvo a cargo de un grupo de la Universidad de Cambridge con el objetivo de fomentar la enseñanza de informática en la escuela [63] [64]. En 2009 fue fundada la Raspberry Pi Foundation, con el objetivo de promover y acercar la informática a todo el mundo. Pese a su pronto desarrollo, no fue lanzada al mercado hasta el año 2012. Actualmente se encuentra disponible la Raspberry Pi 4 modelo B, la cual ha supuesto un cambio significativo en potencia y rendimiento respecto a modelos anteriores.

Para llevar a cabo todo el proceso de visión y realizar el control del sistema de bombeo, se ha optado por usar una Raspberry Pi 3 Model B v1.2, de las cuales se disponían varias unidades en el laboratorio (figura 25).



Figura 25: Raspberry Pi 3 Model B v1.2. Fuente [element14.com](http://element14.com)

Con respecto al modelo anterior (Raspberry Pi 2 Model B), mantiene el procesador Quad Core, pero pasa de 900 MHz a 1.2GHz. Por otro lado, destaca la inclusión de conectividad Wi-Fi y Bluetooth. A continuación, puede verse una tabla resumen con las principales características de este modelo:

<b>Procesador</b>	<b>1.2GHz Quad-Core ARM Cortex 64Bit</b>
<b>Memoria</b>	1Gb
<b>GPU</b>	Broadcom VideoCore IV @ 400 MHz
<b>Pines</b>	40 GPIO
<b>Conectividad Red</b>	Puerto RJ-45 10/100Mbps
	Wi-Fi 802.11bgn / Bluetooth 4.1
<b>Conectividad</b>	4 puertos USB 2.0, HDMI
	Puerto CSI para cámara
	Puerto DSI para la pantalla táctil

Tabla 3: Características Raspberry Pi 3B v1.2. Fuente [65]

Tal y como se ha mencionado la Raspberry Pi será la encargada de efectuar el proceso de visión. La parte de actuación sobre las bombas será llevada a cabo por un Arduino Uno, siempre comandado por la Raspberry Pi, la cual le indicará mediante la activación de diferentes señales digitales, el punto de funcionamiento en el que deben trabajar las bombas, según si el gusano detectado presenta fluorescencia o no.

Cabe destacar que se ha optado por esta solución, puesto que como se verá en el apartado 3.4.7, los drivers que hacen funcionar a las bombas necesitan una entrada analógica que indica el punto de funcionamiento de cada bomba y una onda cuadrada a una determinada frecuencia, por lo que en total serían necesarias 3 señales PWM. Para la Raspberry Pi y C++, existe una librería llamada Wiring Pi [66], la cual permite manejar señales PWM y digitales en Raspberry Pi. Tras numerosas pruebas y con ayuda de documentación [66] [67], se descubrió que no era factible generar más de dos señales PWM con Raspberry Pi. De hecho, al intentar generar dos señales PWM en un mismo tipo de pin (PWM 0 ó PWM 1), se producía un conflicto y únicamente mantenía la última configuración indicada, es decir la última señal especificada. A continuación (figura 26), pueden verse los diferentes tipos de pines de Raspberry Pi:

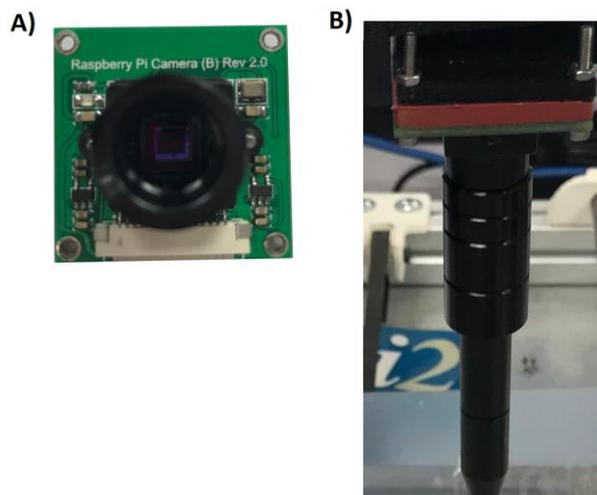
Alimentación 3v3	1	2	Alimentación 5v
BCM 2 (SDA)	3	4	Alimentación 5v
BCM 3 (SCL)	5	6	Masa
BCM 4 (GPCLK0)	7	8	BCM 14 (TXD)
Masa	9	10	BCM 15 (RXD)
BCM 17	11	12	BCM 18 (PWM0)
BCM 27	13	14	Masa
BCM 22	15	16	BCM 23
Alimentación 3v3	17	18	BCM 24
BCM 10 (MOSI)	19	20	Masa
BCM 9 (MISO)	21	22	BCM 25
BCM 11 (SCLK)	23	24	BCM 8 (CE0)
Masa	25	26	BCM 7 (CE1)
BCM 0 (ID_SD)	27	28	BCM 1 (ID_SC)
BCM 5	29	30	Masa
BCM 6	31	32	BCM 12 (PWM0)
BCM 13 (PWM1)	33	34	Masa
BCM 19 (MISO)	35	36	BCM 16
BCM 26	37	38	BCM 20 (MOSI)
Masa	39	40	BCM 21 (SCLK)

Figura 26: Referencia Pines GPIO Raspberry Pi. Fuente [67]

Finalmente debido a lo anterior, se optó por el uso de una placa Arduino para la actuación sobre los drivers de las bombas, la cual no tiene limitación para generar este tipo de señales.

### 3.4.3. Cámara

Para llevar a cabo la parte de visión, se ha optado por la cámara Raspberry Pi Camera (B) Rev. 2.0, la cual puede verse en la figura 27 junto a los diferentes acoples y la óptica pin-hole utilizada para poder llegar a ver el canal del microdispositivo:



**Figura 27: Raspberry Pi Camera (B) Rev. 2.0. A) Sin acoples. B) Con los acoples en la posición de montaje. Fuente Propia**

De acuerdo con [68], dispone de una resolución de 5 megapíxeles. Además de permitir grabar a 1080p y 30fps. Dada su construcción, permite graduar fácilmente el enfoque pudiéndose añadir lentes y acoples para ver zonas más pequeñas, como es el caso del presente proyecto.

Adicionalmente, con el fin de evitar desajustar la otra cámara y grabar más fácilmente la distribución de los flujos tintados al comprobar el funcionamiento, se optó por usar la Raspberry Pi Camera Rev 1.3 (figura 28), de las cuales había varias unidades en el laboratorio.



**Figura 28: Raspberry Pi Camera Rev 1.3. Fuente [69]**

De acuerdo con [69], dispone de un módulo OmniVision 5647 de 5 megapíxeles. Además de permitir grabar a 1080p y 30fps o a 720p y 60fps. En este caso, para su enfoque se debe ajustar con ayuda de unas pinzas tal y como podrá verse en el apartado 5.2.4.

#### **3.4.4. OpenCV**

Open CV (Open Source Computer Vision Library) se trata de una librería Open Source de visión artificial. Dispone de un gran número de funciones las cuales permiten la detección e identificación de objetos, análisis y tratamiento de imágenes, captura en tiempo real, etc [70].

Actualmente se encuentra disponible la versión 4.1.1, sin embargo, dicha versión es demasiado pesada para la Raspberry, por lo que se opta por la versión 3.2.0, la cual es suficiente para el proyecto a desarrollar.

OpenCV tiene interfaces con lenguajes de programación tales como C++, Python o Java. En este caso se usará la interfaz con C++.

En el caso del presente proyecto, OpenCV se usará para detectar la presencia de gusanos con fluorescencia para su posterior separación del resto. Para mayor detalle de la forma de proceder y las funciones utilizadas consultar el apartado 5.1.4. *Descripción del Código y funcionamiento.*

### 3.4.5. Bomba NE-300

Para la entrada 1 se ha optado por la bomba NE-300 (figura 29). Dicha bomba es la encargada de introducir a los *C. elegans* dentro del dispositivo.



**Figura 29: Bomba NE-300. Fuente [71]**

Consta de un motor paso a paso el cual empuja al émbolo de la jeringa, la cual se encuentra colocada en la parte superior. Por otro lado, la bomba se programa de forma manual una vez se realiza la carga de la jeringuilla, lo cual es ideal, puesto que el caudal de entrada va a ser constante. Únicamente variará tras realizar una carga de *C. elegans* en la jeringa, en el caso de que se desee una mayor tasa a través del dispositivo. A continuación (Tabla 4), pueden verse algunas de sus características:

Tamaño Jeringas	Desde 1 hasta 60 ml
Alimentación	12V DC
Tipo Motor	Paso a Paso
Pasos por Revolución	400
Máxima Tasa Permitida	1257 $\mu\text{l}/\text{min}$   20,95 ml/min
Mínima Tasa Permitida	0,73 $\mu\text{l}/\text{h}$   1,216e-5 ml/min

**Tabla 4: Características Bomba NE-300. Fuente [71]**

Tal y como puede verse en la Tabla 4, la bomba es capaz de llegar a caudales muy bajos, lo cual hace que se adecuada para el presente proyecto, ya que el caudal de entrada mínimo al dispositivo es de 0,534 mL/min.

En cuanto a la jeringa a utilizar, puesto que el caudal de entrada es muy bajo, no se tomó la más pequeña puesto que implicaría hacer más cargas de *C. elegans* que con una más grande. Por otro lado, tampoco se optó por una excesivamente grande, puesto que a pesar de que reduciría el número de cargas, implicaría que el caudal mínimo que proporciona sea mayor, por lo que finalmente se optó por la jeringuilla BD-10. De este modo, conocido el caudal de entrada y la capacidad, es posible determinar el tiempo de descarga, para cada uno de los casos a analizar experimentalmente:

$$\text{Caso 1: } t = \frac{\text{Capacidad (ml)}}{\text{Caudal (ml/min)}} = \frac{10}{0,534} = 18,73 \text{ min (ec. 14)}$$

$$\text{Caso 2: } t = \frac{\text{Capacidad (ml)}}{\text{Caudal (ml/min)}} = \frac{10}{1,22} = 8,2 \text{ min (ec. 15)}$$

### 3.4.6. Bomba Piezoeléctrica SDMP 320

En el caso de las entradas 2 y 3, se ha optado por usar dos bombas piezoeléctricas SDMP 320 de Takasago Electric. Dichas bombas son las encargadas de generar la diferencia de caudales necesaria, para forzar a que los gusanos salgan por una salida u otra, en función del tipo. A continuación (figura 30) puede verse una imagen de dicha bomba:



Figura 30 Bomba SDMP 320. Fuente [72]

Dichas bombas incluyen un elemento piezoeléctrico, el cual al ser sometido a una diferencia de tensión, cambia de tamaño. De este modo, mediante su contracción y dilatación, y actuando sobre un diafragma y unas válvulas de EPDM, se produce la absorción y bombeo del fluido. A continuación, puede verse una imagen detalle que muestra el interior de la bomba piezoeléctrica:

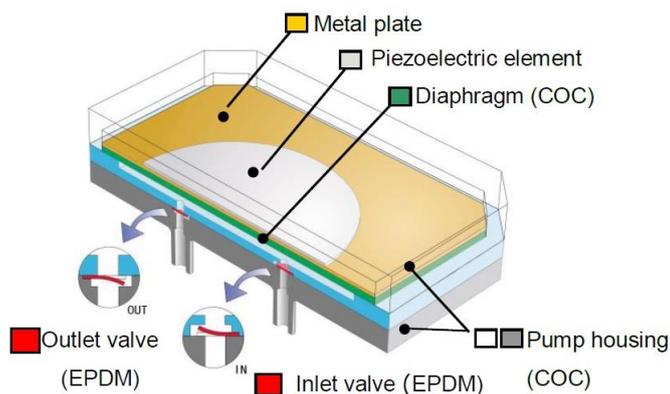


Figura 31: Descripción funcionamiento bomba piezoeléctrica. Fuente [72]

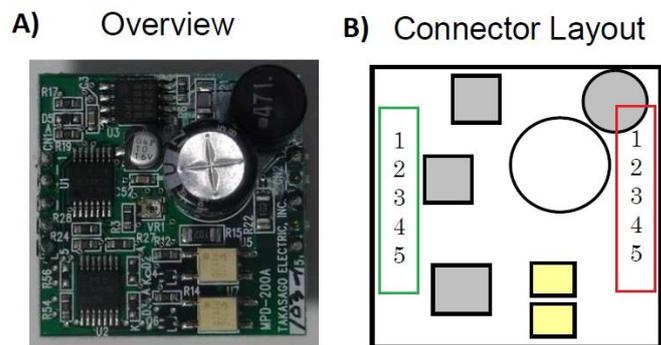
La bomba SDMP 320, presenta unas dimensiones reducidas (33x33x5.5 mm), lo cual facilita su fácil integración en el sistema. Por otro lado, proporciona hasta 35 kPa y 20 mL/min de presión y caudal respectivamente, cumpliendo así con los requisitos de caudal y presión máximos ( $Q_{max}=19,2$  mL/min y  $P_{max}=8000$  Pa para L1 y 400 Pa para L4). Cabe destacar que esta bomba no incluye materiales metálicos en la zona de contacto con el líquido, lo que evita la posible oxidación y contaminación del fluido. Además presenta un consumo muy bajo (en torno a 32

mW a 40Hz y 250 V), lo cual la hace ideal para pequeñas aplicaciones, como es el caso del presente proyecto.

Para su funcionamiento son necesarios voltajes de entre 50 y 220 V, por lo que es necesario el uso de un driver que proporcione dichos voltajes, además de generar la forma de onda apropiada para su correcto funcionamiento.

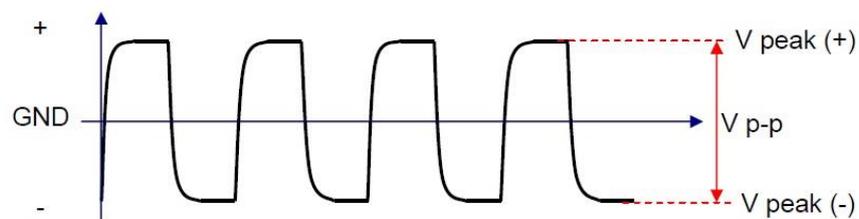
### 3.4.7. Driver MPD-200A

Tal y como se ha comentado es necesario un driver que genere las tensiones necesarias para el funcionamiento de la bomba. En este caso se opta por el driver MPD-200A (figura 32), de Takasago Electric, el cual es apto para su uso con este tipo de bombas.



**Figura 32: Driver MPD-200A. A) Vista general driver. B) Disposición pines driver, en verde los de entrada y en rojo los de salida. Fuente [73].**

Dicho driver se encarga de generar el voltaje y la forma de onda necesaria, la cual presenta la siguiente forma:



**Figura 33: Onda estándar Takasago Electric. Fuente [72]**

Tal y como se puede ver en la imagen 32 B, posee diferentes pines de entrada y salida, con diferentes funciones, los cuales pueden verse con mayor detalle en la siguiente tabla:

Nº de Entrada	Función	Nº Salida	Función
1	<b>VDD:</b> Fuente de Alimentación. 5V	1	<b>Salida (-)</b> : Conexión con cable negro bomba
2	<b>V<sub>in</sub>:</b> Voltaje que regula el caudal de salida de la bomba. Entre 0,2 y 4,5 V	2	Sin conexión
3	<b>Enable:</b> -A On apaga la bomba -A Off o sin conexión mantiene bomba encendida	3	<b>GND,</b> sin conexión
4	<b>F<sub>in</sub>:</b> Entrada de frecuencia. Debe ser una señal cuadrada entre 0 y 5V	4	Sin conexión
5	<b>GND:</b> Masa	5	<b>Salida (+):</b> Conexión con cable rojo bomba

**Tabla 5 Descripción Entradas y Salidas Driver MPD-200A [73]**

Tal y como se menciona en la documentación [73], el caudal de salida de la bomba puede ser modificado, variando la frecuencia mediante  $F_{in}$  y el voltaje mediante  $V_{in}$ . En el caso del presente proyecto, se opta por fijar la frecuencia de trabajo en 40Hz y variar el voltaje para ir variando el punto de funcionamiento, según el tipo de sujeto detectado. Cabe destacar que la entrada Enable, quedará desconectada, ya que en esta configuración, la bomba quedaría a On.

#### 3.4.8. Tubos de conexión

En el presente proyecto se han utilizado dos tipos de tubo diferentes. El primero de ellos, es el tubo flexible RS PRO PVC de diámetro externo 6 mm e interno 3 mm, el cual es usado para hacer la conexión entre la jeringa y el chip.

Por otro lado, para la conexión entre las bombas piezoeléctricas y el microdispositivo, y para las salidas del chip, se optó por el tubo flexible Saint-Gobain Tygon® S3-B-44-3, con 2,4 y 4 mm de diámetro interno y externo respectivamente. Cabe destacar que este tubo cuenta con certificación para su uso en industria alimentaria, además de ser fácilmente lavable.

#### 3.4.9. Arduino Uno

Se trata de una plataforma de desarrollo de hardware libre de bajo coste, basada en una placa electrónica con un microcontrolador programable. Consta de numerosos pins para la comunicación entre este y los diferentes sensores, actuadores, etc [74]. Dispone de su propio entorno de desarrollo (Arduino IDE), siendo su código de acceso libre, lo que permite crear todo tipo de aplicaciones, de ahí su gran popularidad en la cultura “*maker*”, existiendo numerosos proyectos con Arduino, en campos tales como domótica, robótica, DIY (“Do it yourself”), etc [75].

Surgió como proyecto Open Source para estudiantes de un instituto de Italia en 2005, con el fin de disponer de un dispositivo de bajo coste para su uso en clase. Posteriormente el instituto cerró, pero el proyecto prosiguió, abriendo el proyecto al público.

Tal y como se ha comentado, se trata de un proyecto de hardware libre, por lo que existen un gran número de placas de otros fabricantes basadas en Arduino, cuyas características son

similares. De hecho, un gran número de esquemas PCB de las placas se encuentran disponibles y accesibles a cualquiera.

En el caso del presente proyecto, se va hacer uso de la placa Elegoo Uno R3 (figura 34), la cual posee las mismas características que la placa Arduino Uno R3, siendo su coste muy inferior al modelo fabricado por Arduino.

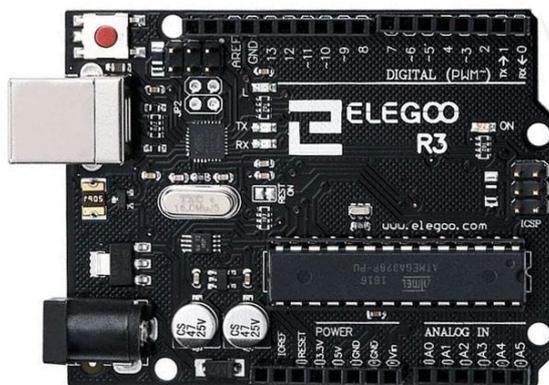


Figura 34: Elegoo UNO R3. Fuente Amazon.es

A continuación (Tabla 6), puede verse una tabla resumen con las principales características de esta placa:

<b>Microcontrolador</b>	ATmega328P
<b>Voltaje Operación</b>	5 v
<b>Voltaje de Entrada</b>	7-12 v (limites 6 - 20 v)
<b>Entradas Analógicas</b>	6
<b>Entradas/Salidas Digitales</b>	14, 6 permiten salida PWM
<b>Memoria Flash</b>	32 kB
<b>SRAM</b>	2kB
<b>EEPROM</b>	1 kB
<b>Frecuencia de Reloj</b>	16 MHz

Tabla 6 Características Arduino/Elegoo Uno R3. Fuente [76].

Tal y como se ha indicado anteriormente, esta placa es la encargada de generar las señales analógicas y la de frecuencia. Cabe destacar que para generar las señales analógicas, es necesario el uso de señales PWM, las cuales se detallarán en el apartado 5.1.2.

## **CAPÍTULO 4. SIMULACIÓN DEL DISPOSITIVO**

### **4.1. INTRODUCCIÓN**

Actualmente gracias a las herramientas de simulación, es posible realizar múltiples pruebas y modificaciones, lo cual evita la necesidad de fabricar un gran número de prototipos, reduciendo de este modo significativamente el coste. Además, nos permite realizar tantas simulaciones como se deseen permitiendo probar múltiples configuraciones, reduciendo tiempo y coste.

En el caso del presente proyecto, se van a utilizar como software de simulación Ansys Fluent y Comsol Multiphysics.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el diseño ha consistido en un proceso iterativo, en el cual se ha ido modificando el diseño con el objetivo de obtener el comportamiento deseado en simulación, de modo que sea altamente probable que funcione correctamente en la realidad.

Cabe destacar que se va a simular solo con el volumen interior del chip, con el fin de simplificar y reducir el coste computacional. También con el objetivo de reducir la complejidad, se simulará que las entradas son a través de superficies verticales con un ancho igual al diámetro de la entrada original. Por último, indicar que se realizaron infinidad de pruebas, por lo que en los sucesivos subapartados se mostrarán únicamente, los resultados más relevantes con el fin de no alargar excesivamente la extensión del presente apartado.

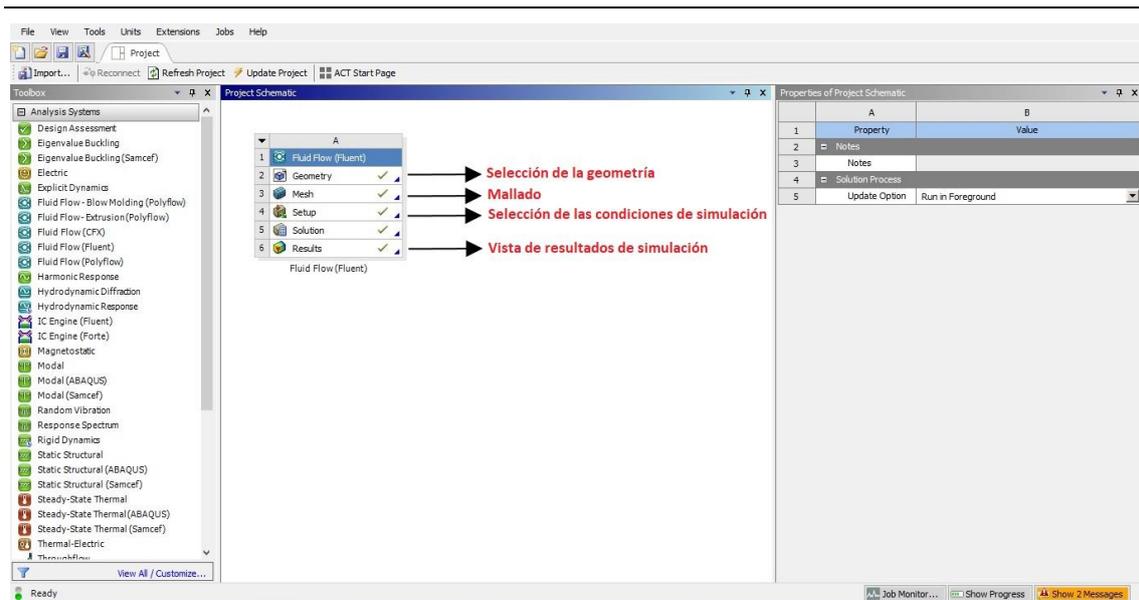
### **4.2. SIMULACIÓN CON ANSYS**

A continuación se va a mostrar tanto los diferentes pasos y parámetros para la configuración de Ansys Fluent como los resultados obtenidos en simulación. Cabe destacar que para su uso se ha consultado el manual de referencia de Fluent [77].

#### **4.2.1. Configuración de los parámetros en Ansys**

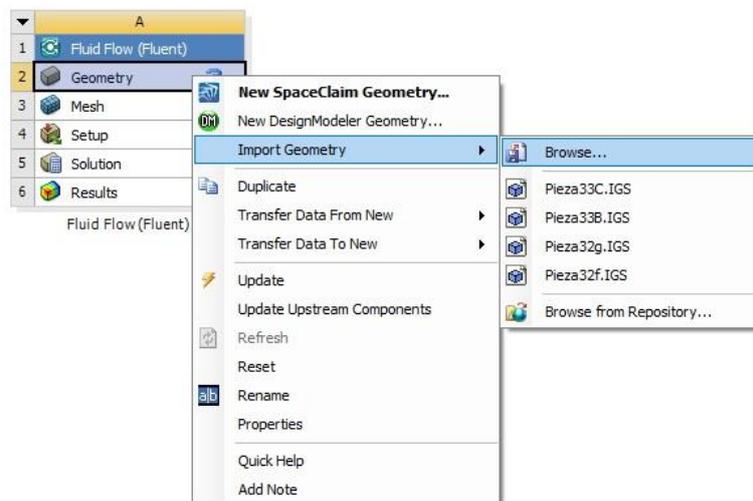
En primer paso es seleccionar el tipo de proyecto a utilizar, en este caso Fluent. A continuación, puede verse como quedaría la vista de proyecto, con una breve descripción de las diferentes partes de este:

## Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*



**Figura 35: Vista de Proyecto Ansys Fluente. Fuente Propia**

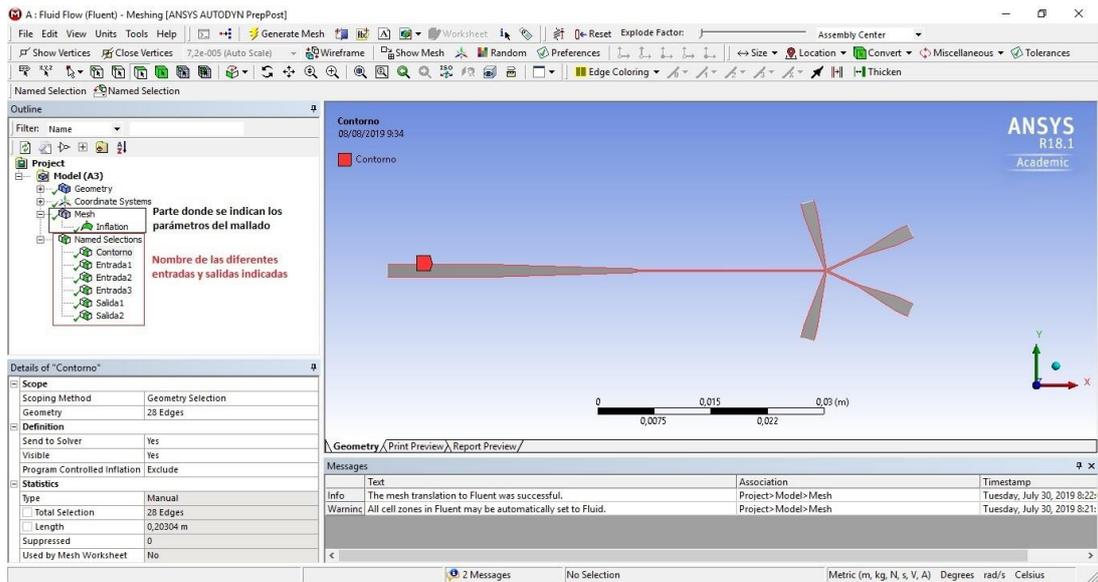
Una vez especificado que se va a utilizar Fluent, el siguiente paso es indicar la geometría (figura 36). Con el fin de reducir el coste computacional y poder realizar un mayor número de pruebas, se va a realizar la simulación de una sección plana del volumen interior, es decir se hará una simulación 2D. Para ello, a partir del plano 2D de la pieza en formato *dwg*, con ayuda de SolidWorks, se creará una superficie plana en formato *igs*, reconocible por Ansys.



**Figura 36: Selección de la geometría. Fuente Propia**

Tras importar la geometría, se procede a realizar el mallado de la pieza:

## Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

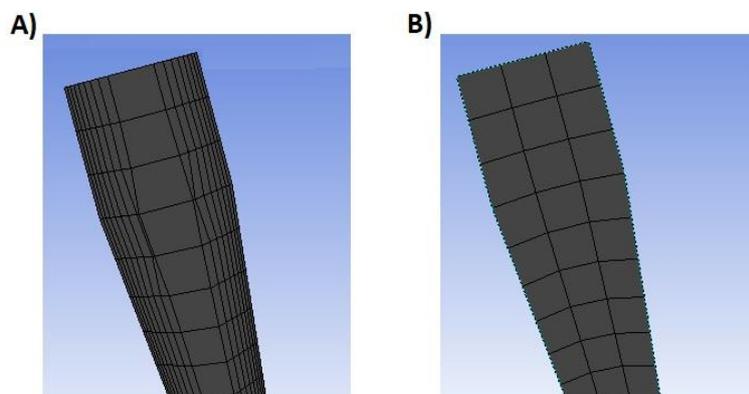


**Figura 37: Vista de la sección de mallado. Fuente propia**

Previamente al mallado, es necesario indicar las diferentes entradas y salidas del sistema además del contorno del mismo tal y como puede verse en la figura 37.

La importancia de un buen mallado radica en que debe ser capaz de capturar adecuadamente la diferentes partes de la geometría, de modo que la solución sea correcta. Cuando se trabaja con un programa CFD, mallar consiste en dividir la geometría en pequeños subdominios (elementos finitos), formados por puntos, los nodos. En dichos nodos es donde se realizan los cálculos, de este modo elementos de mallado muy pequeños, capturarán mejor la geometría, ya que se generan un mayor número de puntos (nodos) y por tanto la solución será más precisa, sin embargo el coste computacional será muy elevado. En cambio elementos de malla grandes capturarán peor la geometría y por tanto la solución será menos precisa en cada punto de la sección, por lo que es necesario llegar a un compromiso entre precisión y coste computacional.

Cerca de la pared se produce una caída de la velocidad, debido al hecho de la condición de no deslizamiento. Mediante la opción de 'inflation', es posible añadir un refinamiento en dicha zona de pared, haciendo así el mallado más preciso [78]. De este modo tal y como puede verse en la figura 38, se aprecia claramente la diferencia en el mallado si se utiliza dicha opción.



**Figura 38: Comparación mallado A) Con 'Inflation'. B) Sin 'Inflation'. Fuente propia**

Dentro de 'inflation', un parámetro importante es 'maximum layers', el cual establece el número de capas con las que se va a dividir la zona, siendo más refinado cuanto mayor número de capas se establezcan.

A continuación se muestran los diferentes parámetros seleccionados tanto en inflation como para el mallado:

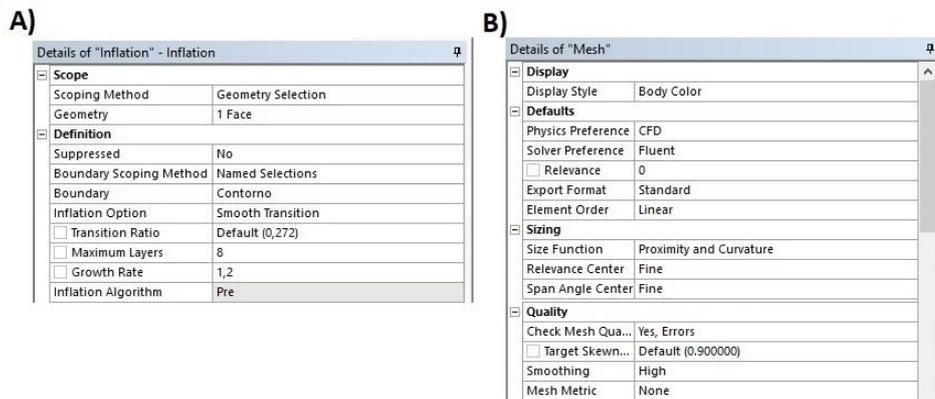


Figura 39: A) Parámetros 'Inflation'. B) Parámetros destacables mallado. Fuente propia

Respecto al mallado, se ha optado por una 'Size Function de Proximity and Curvature' con una precisión fina, de modo que se consiga que la malla tenga una alta precisión. Por otro lado, en la opción de 'Quality', se ha elegido 'Smoothing High', con el objetivo de mejorar la calidad de la malla, tal y como se recomendaba en la documentación [77]. El resto de opciones se dejaron con la configuración proporcionada por Ansys.

Una vez generada la malla, se procede a indicar las diferentes condiciones de contorno para la solución y los parámetros para el 'solver'. A continuación, puede verse una captura de la ventana de 'setup':

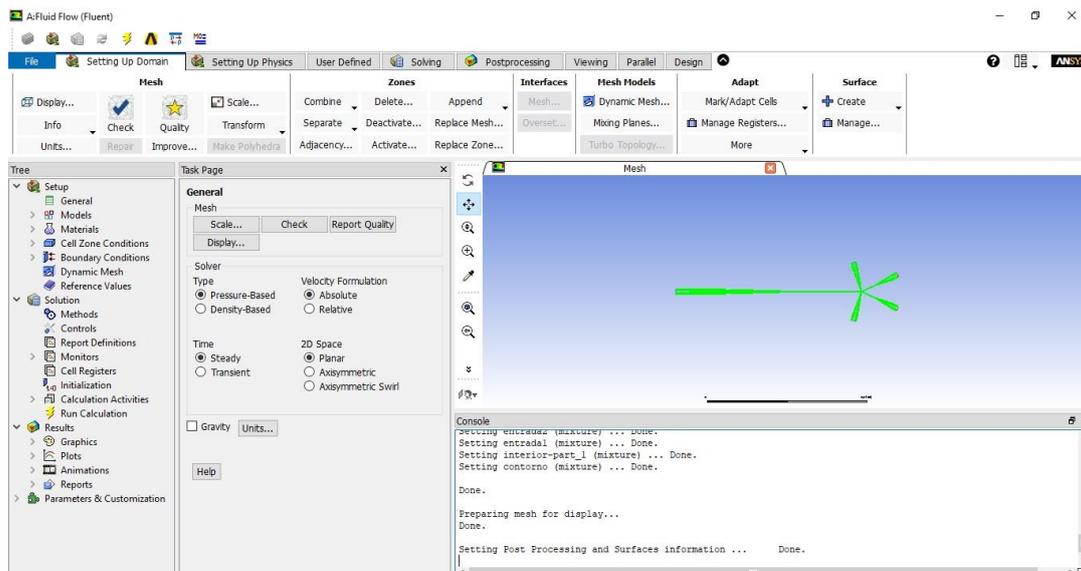
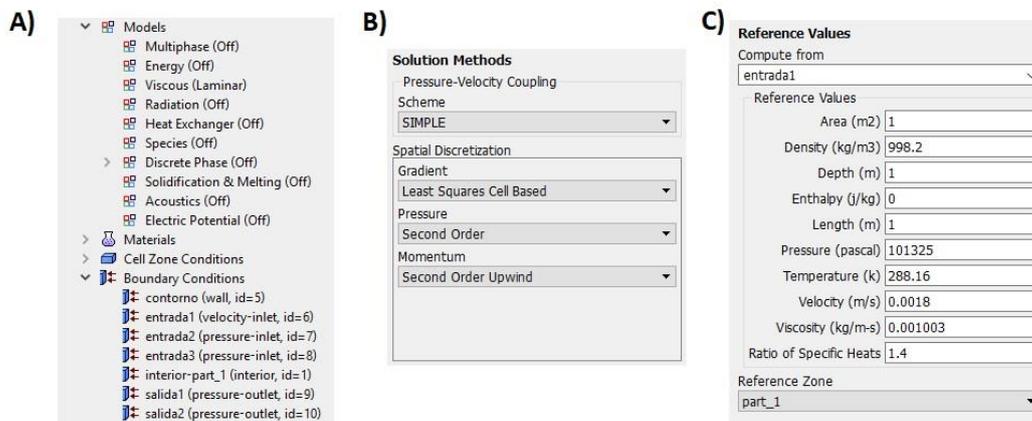


Figura 40: Vista pestaña 'setup'. Fuente propia

En la pestaña ‘*Models*’, únicamente se indica que se va simular un flujo laminar tal y como se comentó en el apartado 2.3 de la presente memoria. En el apartado de ‘*Materials*’, se indica como fluido agua, ya que tal y como se especificó en el apartado 3.4.1 el fluido real era M9, muy similar al agua.



**Figura 41: Parámetros destacables pestaña ‘Setup’. Fuente propia**

Por otro lado, en el apartado ‘*Boundary Conditions*’, se deben especificar las condiciones de contorno. De este modo tal y como puede verse en la figura 41A, al haber especificado durante el mallado las diferentes secciones, ahora aparecen en este apartado. Por lo tanto, se especifican los siguientes tipos de condiciones de contorno para todas las simulaciones:

Condición Contorno	Tipo Condición
Entrada 1	<b>Velocity Inlet.</b> Se definen Velocidad y Presión.
Entrada 2	<b>Pressure Inlet.</b> Se define presión relativa.
Entrada 3	<b>Pressure Inlet.</b> Se define presión relativa.
Contorno	<b>Pared.</b> Se deja por defecto (No deslizamiento y Pared fija)
Interior-part1	<b>Interior.</b> Creado por Ansys
Salida 1	<b>Pressure Outlet.</b> Se define presión relativa.
Salida 2	<b>Pressure Outlet.</b> Se define presión relativa.

**Tabla 7: Tipos de Condiciones de contorno usadas**

Tal y como se comentó en el apartado 3.2, pese a que el control se hará mediante la variación de los caudales, a la hora de simular resulta más sencillo partir de las presiones descritas en [51]. De este modo, una vez obtenido el resultado, es posible conocer la velocidad de entrada y conocida la sección, se puede determinar el caudal a suministrar por cada la bomba en su correspondiente entrada.

Una vez definidas las condiciones de contorno, se procede a indicar de donde tomar los valores de referencia (figura 41C). En este caso se fija la entrada 1, y se indica como presión, la atmosférica (101325 Pa). Por último, se especifica el método de solución indicado en la figura 41B.

El método ‘*pressure-based*’ (figura 40), tradicionalmente fue formulado para flujos incompresibles a baja velocidad, lo cual concuerda con este ejemplo. Al tratarse del caso ‘*Pressure-Velocity Coupling*’, de acuerdo con la documentación [79], la restricción de

conservación de masa se resuelve mediante la ecuación de presión, la cual se deriva de las ecuaciones de continuidad y momento. Puesto que se trata de ecuaciones no lineales, se deben realizar iteraciones hasta converger la solución. Finalmente, como esquema se escoge el método *SIMPLE*, el cual se basa en que el flujo va desde las regiones de alta presión a las de baja presión. Dicho método es ideal para modelos con baja dificultad como es el presente caso (solo activado el modelo laminar). Se ha optado por esta configuración de solución tras consultar diversos ejemplos disponibles en la documentación y videos, en los cuales se recomendada para este tipo de caso frente a otros métodos de solución.

Una vez definidos todos los parámetros, en la pestaña 'Run Calculations', se especifican el número de iteraciones, el cual debe ser lo suficientemente grande para que la solución llegue a converger y por último se lanza la simulación.

Finalmente, una vez ha convergido la simulación, puede verse los resultados en la ventana 'Results'. Cabe destacar, que el hecho de que la solución converja implica que el valor de los residuos llegue a 0.001.

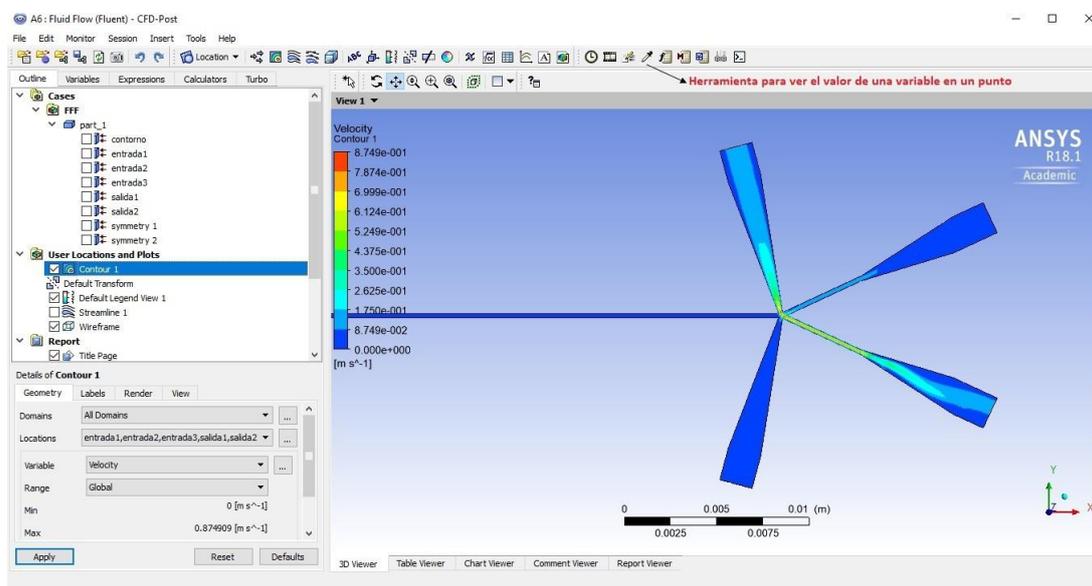


Figura 42: Vista pestaña 'Results'. Fuente propia

La forma en que se mostrarán las soluciones será mediante *Contour* y *Streamline*. El primero muestra la distribución de los diferentes valores de la variable que se especifique mediante colores. En el segundo tipo, mostrara las líneas de flujo, de modo que pueda verse hacia dónde va la mayor parte del flujo.

#### 4.2.2. Simulación del dispositivo para *C. elegans* L1

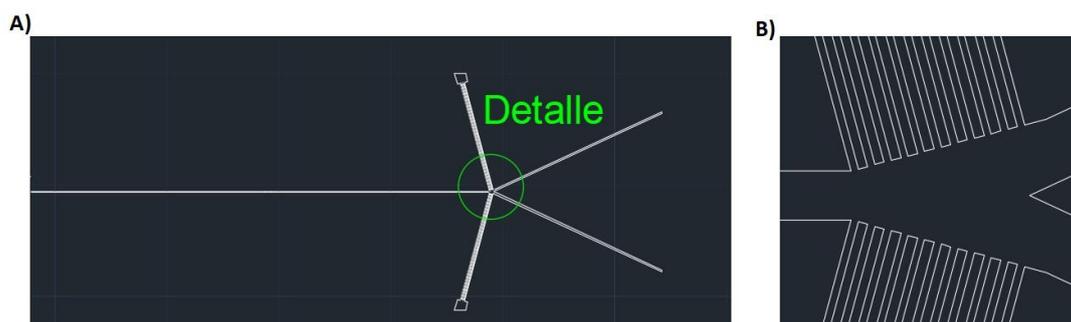
A continuación, se van a comentar los resultados más relevantes que se fueron obteniendo en la simulación para conseguir un modelo de dispositivo funcional para *C. elegans* L1. Tal y como se indicó en el apartado 3.1, del diseño para *C. elegans* L1 únicamente se analizarán sus resultados en simulación puesto que su puesta en práctica no fue posible.

En la siguiente tabla (Tabla 8) puede verse la correspondencia entre las entradas-salidas y la nomenclatura de las condiciones de contorno que les afectan:

Zona	Condiciones Contorno
Entrada 1	Velocidad ( $v_1$ ), Presión ( $p_1$ )
Entrada 2	Presión ( $p_2$ )
Entrada 3	Presión ( $p_3$ )
Salida 1	Presión ( $p_{s1}$ )
Salida 2	Presión ( $p_{s2}$ )

**Tabla 8: Nomenclatura condiciones contorno para cada zona**

De este modo partiendo de la idea descrita por Yan *et al.* [51], se procede al diseño de un primer modelo:



**Figura 43: Modelo 1 dispositivo para *C. elegans* L1. A) Vista general, B) Detalle canales centro. Fuente propia**

Por otro lado, para el canal central, se debe elegir una dimensión lo suficiente grande para permitir el paso de los *C. elegans* pero no demasiado grande para evitar que pasen varios. Se optó por una dimensión de  $30\ \mu\text{m}$ , puesto que los *C. elegans* L1 pueden llegar hasta los  $18\ \mu\text{m}$  (apartado 2.4), impidiendo así el paso de dos a la vez.

En la simulación se partió con valores  $v_1=1\ \text{mm/s}$ ,  $p_1=1000\ \text{Pa}$ ,  $p_2=2000\ \text{Pa}$ ,  $p_3=800\ \text{Pa}$ ,  $p_{s1}$  y  $p_{s2}$  ambas cero debido a que se descarga al ambiente (se trabaja con presiones relativas). Este primer modelo no proporcionó resultados adecuados. De hecho, la solución no llegó a converger incluso variando los valores, por lo que fue necesario un rediseño del mismo.

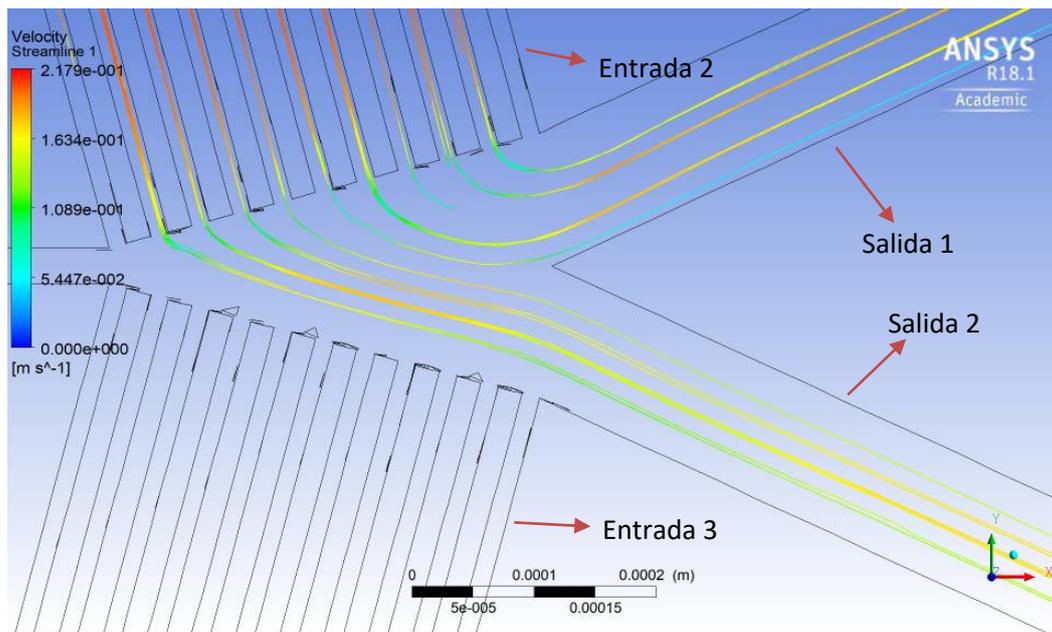
Se optó por una modificación de la entrada, tomando como referencia la punta de una pipeta debido al hecho de que se llegaba a tener velocidades negativas en una zona del canal central, lo cual se traducían en un retorno del flujo. Por otro lado, la forma de las entradas de las bombas piezoeléctricas y las salidas también se modificaron pasando de ser circulares y verticales ajustadas al tamaño de los tubos. Para mayor detalle de las diferentes dimensiones puede consultarse el plano 1, disponible en el apartado *Planos*.

Cabe destacar que, aunque las entradas sean verticales, con el fin de reducir la complejidad, se hace la aproximación de entrada en horizontal a través de una abertura de amplitud del diámetro. De este modo tras las diferentes modificaciones se obtuvo el siguiente modelo:



**Figura 44: Modelo 2 dispositivo para *C. elegans* L1. En verde la simplificación adoptada. Fuente propia**

En este caso la distribución de los canales de presión permanece igual a la mostrada en la figura 43 b. Tomando  $v_1=3$  mm/s,  $p_1=1000$  Pa,  $p_2=4500$  Pa,  $p_3=1500$  Pa, la solución llegó a converger, sin embargo esta no fue del todo satisfactoria, debido a que no había una separación lo suficientemente clara, es decir dado que  $p_2 > p_3$ , una gran parte del flujo debería ir hacia la salida 2, lo cual no llegaba a ocurrir claramente. Por otro lado, la velocidad en la zona de inspección era 3,38 cm/s, lo cual era excesivo ya que no se deseaba que fuera superior a 2 cm/s. A continuación, puede verse una imagen donde se muestra lo descrito anteriormente:



**Figura 45: Distribución de las líneas flujo (Streamline) en la zona central. Fuente Propia**

De acuerdo con la figura 19, donde se especifican la disposición de las diferentes entradas y salidas, en la figura 45, se marcan las entradas 2 y 3, y las salidas 2 y 3, las cuales estarán en dicha disposición, para todos los siguientes resultados que se van a mostrar a lo largo del presente apartado.

Tal y como puede verse en la figura 45, más de la mitad del flujo va para salida 1, cuando en realidad debería ir hacia la salida 2, es decir el flujo de los primeros 5 canales va para la salida 2 en cambio el resto (6 canales), va para la 1, por lo que se deduce que el funcionamiento no es el correcto.

Con el fin de solucionar estos inconvenientes, se fueron realizando varias simulaciones en las que se fueron ajustando los parámetros, obteniéndose una solución con el comportamiento deseado. De este modo tomando  $v_1=1$  mm/s,  $p_1=1000$  Pa,  $p_2=8000$  Pa,  $p_3=1000$  Pa, se obtuvieron los siguientes resultados:

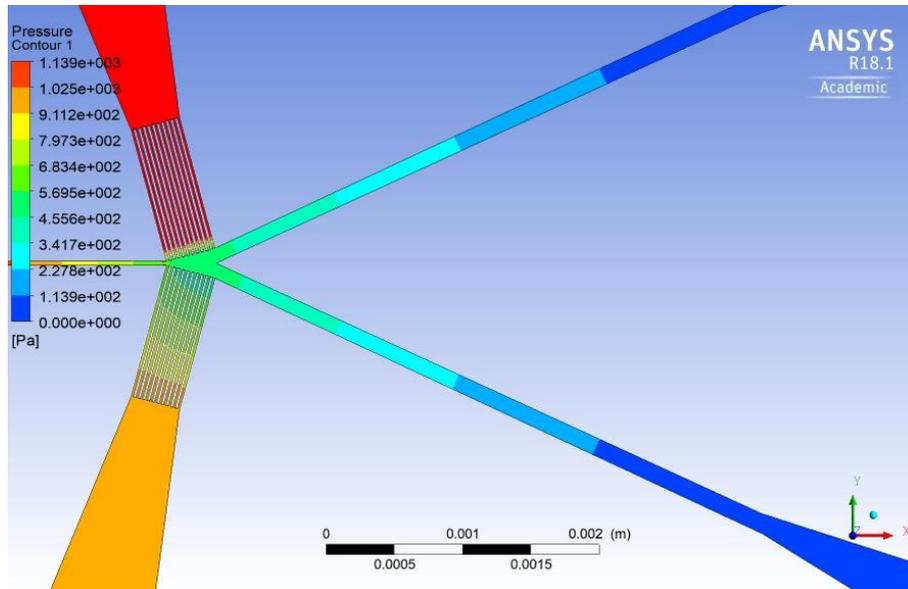


Figura 46: Distribución presiones en la zona central modelo 2. Fuente Propia

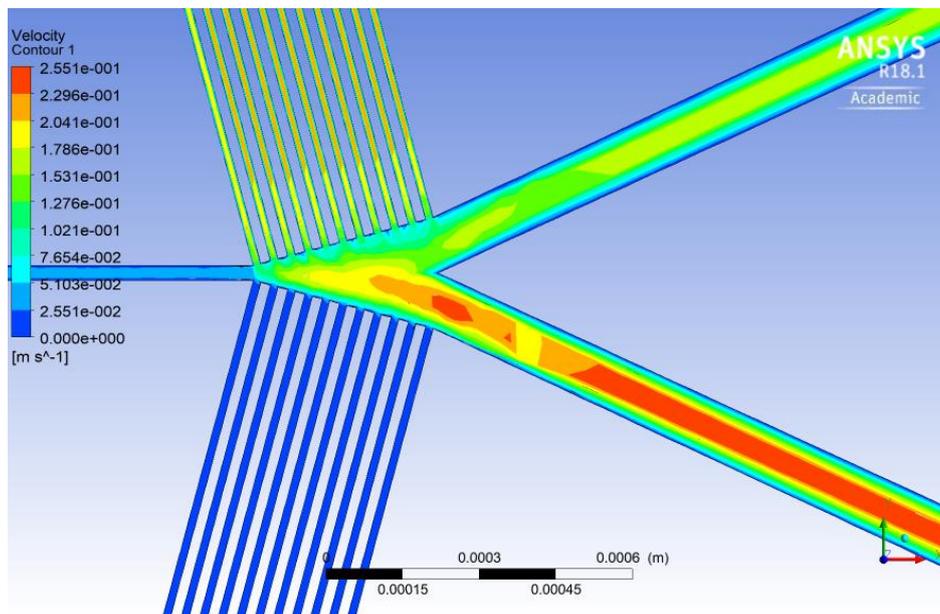


Figura 47: Distribución Velocidad en la zona central modelo 2. Fuente Propia

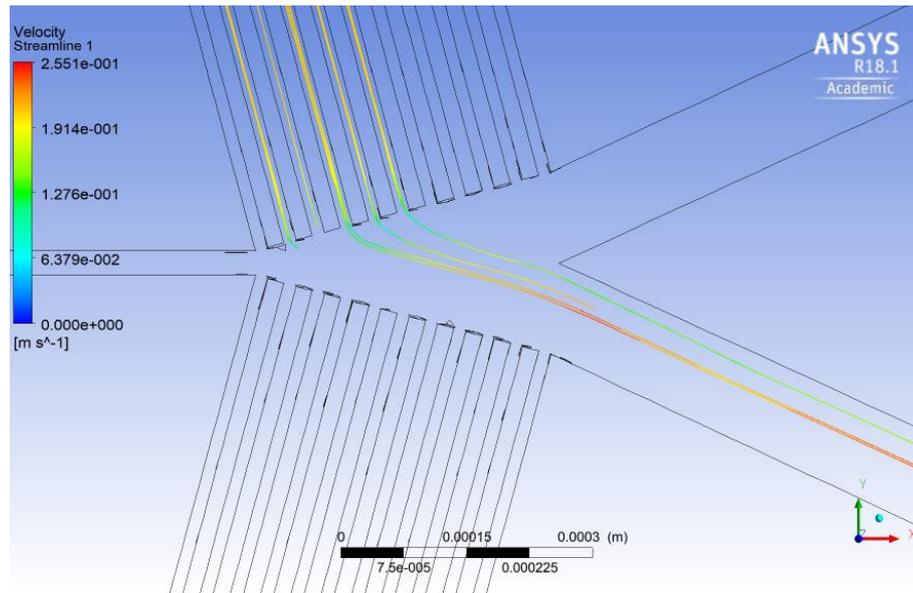


Figura 48: Líneas flujo (Streamline) en la zona central modelo 2. Fuente Propia

Analizando los resultados puede verse que en ningún momento se llega a tener presiones negativas, hecho que si ocurría en las simulaciones anteriores. Por otro lado, analizando tanto la figura de la velocidad como las líneas de flujo, se ve una clara separación de flujo, creándose una frontera cerca del vértice que hace que gran parte del flujo vaya por la segunda salida, tal y como se deseaba puesto que  $p_2 > p_3$ .

Del anterior análisis surgen una serie de ideas las cuales pueden dar un mejor funcionamiento. Observando la figura 47, sería deseable que el flujo que llegara por la entrada de mayor presión en este caso la 2, ejerciera una mayor fuerza cerca del vértice central y una menor fuerza al comienzo de la llegada del canal central a la intersección, con el fin de conseguir de forzar a gran parte del flujo hacia la salida deseada. De este modo surgen 3 alternativas basadas en este razonamiento.

La primera de ellas en línea con lo sugerido por Yan *et al.* [51], utiliza canales de presión con forma de punta de aguja (figura 49). Para mayor detalle del diseño, puede consultarse el plano 2, disponible en el apartado *Planos*.

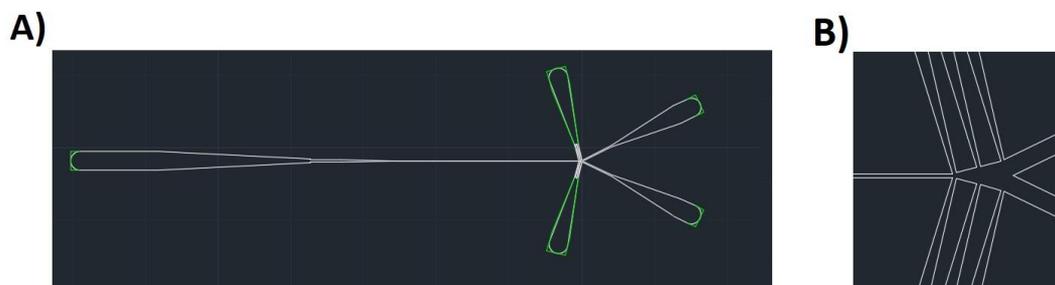


Figura 49: Modelo 3 dispositivo para *C. elegans* L1. A) Vista general, B) Detalle canales centro. Fuente propia

De este modo partiendo con las condiciones del modelo anterior, y tras varias simulaciones donde se fueron haciendo ajustes en los parámetros, finalmente se obtiene el siguiente resultado tomando  $v_1=1$  mm/s,  $p_1=500$  Pa,  $p_2=6000$  Pa,  $p_3=1500$  Pa:

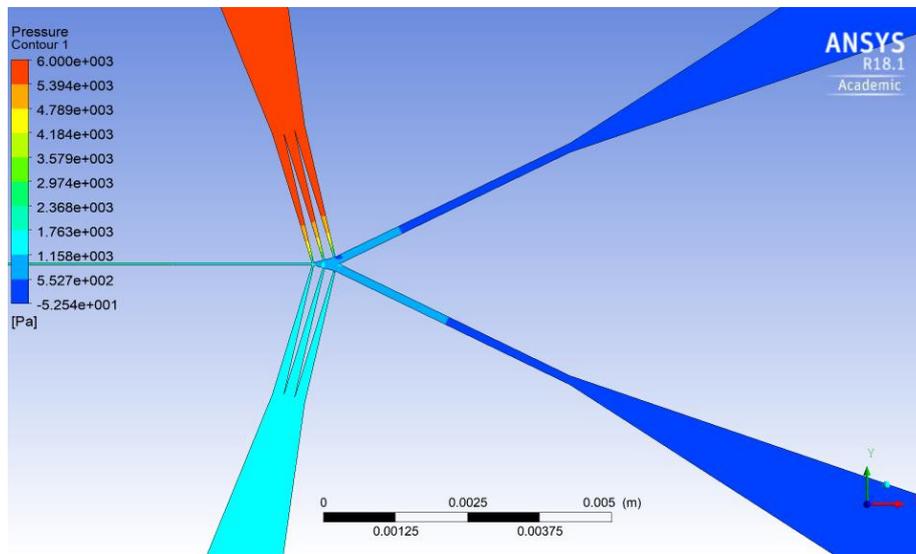


Figura 50: Distribución presiones en la zona central modelo 3. Fuente Propia

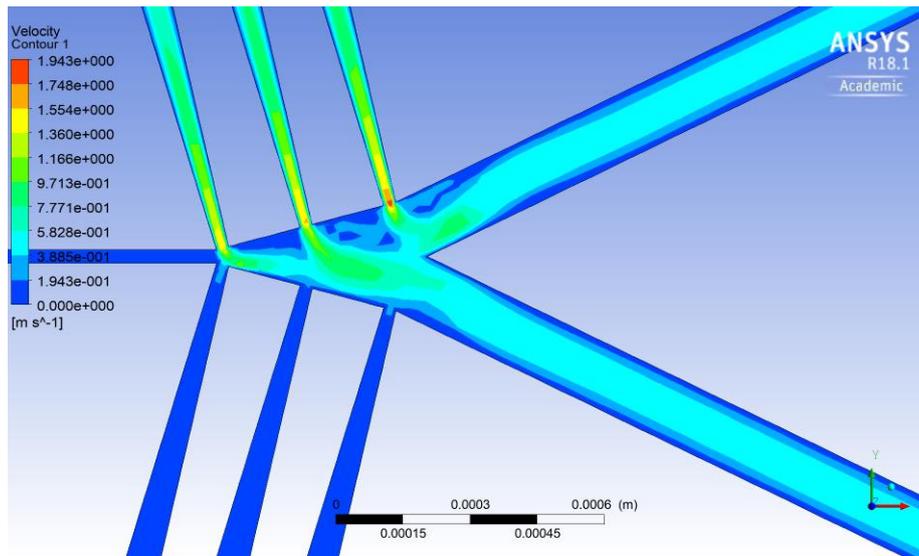
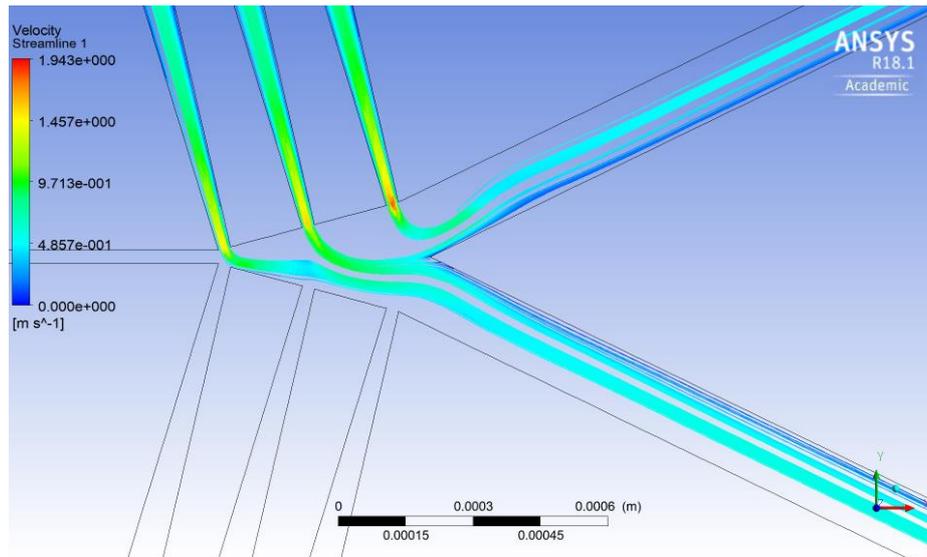


Figura 51: Distribución Velocidad en la zona central modelo 3. Fuente Propia

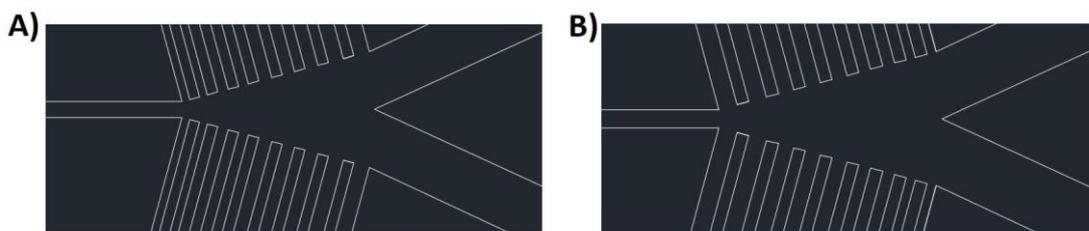


**Figura 52: Líneas flujo (Streamline) en la zona central modelo 3. Fuente Propia**

Analizando los resultados puede verse que en este caso la división es más clara, gran parte del flujo va por la salida deseada y una parte muy pequeña por la parte superior. Por otro lado, la velocidad en la zona de inspección está en torno a 2cm/s, lo cual da un número de Reynolds de 0.6.

Las dos siguientes alternativas se basan en usar canales de ancho variable según se van acercando a las salidas. La primera (figura 53A) se basa en canales de ancho creciente desde 15  $\mu\text{m}$  a 30  $\mu\text{m}$ , en cambio la segunda (figura 53B) se basa en canales de ancho decreciente desde 30  $\mu\text{m}$  a 15  $\mu\text{m}$ .

A continuación, se muestra un detalle de la zona central de los modelos 4 y 5. Cabe destacar que el resto del dispositivo es similar al mostrado en la figura 44, para mayor detalle de ambos modelos puede consultarse los planos 3 y 4 respectivamente:



**Figura 53: A) Detalle Modelo 4, B) Detalle Modelo 5**

En ambos dispositivos para sus respectivas simulaciones se partió de las condiciones dadas en el modelo 2. Cabe destacar que con dichas condiciones se consiguieron simulaciones con el comportamiento deseado para ambos modelos. Esto se debe en parte a que ambos modelos tienen una alta similitud con el modelo 2. De este modo a continuación se muestra el resultado obtenido para el modelo 4:

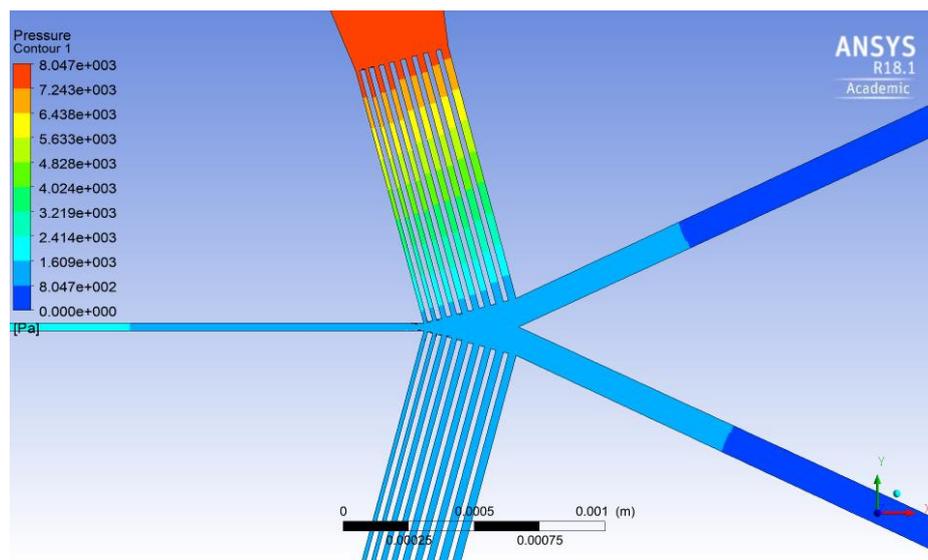


Figura 54: Distribución presiones en la zona central modelo 4. Fuente Propia

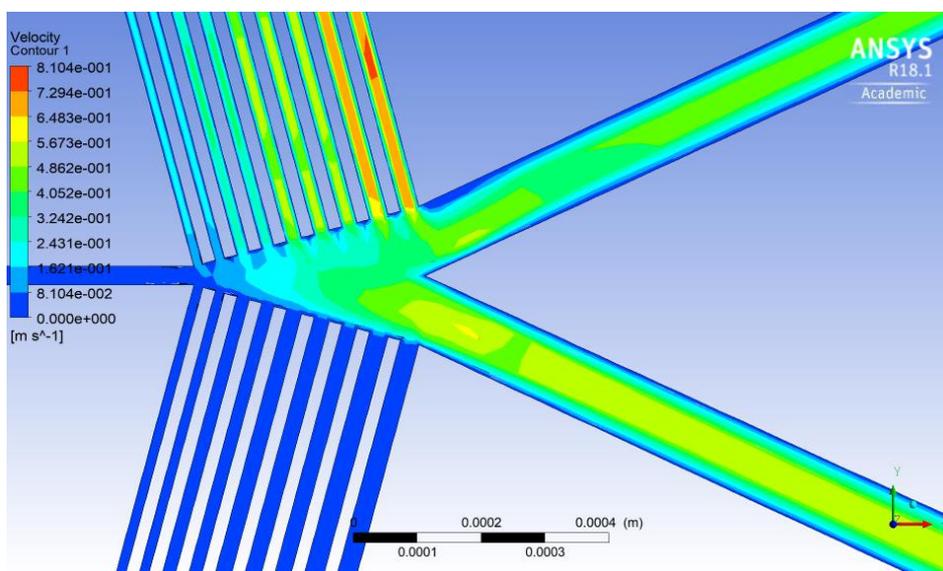
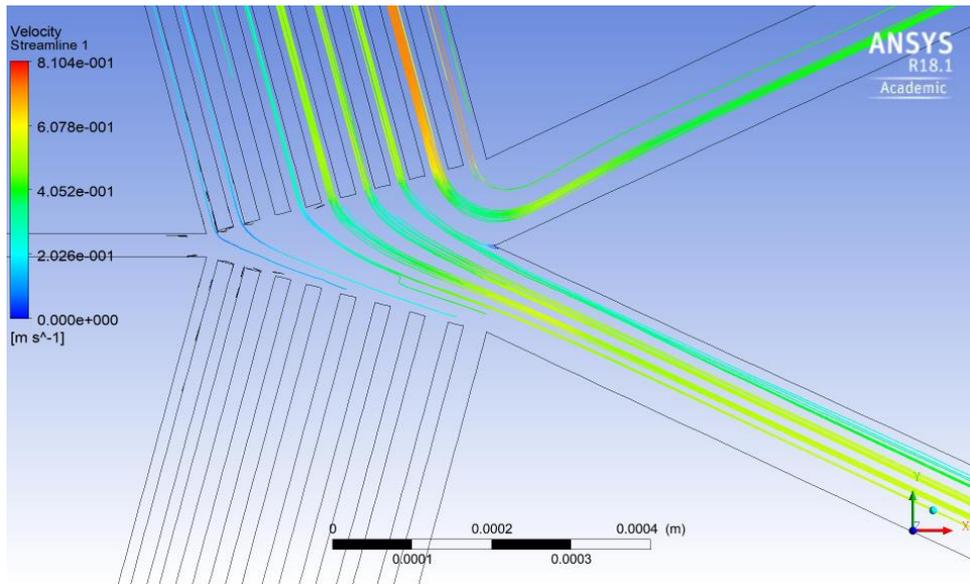


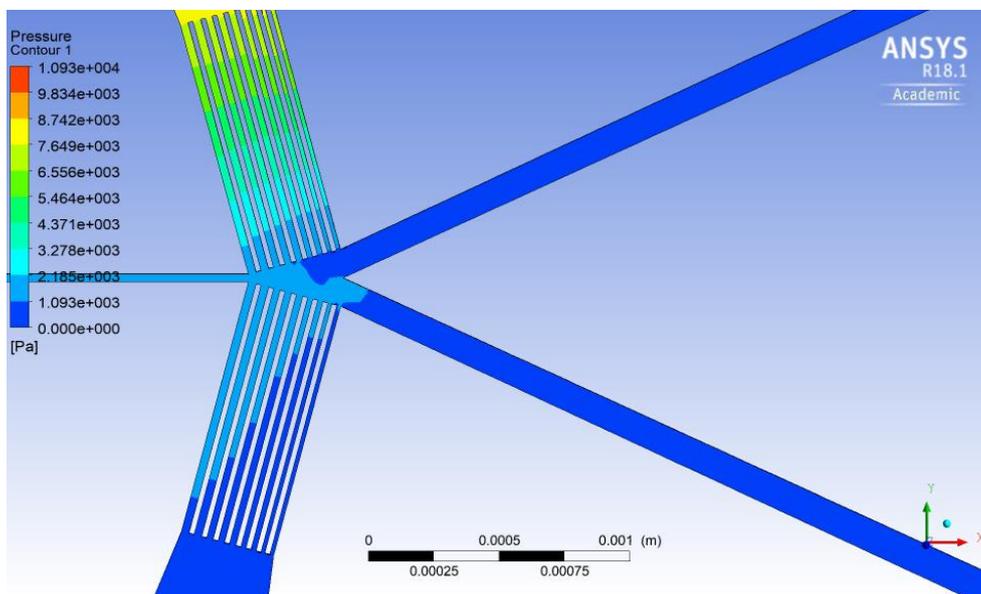
Figura 55: Distribución Velocidad en la zona central modelo 4. Fuente Propia



**Figura 56: Líneas flujo (Streamline) en la zona central modelo 4. Fuente Propia**

Respecto a la presión, puede verse un perfil de presiones triangular en los canales de presión, de modo que se produce una caída de presión más tempranamente conforme se acerca a las salidas. Inversamente a este fenómeno, la velocidad en los canales de presión es mayor conforme nos acercamos a las salidas. Analizando tanto las figuras 55 y 56, puede verse como la separación del flujo hacia la salida deseada es más clara que en el modelo 2, yendo una mayor parte de este por la salida 2, lo cual indica que esta modificación ha mejorado la solución.

Una vez analizado el modelo 4, se procede a analizar los resultados obtenidos para el modelo 5:



**Figura 57: Distribución presiones en la zona central modelo 5. Fuente Propia**

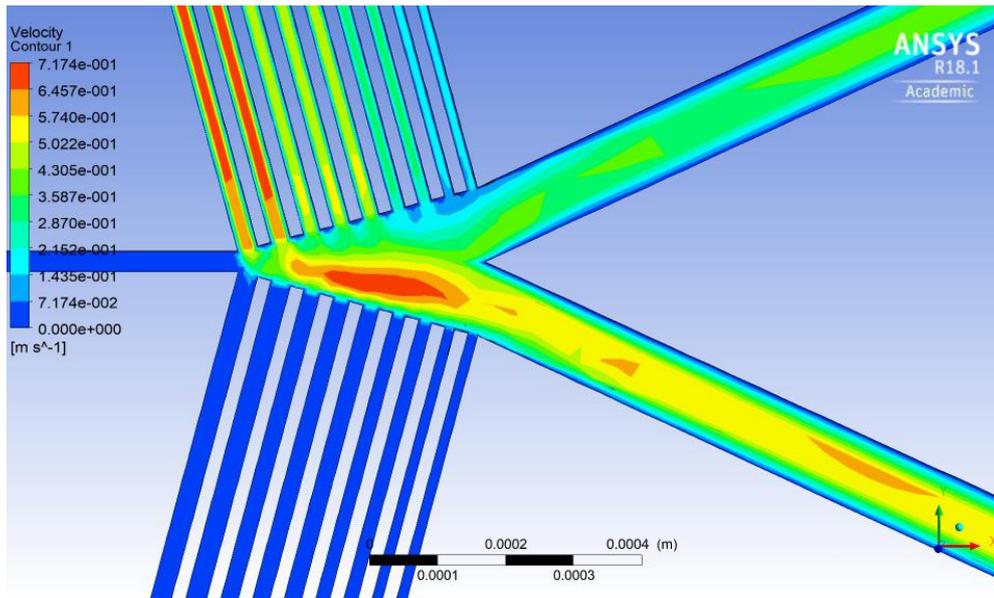


Figura 58: Distribución Velocidad en la zona central modelo 5. Fuente Propia

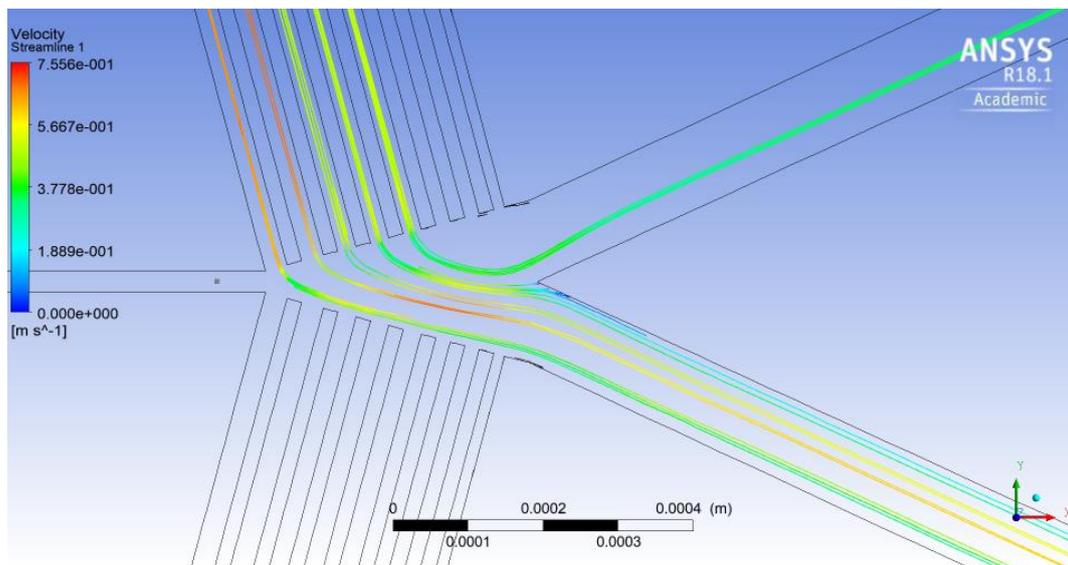


Figura 59: Líneas flujo (Streamline) en la zona central modelo 5. Fuente Propia

En este caso con la presión ocurre un fenómeno parecido al caso anterior, sin embargo, a diferencia del caso anterior, en la zona central hacia la salida 2, se distingue una zona con mayor presión. Por otro lado, existe una mayor velocidad en los canales de mayor anchura, además se distingue una zona de flujo en la zona central hacia la salida 2 con mayor velocidad, aspecto que no ocurría en el caso anterior. Analizando la distribución de líneas de flujo, puede verse que una gran parte va hacia la salida 2, creándose una frontera clara en el vértice, por lo que se deduce que tiene un comportamiento correcto de acuerdo al deseado.

Finalmente, una vez analizadas las 4 alternativas en el caso de que hubiera sido posible su fabricación se habría optado por el modelo 5. Se ha descartado el modelo 2 puesto que en el modelo 5 se distinguía una mejor división del flujo. Por otro lado, el modelo 3 pese a tener un buen funcionamiento, al compararlo frente a los modelos 4 y 5, destacaba que una cantidad importante del flujo de entrada salía directamente hacia la salida 1, por lo cual quedaba

descartado. En último lugar, al comparar los modelos 4 y 5 se puede ver como la división de flujo es ligeramente más clara en el modelo 5. Además, puede verse como se distingue una zona como mayor presión en la parte del flujo que va hacia la salida 2, por lo que finalmente se optó por el modelo 5.

Cabe destacar que, en todos los casos analizados, se obtuvo un número de Reynolds inferior a 1 en la zona de inspección, puesto que una especificación a obtener fue la de velocidad en torno a 2 cm/s en dicha zona.

#### 4.2.3. Simulación del dispositivo para *C. elegans* L4

Una vez analizado el modelo para *C. elegans* L1, se procede a analizar el modelo para *C. elegans* L4, el cual si fue posible su fabricación. Partiendo de todo lo diseñado para L1, se procede al diseño de un dispositivo para *C. elegans* L4. De este modo la anchura del canal central pasa a las 360  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, las entradas y salidas se han adaptado a los tubos finalmente utilizados, por lo que para la entrada el diámetro interior y exterior es 1.8mm y 4mm respectivamente. Por otro lado, para las entradas 2 y 3 y las dos salidas, los diámetros interiores y exteriores son 1.8mm y 2.8mm respectivamente.

Respecto a la distribución del canal central, se opta por un único canal de ancho 360  $\mu\text{m}$  creciente, con el fin de facilitar la impresión. Pese a ser un canal lo suficientemente ancho para que los *C. elegans* puedan escapar, generando una suficiente distribución de presiones puede evitarse este inconveniente sin mayor problema. De este modo el modelo obtenido es:



**Figura 60: Modelo 1 dispositivo para *C. elegans* L4. En verde la simplificación adoptada.**  
Fuente propia

Dicho modelo puede verse con mayor detalle el plano 5. Partiendo de las condiciones del modelo seleccionado para *C. elegans* L1 ( $v_1=1$  mm/s,  $p_1=1000$  Pa,  $p_2=8000$  Pa,  $p_3=1000$  Pa), se procede a realizar la simulación, obteniendo:

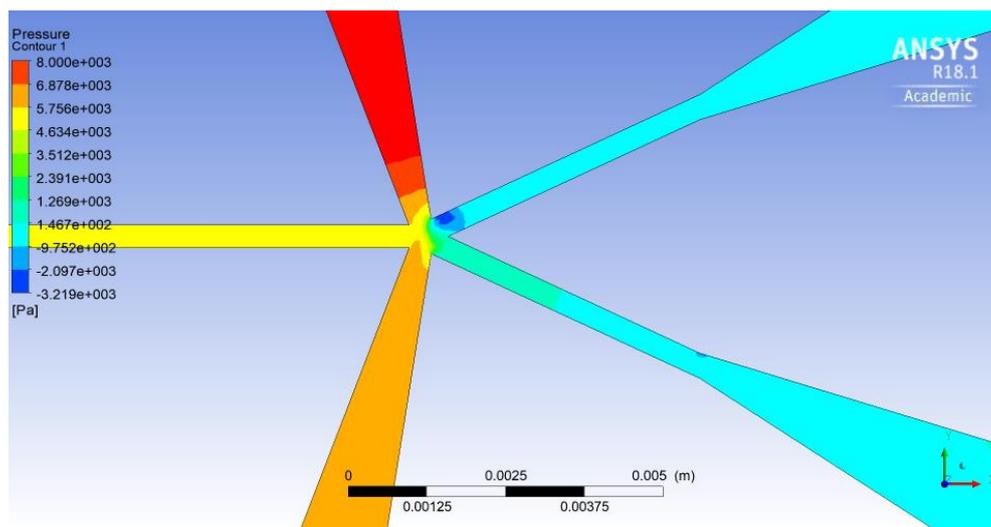


Figura 61: Distribución Presión en la zona central modelo 1 L4. Fuente Propia

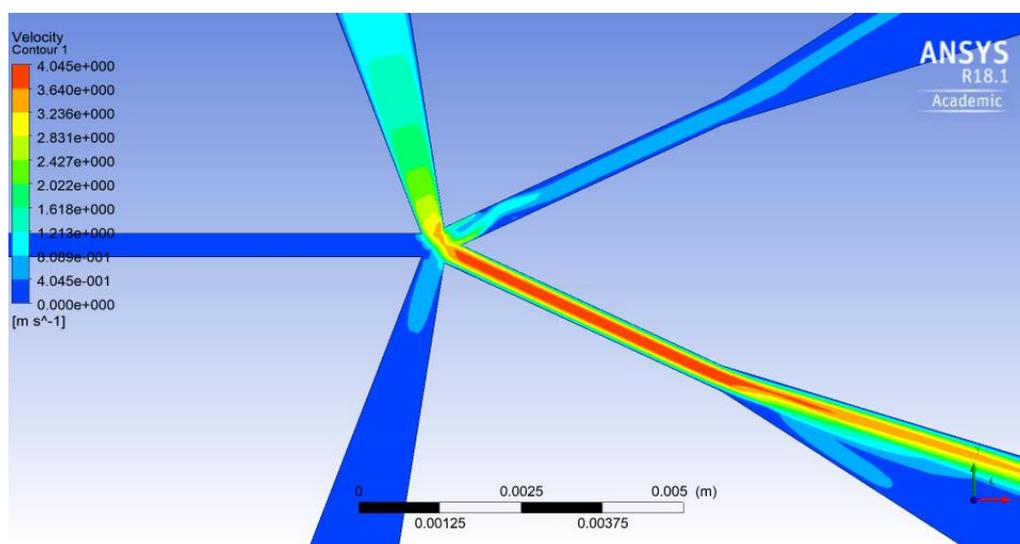


Figura 62: Distribución Velocidad en la zona central modelo 1 L4. Fuente Propia

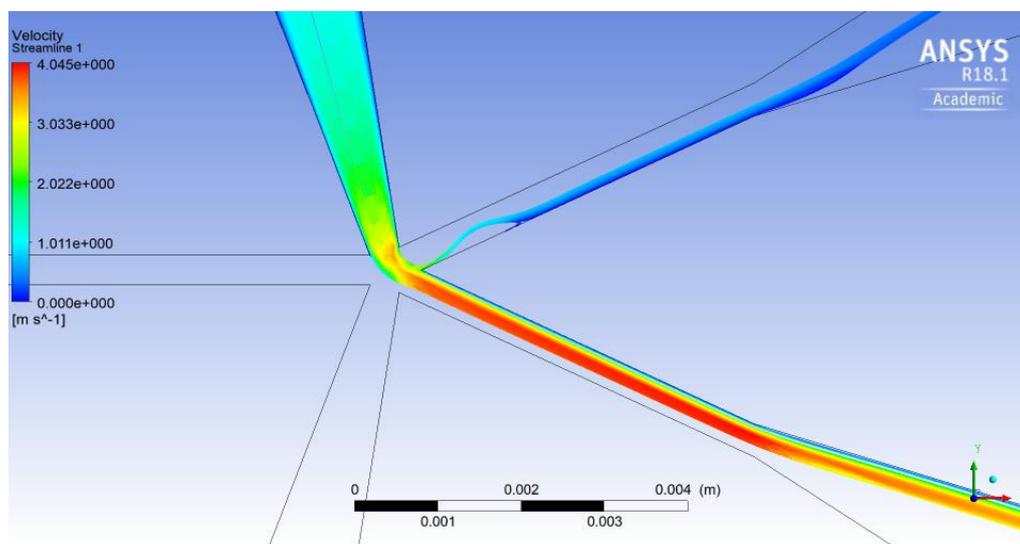


Figura 63: Líneas flujo (Streamline) en la zona central modelo 1 L4. Fuente Propia

A primera vista, puede verse que el comportamiento es el adecuado y que su funcionamiento es bueno, sin embargo si se analiza tanto los caudales de las entradas 2 y 3 como la velocidad en la zona de inspección (7 cm/s), se determina que la solución no es correcta.

El caudal en las entradas puede calcularse mediante:

$$Q(\text{mL}/\text{min}) = v(\text{mm}/\text{s}) \cdot A(\text{mm}^2) \cdot \frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mm}^3} \quad (\text{ec. 16})$$

Donde el área a tratarse de una sección circular de diámetro 1.8 mm, es:

$$A(\text{mm}^2) = \frac{\pi}{4} \cdot 1,8^2 = 2,5447 \text{ mm}^2 \quad (\text{ec. 17})$$

Tras el cálculo se determina que el caudal necesario para la entrada de mayor presión (entrada 2), es 93,14, mL/min, lo cual es muy elevado. Dicho aspecto indicaba que el cambio de magnitud de los canales requería el uso de presiones menores. De este modo, tras una serie de ajustes, se obtiene el comportamiento deseado con valores más adecuados de presión y caudal. Tomando  $v_1=2,7 \text{ mm/s}$ ,  $p_1=1000 \text{ Pa}$ ,  $p_2=400 \text{ Pa}$ ,  $p_3=230 \text{ Pa}$ , se obtiene:

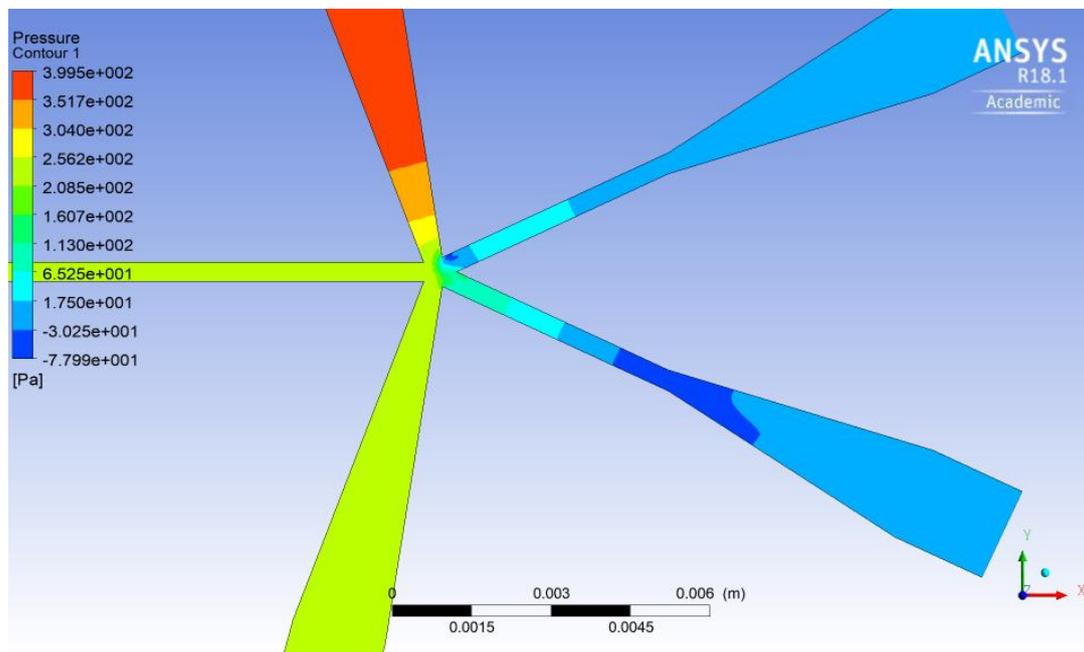


Figura 64: Distribución Presión en la zona central modelo 1 L4. Fuente Propia

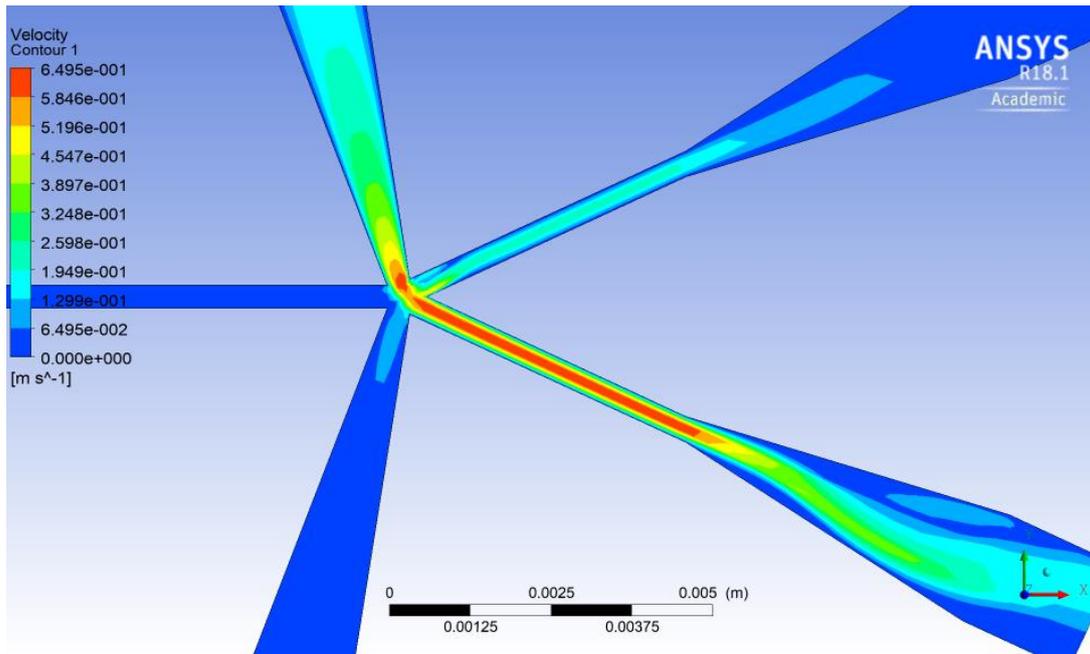


Figura 65: Distribución Velocidad en la zona central modelo 1 L4. Fuente Propia

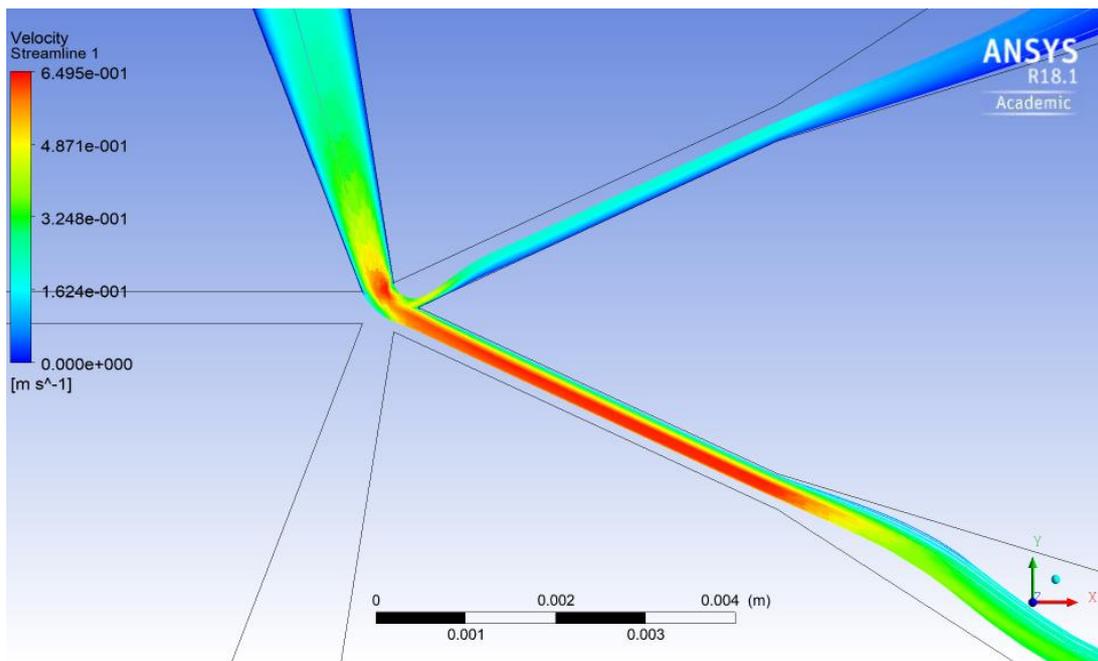


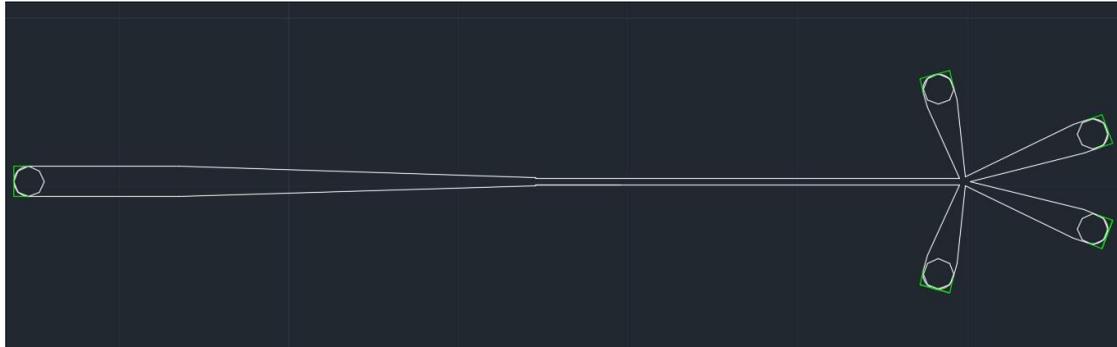
Figura 66: Líneas flujo (Streamline) en la zona central modelo 1 L4. Fuente Propia

Analizando la figura 64, puede verse como se genera una pequeña zona con presión negativa muy cercana a cero, la cual no se considera como un inconveniente. Por otro lado, analizando tanto la figura de la velocidad (figura 65) como las líneas de flujo (figura 66), se ve una clara separación de flujo, donde una parte pequeña de flujo va hacia la salida 1, mientras que la otra gran parte de flujo va por la segunda salida, tal y como se deseaba puesto que  $p_2 > p_3$ .

Respecto a los caudales, en este caso se obtienen para las salidas 2 y 3 respectivamente  $Q_2=17,4$  mL/min,  $Q_3=3,05$  mL/min y una velocidad en la zona de inspección de 0,019 m/s, por lo que se considera correcto y se decide imprimir el modelo para su prueba en el laboratorio.

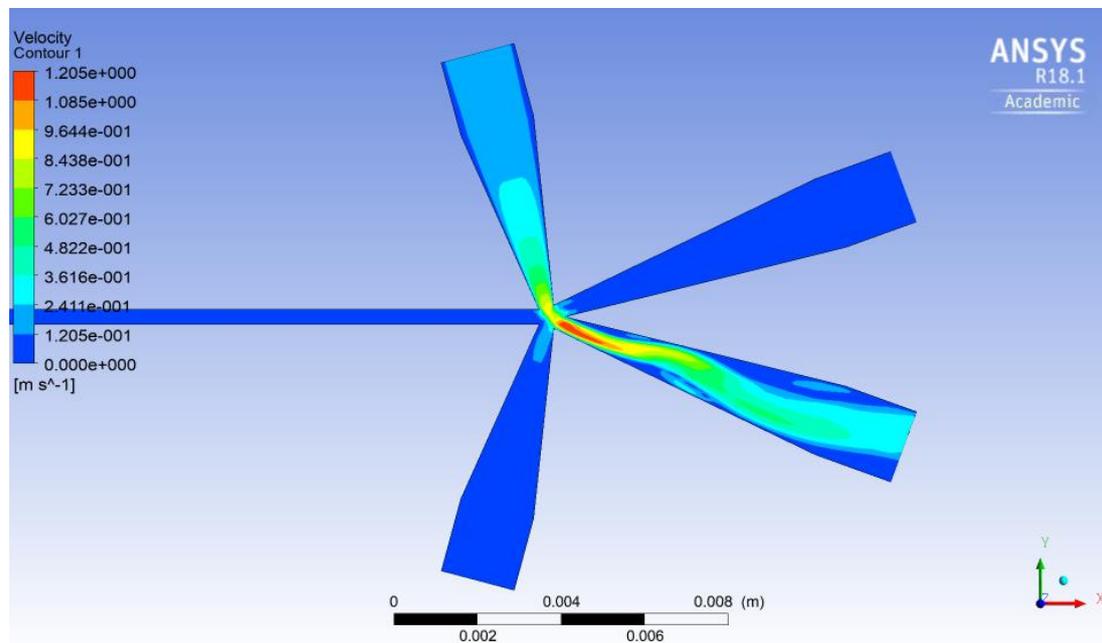
Cabe destacar que tras varias pruebas en el laboratorio, no fue posible su correcto funcionamiento. La presión necesaria para introducir el fluido en su interior era muy elevada, por lo que se producían numerosas fugas. De este modo, se procedió a realizar un rediseño del anterior, haciendo que tanto las entradas 2 y 3 como las salidas 1 y 2 se ampliaran más tempranamente desde el punto central, con el objetivo de reducir la presión necesaria. También con el objetivo de reducir las pérdidas, se acortaron los canales de los conductos citados anteriormente.

De este modo el modelo finalmente diseñado (Plano 6) presenta la siguiente forma:



**Figura 67: Modelo 2 dispositivo para *C. elegans* L4. En verde la simplificación adoptada. Fuente propia**

Partiendo de las condiciones usadas para el anterior modelo ( $v_1=2,7$  mm/s,  $p_1=1000$  Pa,  $p_2=400$  Pa,  $p_3=230$  Pa), se procedió a realizar una simulación obteniendo:



**Figura 68: Distribución Velocidad primera prueba modelo 2 L4. Fuente Propia**

Pese a tener un buen comportamiento, al calcular el valor de caudal en la entrada 2, se detectó que este era excesivo ( $Q_2= 26.57$  mL/min). Por otro lado, la velocidad en la zona de inspección era  $0.012$  mm/s, por lo que era necesario realizar un ajuste en los parámetros de simulación.

De este modo, tras varias simulaciones en las que se fueron variando parámetros, finalmente tomando  $v_1=1,8$  mm/s,  $p_1=1000$  Pa,  $p_2=280$  Pa,  $p_3=150$  Pa, se obtuvo:

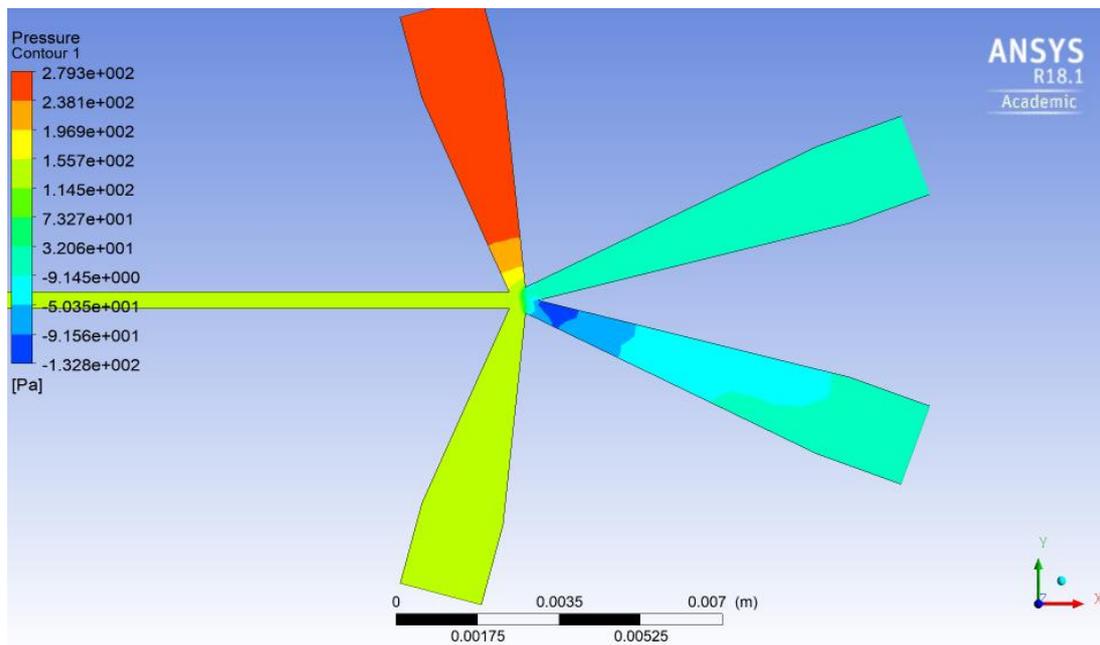


Figura 69: Distribución Presión en la zona central modelo 2 L4. Fuente Propia

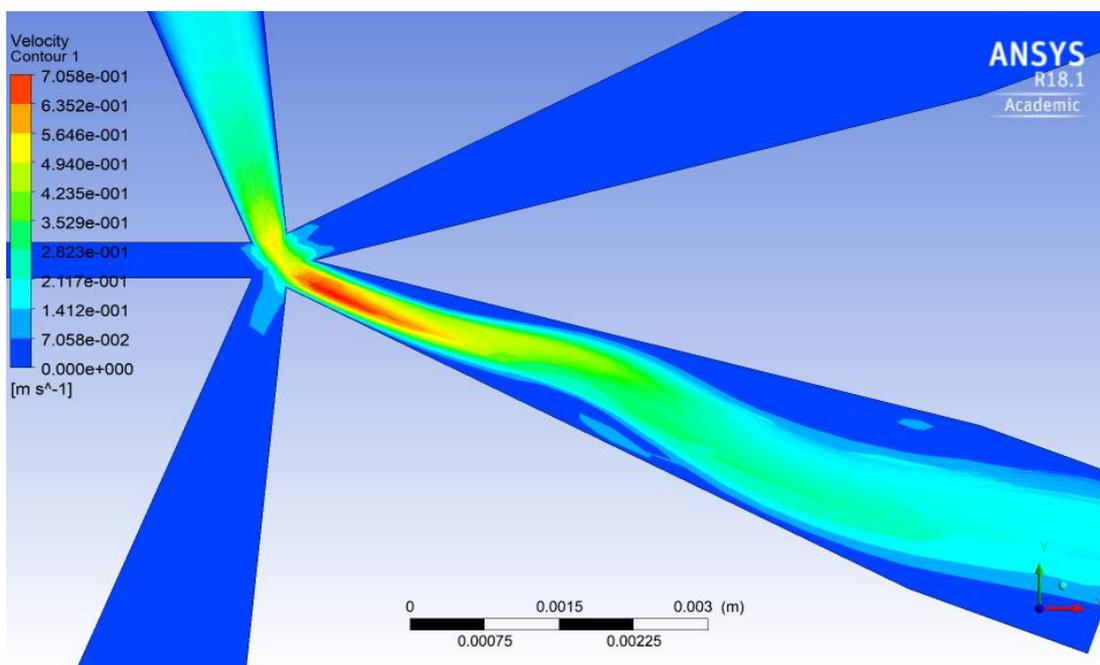
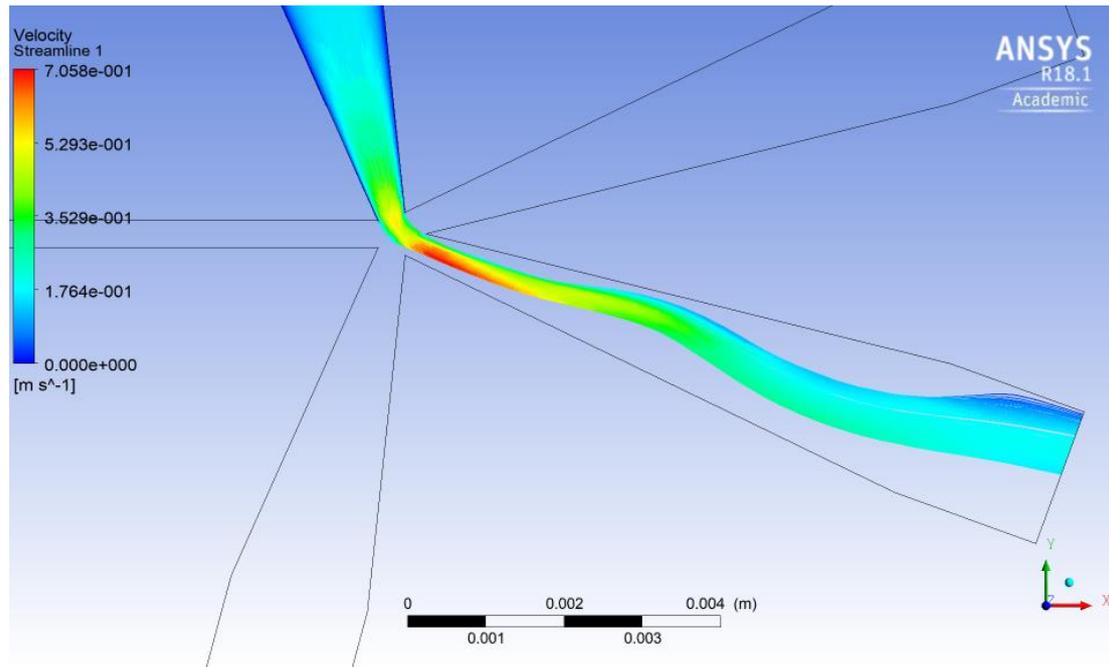


Figura 70: Distribución Velocidad en la zona central modelo 2 L4. Fuente Propia



**Figura 71: Líneas flujo (Streamline) en la zona central modelo 2 L4. Fuente Propia**

Analizando los resultados, puede verse como en este caso también se tiene una zona de presiones negativas, sin embargo ahora es un poco mayor que en el modelo 1. Por otro lado si se analiza tanto la velocidad (figura 70) como la distribución de las líneas de flujo (figura 71), puede verse que el comportamiento ha mejorado significativamente con respecto al modelo anterior, es decir, prácticamente no va flujo por la salida 1.

En este caso los caudales de las entradas 2 y 3 son 16,1mL/min y, 3,94≈4 mL/min respectivamente y la velocidad en la zona de inspección está en torno a 2 cm/s. A la hora de realizar las simulaciones, dichas condiciones forman parte del **caso 1**.

Puesto que su funcionamiento era correcto, se envió para su impresión. Sin embargo, en su primera prueba en laboratorio con las bombas seleccionadas, para las condiciones utilizadas en simulación, no se detectaba con mucha claridad la separación de los flujos, por lo que se optó por ir ajustando experimentalmente los diferentes parámetros, hasta conseguir otras condiciones con las que hacer otra prueba (**caso 2**). Tomando  $v_1=8$  mm/s,  $p_1=1500$  Pa,  $p_2=310$  Pa,  $p_3=150$  Pa, se consiguió en prueba experimental, ver de forma más clara la separación del flujo proveniente de la entrada 1. De este modo, en el laboratorio se probaron dos casos. El primero de ellos, con condiciones menos extremas, obtenidas de Ansys descritas en las figuras 69, 70 y 71, y el segundo, con condiciones de caudal más extremas la una de la otra, obtenidas mediante ajuste experimental.

De este modo, para los valores del caso 2, el modelo presenta el siguiente comportamiento en simulación:

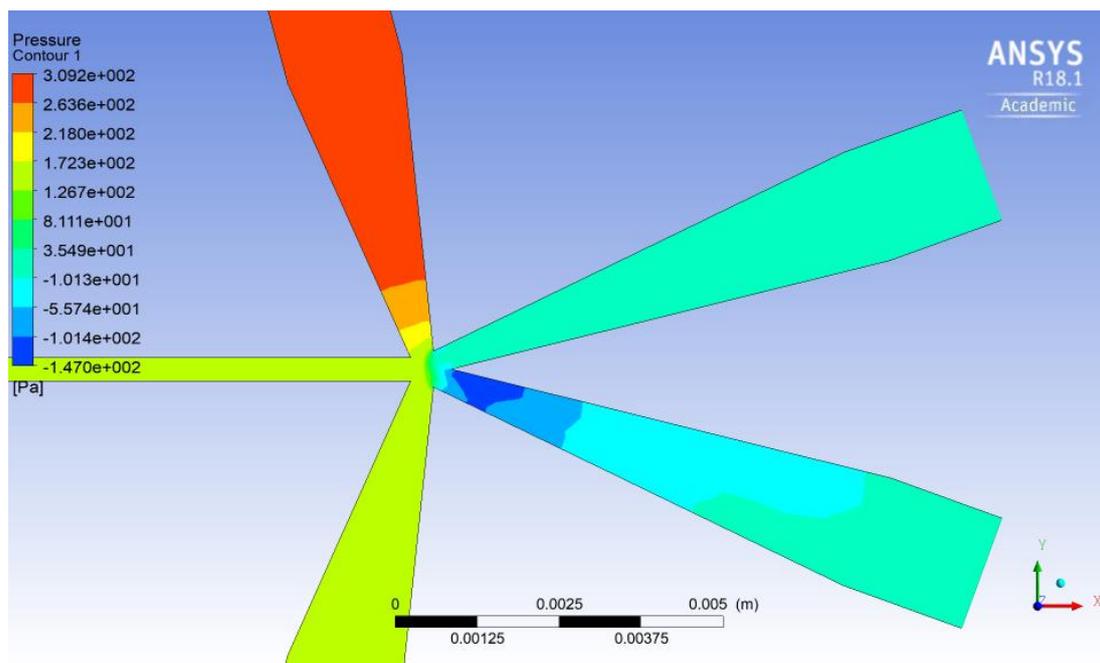


Figura 72: Distribución Presión en la zona central modelo 2 L4 Caso 2. Fuente Propia

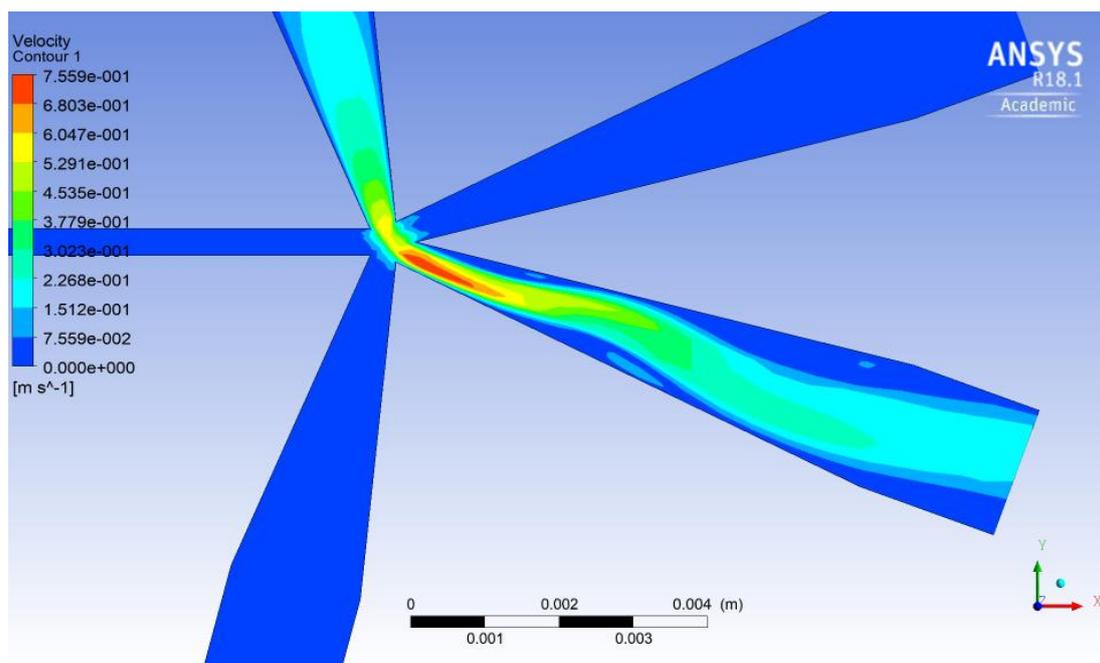
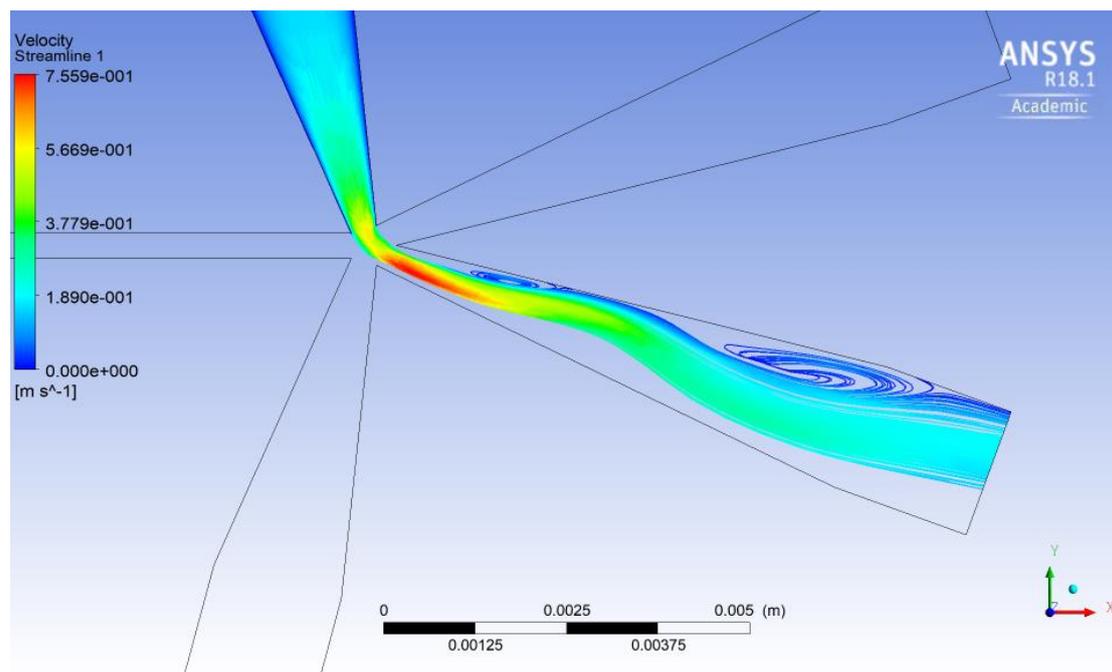


Figura 73: Distribución Velocidad en la zona central modelo 2 L4 Caso 2. Fuente Propia



**Figura 74: Líneas flujo (Streamline) en la zona central modelo 2 L4 Caso 2. Fuente Propia**

Analizando los resultados, puede verse, que se obtiene un comportamiento similar al caso anterior con diferentes condiciones de funcionamiento, por lo que se toma como válido.

Observando la figura 72, puede verse como presenta una distribución de presiones muy similar a la obtenida para el caso 1 (figura 69). Por otro lado, analizando la distribución de velocidades (figura 73), puede verse un incremento de esta dado el incremento de la velocidad en la entrada 1. Sin embargo, si se compara con la figura 70 (caso 1), ambas distribuciones son muy similares. Por último, observando la figura 74, puede verse como se genera un vórtice cerca de la abertura, causado muy probablemente debido al aumento de la velocidad del flujo.

Cabe destacar que, en este caso hay una mayor diferencia entre los caudales, los cuales ahora son respectivamente para las entradas 2 y 3 19,2 mL/min y 1,98≈2 mL/min. Por otro lado la velocidad en la zona de inspección está en torno a los 5 cm/s, siendo superior a los 2 cm/s fijados como requisito. En este caso se ha decidido relajar dicho requisito, con el objetivo de conseguir su funcionamiento en el laboratorio, ya que un parámetro vital para que funcionara bien fue el caudal de la entrada 1, fuertemente relacionado con la velocidad en la zona de inspección.

### 4.3. SIMULACIÓN CON COMSOL MULTIPHYSICS

Por otro lado, también se ha utilizado el simulador Comsol, ya que este permite de forma fácil, realizar simulaciones temporales introduciendo las funciones temporales, por lo que se ha utilizado para ver la evolución temporal del flujo y ver cómo funciona el dispositivo, ante pulsaciones de flujo producidas por la bomba.

A continuación se va a mostrar tanto los diferentes pasos y parámetros para la configuración de Comsol Multiphysics, además de los resultados obtenidos para los modelos elegidos para *C. elegans* L1 y *C. elegans* L4. Cabe destacar que, para su uso, se ha consultado el manual de referencia de Comsol [80] y el ejemplo de microfluídica descrito en [81].

### 4.3.1. Configuración de Comsol Multiphysics

En primer paso es seleccionar el tipo de proyecto, en este caso se elige Nuevo Asistente de Modelo (figura 75A) y posteriormente la dimensión, en este caso 3D (figura 75B).



Figura 75: Configuración del tipo de estudio. Fuente propia

Tras esto se debe indicar la/s física/s que van a ser relevantes en la simulación. En este caso se indica flujo laminar (figura 76A) y estudio estacionario (figura 76B). En el caso que se desee ver la evolución temporal puede seleccionarse en este paso, o añadirla más adelante sin ningún problema una vez creado el proyecto.

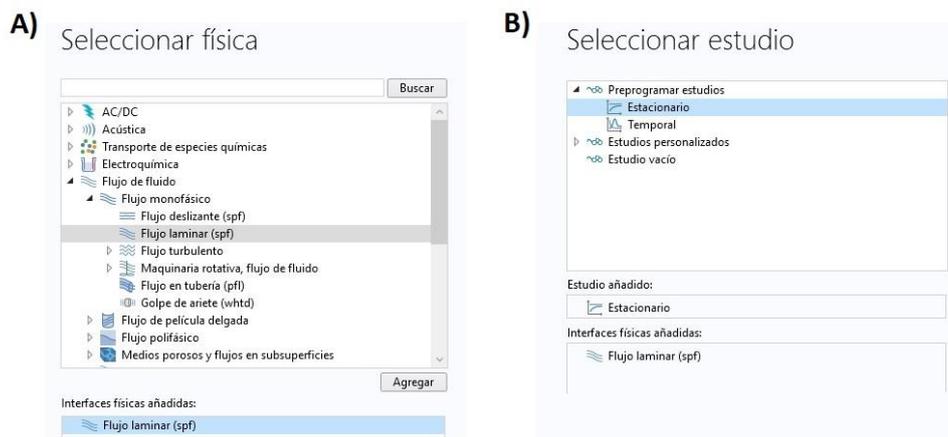
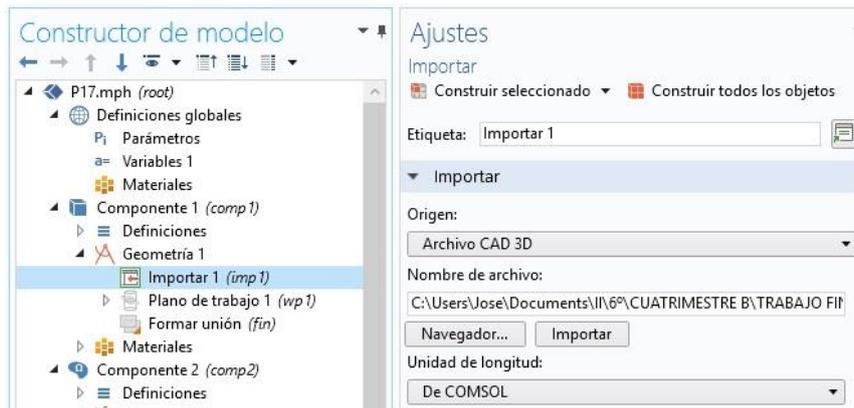


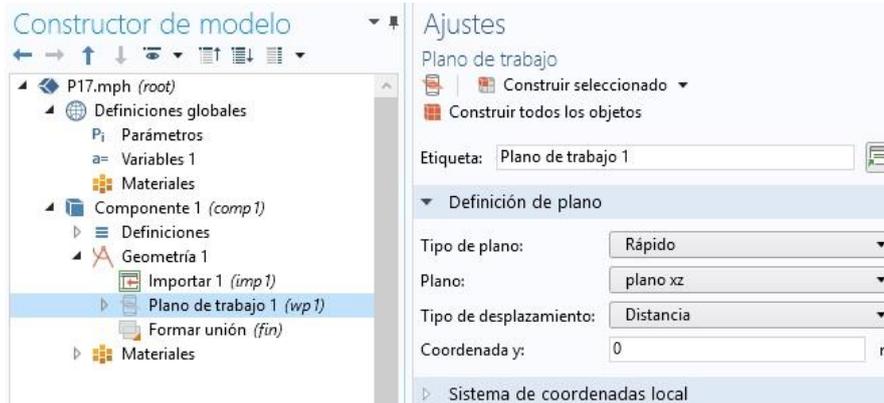
Figura 76: Configuración de la física y el paso temporal. Fuente propia

Una vez definida la configuración del proyecto se procede a importar la geometría a estudiar. En este caso a diferencia de Ansys, se debe crear un volumen 3D del interior, el cual va a ser importado en el programa. De este modo la ventana de importación presenta la siguiente forma:



**Figura 77: Pestaña Importar en Comsol Multiphysics. Fuente propia**

Cabe destacar que, es importante marcar como unidades las de Comsol, ya que si no el programa no realiza el cálculo correctamente. Una vez importada la geometría, se procede a crear una sección 2D de la misma con el objetivo de reducir la complejidad y el coste computacional. De este modo, se crea un plano de corte en xz tal y como puede verse a continuación:



**Figura 78: Plano de Trabajo Comsol. Fuente propia**

Posteriormente se debe crear un nuevo componente, en este caso 2D, el cual contendrá la sección creada anteriormente y con el cual se realizará el cálculo. De este modo una vez creado el componente, para importar la sección se debe crear en este una sección transversal mediante la opción marcada en la figura 79:

## Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

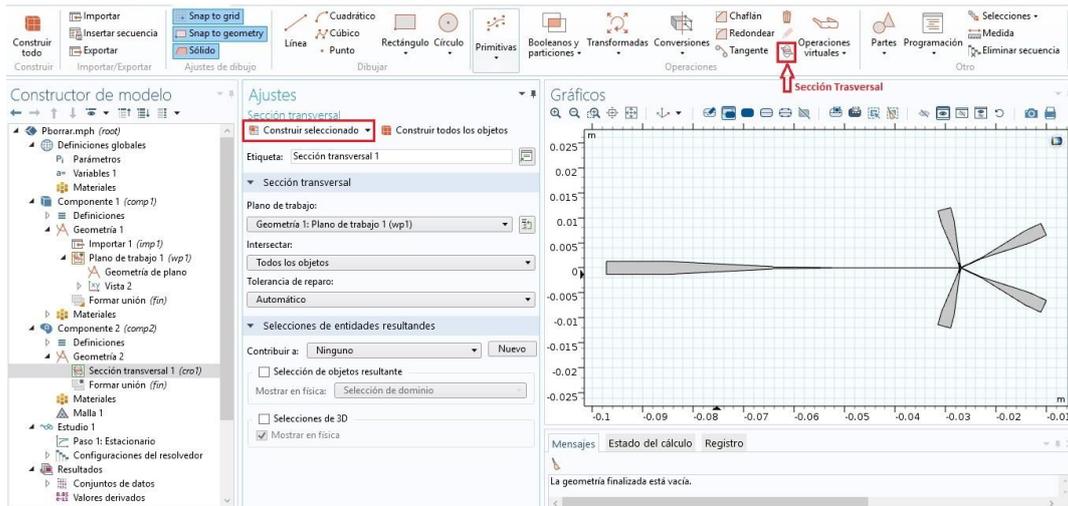


Figura 79: Creación del componente 2D. Fuente propia

Una vez creada, se debe seleccionar la opción *construir seleccionado*, importando así la sección al componente 2D. Posteriormente, se procede a eliminar la física creada al comienzo en el componente 1 (3D) y a añadirla en el componente 2 (2D), evitando así realizar cálculos innecesarios.

Una vez creada la geometría, se procede a configurar el resto de parámetros de simulación igual que en Ansys. En primer lugar, se indica como material el agua. Por otro lado se establecen las mismas condiciones de contorno establecidas en Ansys, a la vez que se indican las diferentes entradas y salidas:

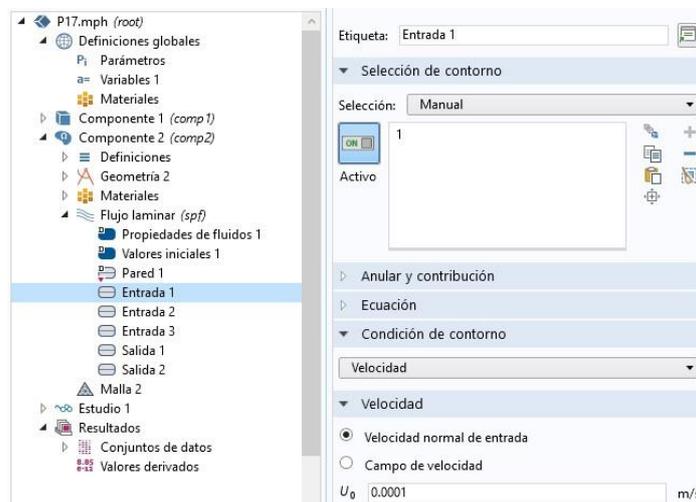
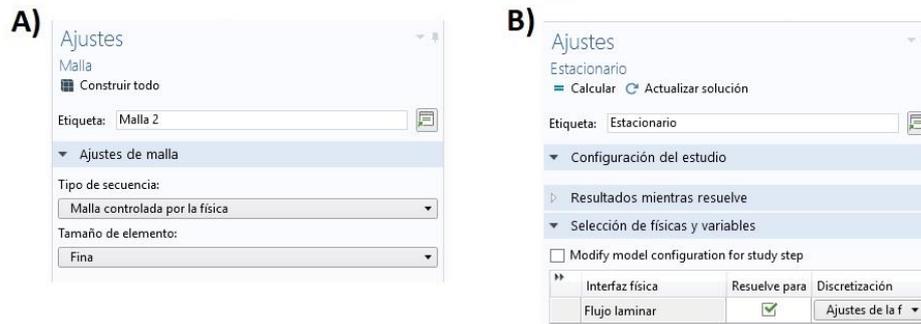


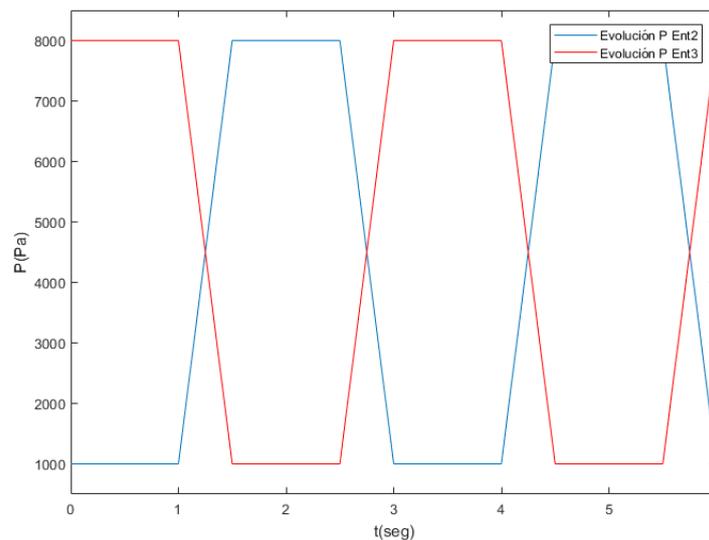
Figura 80: Condiciones de contorno utilizadas en Comsol. Fuente propia

Posteriormente, se procede al mallado, optándose por una malla fina con el fin de no incrementar excesivamente el tiempo de cómputo (figura 81A). Finalmente se lanza la simulación (figura 81B). Cabe destacar que se ha mantenido la configuración por defecto, estableciendo la tolerancia relativa en 0.001 al igual que en Ansys.



**Figura 81: A) Ventana de mallado. B) Ventana de Cálculo. Fuente propia**

En el caso de haber deseado una simulación donde van variando los parámetros, en la pestaña *Estudio*, puede añadirse el paso Temporal. Cabe destacar que previamente hay que deshabilitar o eliminar el anterior paso para evitar problemas durante la simulación. Indicar que dicha opción temporal, fue usada para ver la evolución temporal de los parámetros en el dispositivo, alternando las presiones en las entradas 2 y 3 (figura 82) con el fin de comprobar que el dispositivo funcionaba correctamente.



**Figura 82: Evolución de la presión en entradas 2 y 3 para paso temporal. Fuente propia**

Por otro lado, también se verificó el comportamiento ante una pulsación en la bomba. Se introdujo una pulsación senoidal de una determinada frecuencia y amplitud, en los tramos de presión constante. De este modo se comprobó que las bombas utilizadas eran válidas, ya que su pulsación puede llegar hasta un 10% del valor y se recomienda trabajar con frecuencias por encima de 10Hz.

Un aspecto destacable de este programa, es que permite definir parámetros en base a fórmulas matemáticas dependientes de otros parámetros como puede ser el tiempo de simulación. De este modo, pueden ser utilizados directamente al definir las condiciones de contorno. A continuación (figura 83), puede verse una vista de estos parámetros para el caso de simulación con paso temporal:

A) Parámetros			
Nombre	Expresión	Valor	Descripción
p2	8000[Pa]	8000 Pa	
p1	1000[Pa]	1000 Pa	
t1	0[s]	0 s	
t2	1[s]	1 s	
t3	1.5[s]	1.5 s	
t4	2.5[s]	2.5 s	
t5	3[s]	3 s	
t6	4[s]	4 s	
t7	4.5[s]	4.5 s	
t8	5.5[s]	5.5 s	
t9	6[s]	6 s	

B) Variables		
Nombre	Expresión	Unidad
f1	p2	Pa
f10	$((p2-p1)/(t3-t2))*t+((p1*t3-p2*t2)/(t3-t2))$	Pa
f11	p2	Pa
f12	$((p2-p1)/(-t5+t4))*t+((p1*t4-p2*t5)/(-t5+t4))$	Pa
f13	p1	Pa
f14	$((p2-p1)/(t7-t6))*t+((p1*t7-p2*t6)/(t7-t6))$	Pa
f15	p2	Pa
f16	$((p2-p1)/(-t9+t8))*t+((p1*t8-p2*t9)/(-t9+t8))$	Pa
f2	$((p2-p1)/(-t3+t2))*t+((p1*t2-p2*t3)/(-t3+t2))$	Pa
f3	p1	Pa
f4	$((p2-p1)/(t5-t4))*t+((p1*t5-p2*t4)/(t5-t4))$	Pa
f5	p2	Pa
f6	$((p2-p1)/(-t7+t6))*t+((p1*t6-p2*t7)/(-t7+t6))$	Pa
f7	p1	Pa
f8	$((p2-p1)/(t9-t8))*t+((p1*t9-p2*t8)/(t9-t8))$	Pa
f9	p1	Pa
Pent2	$f1*(t<t2)+f2*(t>=t2)&&(t<t3))+f3*(t>=t3)&&(t<t4))+f4*(t>=t4...$	Pa
Pent3	$f9*(t<t2)+f10*(t>=t2)&&(t<t3))+f11*(t>=t3)&&(t<t4))+f12*(t>...$	Pa

Figura 83: Definición de los parámetros de simulación para el caso temporal. Fuente propia

Tal y como puede ver en la figura 83, aparecen dos tipos de datos. El primero de ellos, *Parámetros*, se ha usado para aquellos valores constantes. Por otro lado el tipo *Variables*, se ha usado para aquellas variables cuyo valor es fruto de una operación matemática, siendo su valor dependiente del tiempo de simulación.

#### 4.3.2. Resultados

Una vez descrita la configuración establecida en Comsol, se procede a analizar los resultados obtenidos para los modelos elegidos. En primer lugar se va analizar el resultado para el modelo para *C. elegans* L1.

De este modo tras la simulación estacionaria se obtuvo:

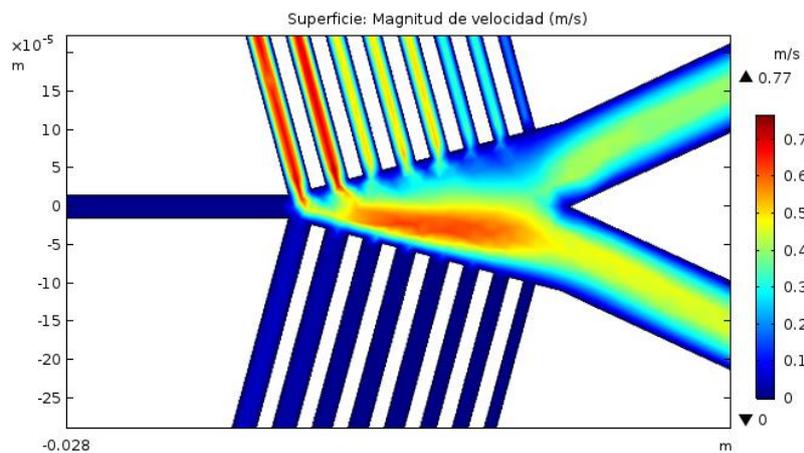
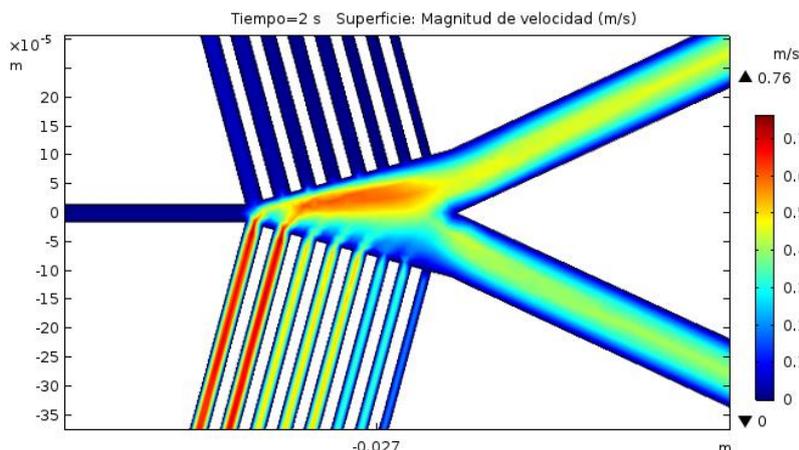


Figura 84: Distribución Velocidad en la zona central modelo 5. Fuente Propia

Tal y como puede verse si se compara con la figura 58, el resultado obtenido es casi idéntico al obtenido en Ansys. La velocidad tiene una distribución similar, y los valores obtenidos están dentro del mismo orden de magnitud, por lo que puede deducirse que el resultado es correcto.

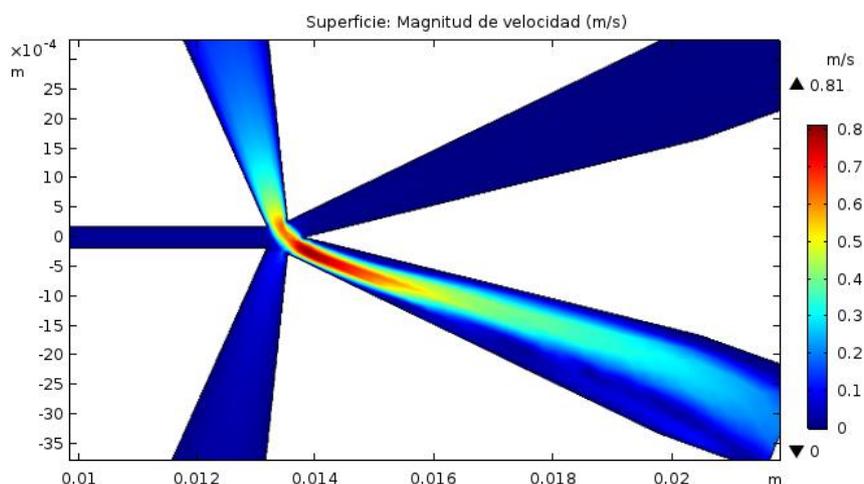
Por otro lado al realizar la simulación temporal pudo comprobarse que el funcionamiento era correcto. A continuación (figura 85), puede verse una imagen de la distribución de velocidad para el caso de  $p3 > p2$ :



**Figura 85: Distribución Velocidad en la zona central modelo 5 caso  $p_3 > p_2$ . Fuente Propia**

Por último, también se verificó hasta que límite de oscilación se podía llegar sin afectar al correcto funcionamiento, de este modo se verificó que con frecuencias de trabajo superiores a 5 Hz incluso con una variación cercana al 100% (doble del valor), el sistema seguía funcionando correctamente, luego las bombas elegidas cumplían sobradamente con este requisito.

Una vez analizado el resultado obtenido el modelo para *C. elegans* L1, se procede a analizar el resultado para el modelo elegido para *C. elegans* L4, para las condiciones de  $v_1=1,8$  mm/s,  $p_1=1000$  Pa,  $p_2=280$  Pa,  $p_3=150$  Pa. De este modo, tras la simulación se obtuvo el siguiente resultado:



**Figura 86: Distribución Velocidad en la zona central modelo 2 L4. Fuente Propia**

Tal y como puede verse si se compara con la figura 70, puede verse que el resultado obtenido es muy similar al obtenido en Ansys. La velocidad tiene una distribución similar, y los valores obtenidos están dentro del mismo orden de magnitud. De este modo se considera que el resultado obtenido es correcto.

Por último, en este caso también se verificó en este modelo hasta que límite de oscilación se podía llegar sin afectar al correcto funcionamiento, de este modo se verificó que con frecuencias de trabajo superiores a 2 Hz, el sistema funcionaba correctamente.

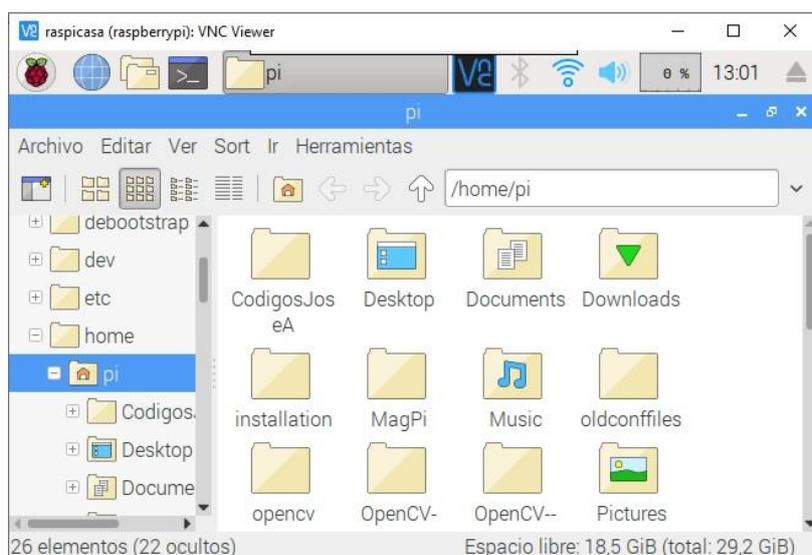
## CAPÍTULO 5. PROGRAMACIÓN Y PUESTA EN MARCHA

### 5.1. PROGRAMACIÓN

A continuación, se van a describir los diferentes pasos y partes que componen la programación de los dispositivos, para el correcto funcionamiento del dispositivo, así como la descripción del código a utilizar.

#### 5.1.1. Configuración y manejo de Raspberry Pi

El primer paso fue la instalación del sistema operativo de la Raspberry Pi, grabando la imagen en una tarjeta microSD, la cual hace de disco duro. Se optó por la distribución oficial Raspbian, la cual está basada en una distribución de Linux Debian adaptada para la Raspberry.



**Figura 87: Entorno gráfico Raspberry Pi desde VNC. Fuente propia**

Una vez realizada la instalación, se procede a instalar aquellas librerías y software necesario. Como librerías necesarias destacan la de OpenCV, necesaria para llevar a cabo el procesamiento de las imágenes, la librería *raspicam*, la cual es necesaria para manejar la cámara de la Raspberry desde OpenCV y por último la librería *WiringPi*, encargada de generar y leer señales digitales en Raspberry.

El lenguaje elegido para la programación es C++, luego es necesario un programa para construir y compilar el código, de este modo se opta por el programa Cmake. Tal y como se describe en su sitio web [82], se trata de un software open-source encargado de generar los makefiles y todos los archivos de configuración necesarios para el funcionamiento del código.

Previamente es necesario crear el archivo CMakeLists.txt, el cual le indica a Cmake los archivos del proyecto y las librerías que hay que añadir y donde buscarlas, además de indicarle la versión a usar. De este modo el archivo CMakeLists.txt usado es:



```
cmake_minimum_required (VERSION 2.8)

set(CMAKE_MODULE_PATH "/usr/local/lib/cmake/${CMAKE_MODULE_PATH}")
find_package(raspicam REQUIRED)
find_package(OpenCV)

add_executable (main camera1_opencv.cpp)
target_link_libraries (main ${raspicam_CV_LIBS})
target_link_libraries(main wiringPi)
```

**Figura 88: CMakeLists utilizado. Fuente propia**

En verde aparece el nombre del archivo con el código y en rojo aparece el nombre del proyecto. Cabe destacar que el archivo ejecutable que se creará, tendrá el nombre que se haya asignado al proyecto.

Una vez generado el archivo txt, se procede a generar el archivo *makefile* y demás archivos. De este modo estando situados dentro de la ruta del código fuente, se ejecutan los siguientes comandos:

```
> mkdir Build && cd Build
> cmake ..
```

Se crea el directorio *Build*, en el cual estarán todos los archivos de compilación y el ejecutable del programa una vez compilado. Los archivos *makefile*, son los archivos que usa *make* para la compilación del programa. Se encargan de especificar las diferentes librerías a usar, instrucciones para la compilación y una serie de reglas implícitas y explícitas, además de los diferentes archivos que componen el proyecto [83].

Finalmente se compila el código mediante:

```
> make
```

En caso de errores de compilación se mostrará por pantalla. Si todo el proceso se ha desarrollado sin problemas, indicará que ha sido compilado. Finalmente, mediante el siguiente comando se puede ejecutar el programa desde la línea de comandos:

```
> sudo ./main
```

A continuación (figura 89), puede verse una imagen de cómo quedaría la carpeta *Build* tras compilar el programa sin ningún error:



Figura 89: Resultado de la compilación. Fuente propia

A la hora de manejar la Raspberry Pi desde el pc, ha sido necesario el uso de varios programas tales como *Putty*, *WinSCP* y *VNC viewer*. El primero de ellos, es un cliente SSH el cual permite escribir directamente los diferentes comandos sobre el terminal de Raspberry. Por otro lado, *WinSCP* se trata de un cliente SFTP que al igual que *Putty*, emplea el protocolo SSH. Dicho programa se utiliza para la transferencia de archivos entre el pc y la Raspberry, evitando así la necesidad de usar memorias USB para la transferencia de datos entre estos dos. Cabe destacar que ambas son aplicaciones de software libre. A continuación (figura 90), puede verse una captura de pantalla de ambos programas:

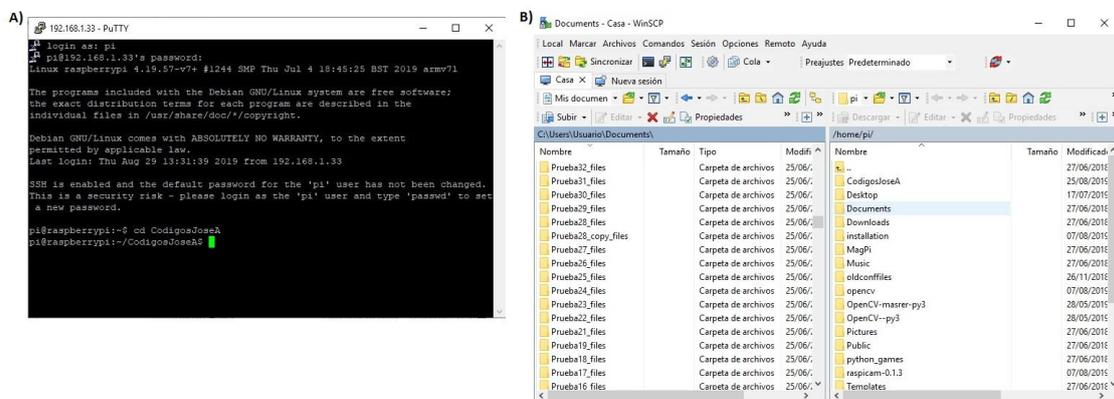


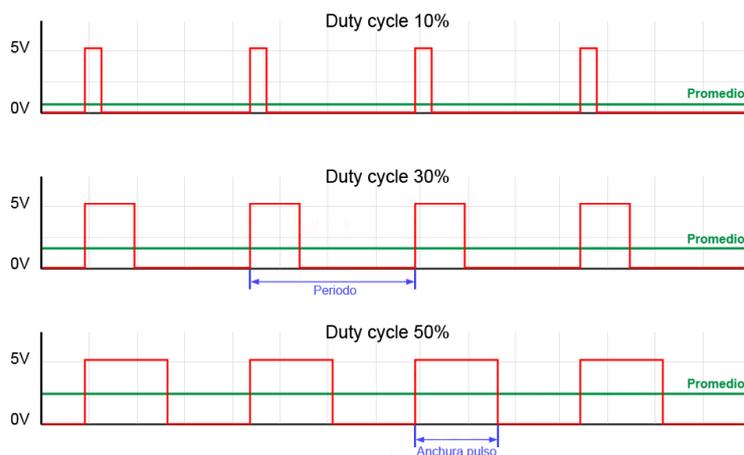
Figura 90: A) Putty. B) WinSCP. Fuente propia

Puesto que *Putty* no permite la apertura de ventanas emergentes necesarias para ver las imágenes capturadas, se hace uso de *VNC viewer* (figura 87), desde el cual se inicia la ejecución del programa.

### 5.1.2. Señales PWM y filtrado

Tal y como se ha comentado a lo largo del apartado 3.4, la placa Arduino Uno será la encargada de actuación sobre las bombas supervisada por la Raspberry Pi (apartado 3.4.2). Tanto en Arduino como en Raspberry, una forma simple de generar señales analógicas con un voltaje determinado, es mediante las señales PWM.

Una señal PWM (Pulse Width Modulation), es una onda cuadrada, la cual a lo largo del tiempo varía entre un nivel alto (5V en Arduino) y un nivel bajo (0V en Arduino). Manteniendo constante la frecuencia de generación y variando el ancho de pulso, es decir activar la salida digital durante un porcentaje de tiempo y mantenerla apagada el resto, es posible generar una señal analógica, de modo que el promedio de dicha señal, es el valor de la señal analógica deseada. A continuación (figura 91), puede verse unos ejemplos de señales PWM, para diferentes voltajes promedio:



**Figura 91: Señales PWM. Fuente [84]**

El porcentaje de tiempo que esta la señal activada respecto al total, es el ciclo de trabajo o ‘Duty Cycle’. De este modo el ‘Duty Cycle’ puede calcularse mediante:

$$Duty\ Cycle\ (\%) = 100 \cdot \frac{V_{deseado}}{(V_{max} - V_{min})} \quad (ec. 18)$$

Que en el caso de Arduino,  $V_{max}=5\text{ V}$  y  $V_{min}=0\text{ V}$ , luego la ecuación 18 puede reescribirse como:

$$Duty\ Cycle\ (\%) = 20 \cdot V_{deseado} \quad (ec. 19)$$

La placa Arduino Uno dispone de salidas PWM de 8bits, por lo que dicho valor de ‘Duty Cycle’ se debe introducir como un entero (int) entre 0 y 255 (en Raspberry son 10 bits, luego está entre 0 y 1024), de este modo se puede emplear la siguiente ecuación para la conversión:

$$Duty\ Cycle\ (bits) = \frac{Duty\ Cycle\ (\%) \cdot 255}{100} \quad (ec. 20)$$

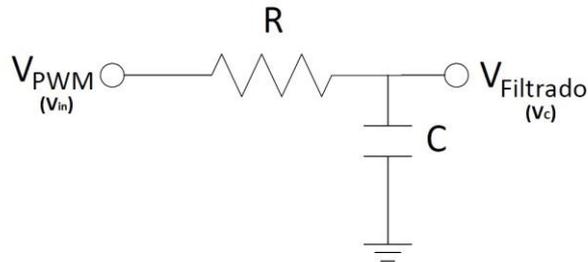
Cabe destacar que, puesto que se está trabajando con enteros, en el caso de obtener un valor con decimales se debe hacer un truncamiento tal y como se menciona en las referencias [85] y [86]. De este modo a continuación (Tabla 9), se puede ver la equivalencia en bits para valores típicos de ‘Duty Cycle’:

Valor en bits	Duty Cycle
0	0%
63	25
127	50%
191	75%
255	100%

**Tabla 9 Equivalencia en bits para diferentes ‘Duty Cycle’**

La forma de generar la señal PWM en Arduino es mediante el comando *analogWrite(pin, value)*, donde pin indica el pin a usar y value el valor entero de Duty Cycle. En el caso de Raspberry con la librería WiringPi, la función es *pwmWrite (int pin, int value)*, siendo los parámetros similares a la de Arduino.

Tal como se ha hablado anteriormente una señal PWM, va cambiando entre un valor máximo (5V) y uno mínimo (0V), por lo que si la tensión máxima admisible de un dispositivo es menor a 5V, podemos llegar a dañarlo si es alimentado directamente con la señal PWM. Resulta adecuado el uso de un filtrado mediante un filtro RC paso bajo, de modo que la señal resultante se asimile en mayor medida a una señal continua y analógica. De este modo el esquema eléctrico sería:



**Figura 92: Filtro RC pasa bajo. Plano 7**

Analizando el esquema resultante se deduce:

$$G(s) = \frac{1}{1 + R \cdot C \cdot s} \quad (\text{ec. 21})$$

$$i(t) = C \cdot \frac{dV_C(t)}{dt} \quad (\text{ec. 22})$$

Sustituyendo ec. 22 en la ec. 21, se obtiene:

$$V_C(t) = V_{in}(t) - R \cdot C \cdot \frac{dV_C(t)}{dt} \quad (\text{ec. 23})$$

Aplicando la transformada de Laplace para condiciones iniciales nulas se tiene:

$$V_C(s) = V_{in}(s) - R \cdot C \cdot s \cdot V_C(s) \quad (\text{ec. 24})$$

Reordenando, finalmente la función de transferencia del filtro paso bajo RC, es:

$$G(s) = \frac{1}{1 + R \cdot C \cdot s} \quad (\text{ec. 25})$$

Como puede verse se trata de un sistema de primer orden, donde la constante de tiempo ( $\tau$ ) es R·C.

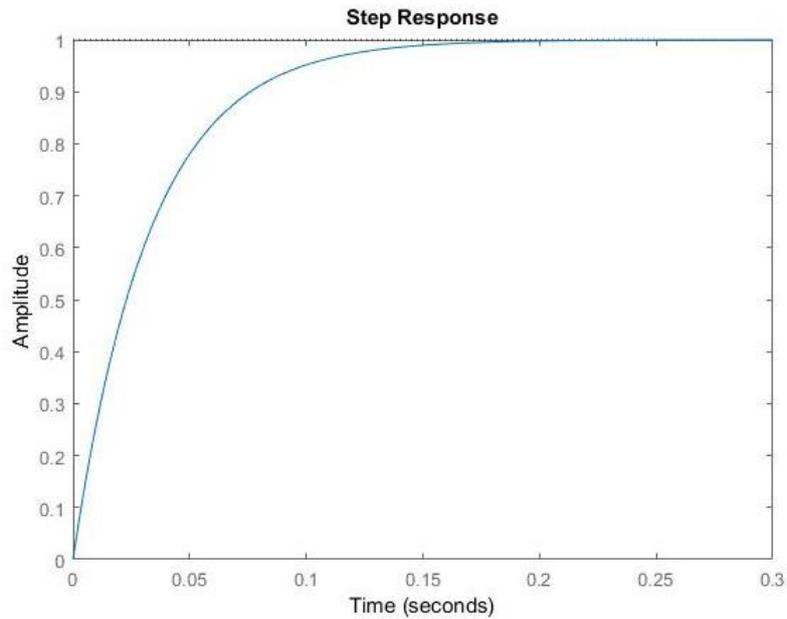
A la hora de la selección de los parámetros del filtro es necesario tener en cuenta la frecuencia de generación del PWM. En el caso de Arduino Uno es de 490 Hz excepto los pines 5 y 6 que es 980 Hz. En el caso de Raspberry es 3000 kHz, la cual usando el divisor (`pwmSetClock(1000)`), se puede reducir a unos 457 Hz asemejándose a Arduino.

Finalmente, tras diversas pruebas, se opta por tomar R=3.3 kΩ y C=10μF, por lo que la función de transferencia y la frecuencia de corte son respectivamente:

$$G(s) = \frac{1}{1 + 0.033s} \quad (\text{ec. 26})$$

$$frec. corte (Hz) = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot C} = 4.2 \text{ Hz} \quad (\text{ec. 27})$$

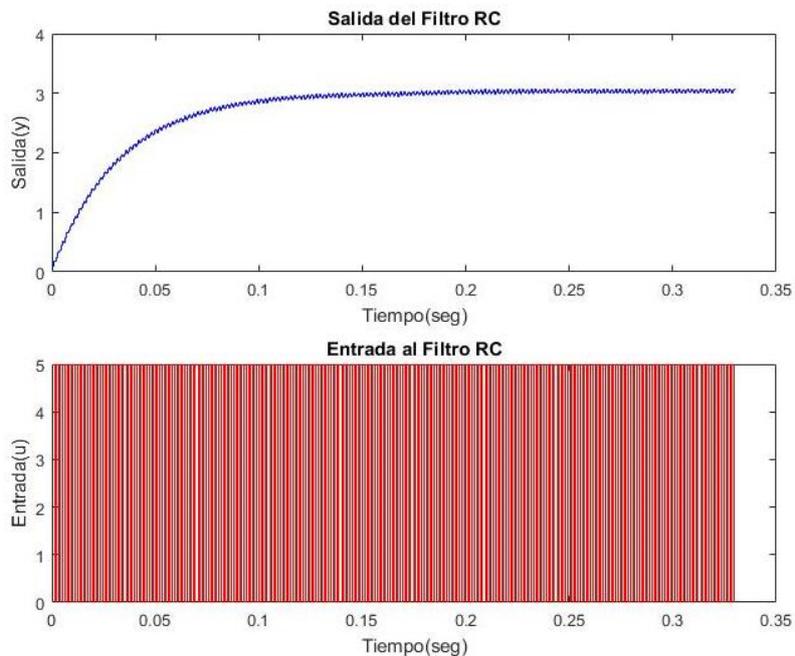
Siendo su respuesta temporal:



**Figura 93: Respuesta temporal filtro. Fuente propia**

Como puede verse el filtro presenta un tiempo de establecimiento al 98 % ( $4\tau$ ) de 0.132 seg, el cual es bajo.

A continuación (figura 94), puede verse como quedaría la señal filtrada, para una señal PWM a 490 Hz y Duty Cycle del 60% (3V):



**Figura 94: Ejemplo de señal filtrada. Fuente propia**

Como puede verse la señal filtrada presenta un rizado muy pequeño (distancia pico-pico aproximadamente 0.072 V), por lo que se trata de un buen filtro. Cabe destacar que un aumento

de R y C implica un menor rizado, sin embargo, el tiempo de establecimiento se incrementa, por lo que es necesario llegar a un compromiso entre estos dos aspectos para un buen funcionamiento del filtro.

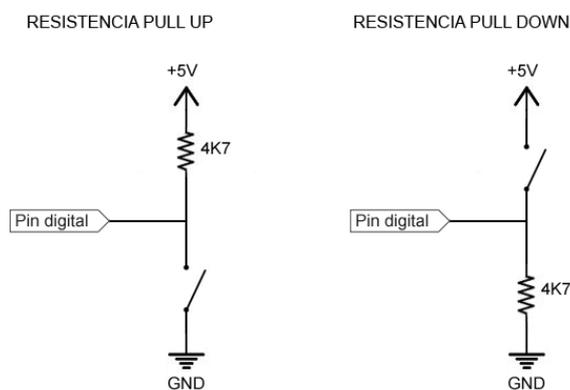
### 5.1.3. Comunicación Arduino-Raspberry

Tal y como se ha comentado en anteriores apartados, Arduino es el encargado de actuar sobre las bombas, supervisado por la Raspberry Pi, la cual debe indicarle el punto de funcionamiento según el caso detectado, por lo que es necesario establecer una comunicación entre ambas placas.

De este modo existen dos alternativas para ello, la primera es mediante la comunicación por el puerto serie de Arduino. Sin embargo, con el fin de simplificar el código y poder visualizar la lectura de los voltajes suministrados tras el filtrado desde el IDE de Arduino, se descarta esta alternativa. Para mayor detalle de este proceso puede seguirse el ejemplo descrito en la referencia 87.

La otra opción es mediante la activación de una salida digital de la Raspberry Pi, con el uso de la librería Wiring Pi, la cual es leída por Arduino.

A diferencia de lo que ocurre con Raspberry Pi, Arduino no consta de resistencias pull up (normalmente cerrado) y pull down (normalmente abierto), por lo que para evitar la indeterminación de estado, es necesaria su inclusión, por ejemplo, cuando se trabaja con un pulsador o por ejemplo en este caso, donde es necesaria la configuración pull down, ya que sin esta configuración se producía una indeterminación al leer el estado de la señal. A continuación (figura 95), puede verse una imagen donde se describen estas dos configuraciones:



**Figura 95: Configuraciones Pull up, Pull down. Fuente [88].**

Por otro lado, tal y como pudo comprobarse con ayuda de un osciloscopio, había una diferencia entre las masas de Arduino y Raspberry. De hecho, al hacer una lectura de una señal de Raspberry desde Arduino, la señal era muy diferente a la que debía ser. Este fenómeno fue solucionado leyendo también la masa de Raspberry, de este modo se trabaja en todo momento con la misma masa. De este modo a continuación (figura 96), puede verse la forma en que se estableció el montaje de la conexión:

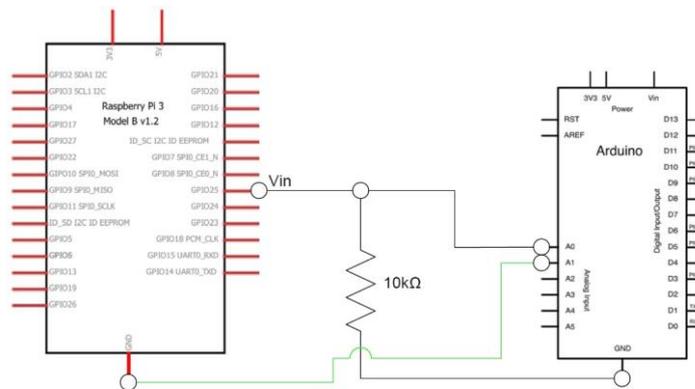


Figura 96: Comunicación Raspberry Pi-Arduino. Fuente propia.

Para mayor detalle de la interconexión puede consultarse el plano 7 del apartado *planos*.

Para generar la señal digital en Raspberry Pi, se hizo uso de la librería Wiring Pi, en concreto se utilizó la función *digitalWrite (int pin, int value)* [89], donde *pin* indica el pin a usar y *value* el valor, siendo 1 o 0. Cabe destacar que previamente se debe realizar la inicialización de Wiring Pi y definir el pin a utilizar como salida (OUTPUT). Esta parte podrá verse con mayor detalle en el siguiente apartado.

#### 5.1.4. Descripción del Código y funcionamiento

Una vez definida la forma de compilar, como generar las señales PWM y la comunicación entre las placas, se procede a describir las diferentes partes de las que se compone el montaje.

En primer lugar, se va a analizar el código desarrollado para Raspberry Pi. De este modo el primer paso consiste en la definición de las diferentes librerías a utilizar, y la definición de los pines a utilizar en Raspberry Pi:

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <iostream>
#include <wiringPi.h>
#include "opencv2/core.hpp"
#include "opencv2/imgproc.hpp"
#include "opencv2/highgui.hpp"
#include "opencv2/videoio.hpp"
#include "opencv2/imgcodecs.hpp"
#include <raspicam/raspicam_cv.h>
#include <raspicam/raspicam.h>
using namespace std;
using namespace cv;

void pantalla1();

// Declaraciones de Los pines de Raspberry Pi para WiringPi. Se usa nomenclatura
// Broadcom:
const int pwmPin1 = 25; // Pin que manda a Arduino, 0 -> configuración por defecto;
// 1-> configuración flúor - Broadcom pin 25, es el pin 22 de Raspberry
const int butPin2 = 27; // Active-Low button - Broadcom pin 22, P1 pin 15. Pulsador
// para salir del While
```

Posteriormente, dentro del main se debe realizar la configuración de WiringPi indicando los diferentes pines a usar y el tipo de los mismos:

```
int main(){

    // Configuración de WiringPi:
    wiringPiSetupGpio(); // Initialize wiringPi -- using Broadcom pin numbers
    pinMode(pwmPin1, OUTPUT); //Actuación sobre Arduino
    pinMode(butPin2, INPUT); // botón para salir
    pwmSetClock (1000);

    digitalWrite (pwmPin1, 0); //Configuración por defecto

    //Variables generales:
    int opc;
    int opc_ant=0;
    int salir=0;
    //Variables de la imagen a tomar:
    int width=1280;
    int height=960;
    cv::Mat imagen_color;
    cv::Mat imagen_gris;
    cv::Mat imagen;

    //Variables del histograma:
    cv::Mat hist; //Para histograma en grises
    cv::Mat hist_c; //Para histograma de color
    int canales[1] = { 0 };
    int canales_c[1] = { 2 };
    int bins[1] = { 256 };
    float rango[2] = { 0, 256 };
    const float *rangos[] = { rango };
    double max;
    int hist_size =256;
    cv::Point pos_max;
```

Tras la definición de variables, se procede mostrar una pantalla de bienvenida al programa, dada por la función *pantalla1()*. Por otro lado, se definen los diferentes parámetros de la configuración de la cámara:

```
pantalla1();
namedWindow("window", WINDOW_AUTOSIZE);

//Configuración cámara:
raspicam::RaspiCam_Cv Camera;
Camera.set ( CV_CAP_PROP_FRAME_WIDTH, width );
Camera.set ( CV_CAP_PROP_FRAME_HEIGHT, height );
Camera.set ( CV_CAP_PROP_BRIGHTNESS, 30 );
Camera.set ( CV_CAP_PROP_CONTRAST, 80 );
Camera.set ( CV_CAP_PROP_SATURATION, 20 );
Camera.set ( CV_CAP_PROP_GAIN, 50 );
Camera.set ( CV_CAP_PROP_FPS, 1 );
Camera.set (CV_CAP_PROP_EXPOSURE,50); //Velocidad obturación. 50 eq. a 16,5 ms
Camera.set (CV_CAP_PROP_WHITE_BALANCE_BLUE_U, 1);
Camera.set (CV_CAP_PROP_WHITE_BALANCE_RED_V, 1);
Camera.set ( CV_CAP_PROP_FORMAT, CV_8UC3 ); //Adquisición imagen en color

cout<<"Connecting to camera"<<endl;
if ( !Camera.open() ) {
    cerr<<"Error opening camera"<<endl;
```

```
    return -1;  
}
```

Tal y como puede verse las ganancias de rojo y azul se dejan con valor 1, para desactivar el modo automático.

A continuación (figura 97), puede verse como quedaría la pantalla de bienvenida diseñada:

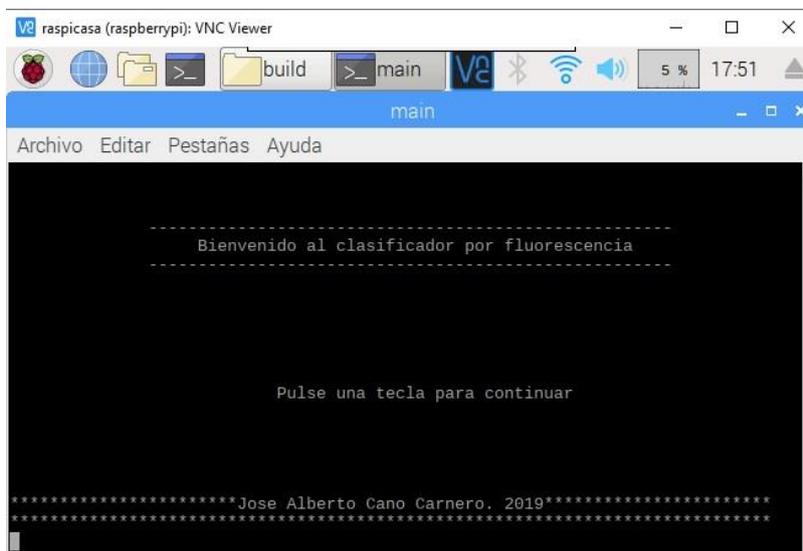


Figura 97: Menú de bienvenida. Fuente Propia

Tal y como puede verse se ha optado por una interfaz simple con el fin de simplificar la programación. A continuación, puede verse el bucle *While*, dentro del cual se realiza todo el proceso de visión.

```
while(salir!=1) //Salida mediante botón  
{  
    //Detectar si se desea salir:  
    salir=digitalRead (butPin2);  
  
    //Tomando foto (frame):  
    Camera.grab();  
    Camera.retrieve (imagen);  
    cv::imshow("window", imagen); //Mostrar imagen  
    waitKey(1);  
}
```

La condición para salir del *While*, es mediante la activación de un pulsador conectado a la Raspberry, por lo que el primer paso será la lectura del estado de la entrada asociada al pulsador. En caso de que no este activo, se continúa con el bucle. Tras la comprobación anterior, se procede a la captura de la imagen. Al realizar la captura dentro del *While*, el resultado es un video a través de la ventana *Window*, por lo que cada imagen capturada sería un 'frame' del video.

Tal y como se comentó en el apartado 3.1, no fue posible la obtención de *C. elegans* con fluorescencia, por lo que se optó por intentar clasificarlos enviando los gusanos pares por una salida y los impares por la otra. En el caso de haber sido posible obtener *C. elegans* con fluorescencia, la forma de proceder hubiera sido la siguiente:

```
//Parte de procesado de imagen:
//Histograma de canal Rojo:
calcHist(&imagen, 1, canales_c, cv::noArray(), hist_c, 1, bins, rangos);

//Cálculo del máximo y posición en del histograma
cv::minMaxLoc(hist_c, 0, &max, 0, &pos_max, cv::noArray());
printf("Maximo %f en %d\n", max, pos_max.y);

// Mostrar histograma:
int hist_ancho = 512; int hist_alto = 400;
int bin_w = cvRound((double)hist_ancho/hist_size);
Mat histImage(hist_alto, hist_ancho, CV_8UC3, Scalar(0, 0, 0));
normalize(hist_c, hist_c, 0, histImage.rows, NORM_MINMAX, -1, Mat());

for (int i = 1; i < hist_size; i++)
{
    line(histImage, Point(bin_w*(i - 1),
        hist_alto - cvRound(hist_c.at<float>(i - 1))),
        Point(bin_w*i, hist_alto - cvRound(hist_c.at<float>(i))),
        Scalar(255, 0, 0), 2, 8, 0);
}
namedWindow("Histograma", CV_WINDOW_AUTOSIZE);
imshow("Histograma", histImage);

//Parte de detección:
//DETECCION:
//Retorna opc=1 si se detecta fluorescente
//Retorna opc=0 si no se detecta fluorescente
```

En primer lugar, mediante *calcHist* [90] se procede a calcular el histograma del canal rojo y mediante *minMaxLoc* [91], se determina su máximo y en qué posición se encuentra. Se opta por calcular el histograma del canal rojo puesto que el tipo de fluorescencia a detectar es mCherry. Previamente se debería haber realizado un estudio con fotos de este tipo de *C. elegans*, con el objetivo de determinar aquel valor característico en el histograma, que lo diferencia del resto de gusanos y utilizar dicho valor para realizar la distinción. En función del resultado, se fuerza a *opc = 1* (detectado fluorescente) o *opc=0* (no se ha detectado fluorescencia). Por otro lado, también se muestra como generar la ventana para mostrar el histograma mediante las funciones *normalize* y *line* dentro del bucle *for*.

Puesto que finalmente se clasifica en función de si el gusano es par o impar, el primer paso es segmentar la imagen, para ello se en lugar de tomar la imagen en color, se toma directamente en gris sustituyendo CV\_8UC3 por CV\_8UC1, al hacer la configuración de la cámara:

```
Camera.set ( CV_CAP_PROP_FORMAT, CV_8UC1 ); //Adquisición imagen en gris
```

Por otro lado, también se definen nuevas variables necesarias para el proceso:

```
int conteo=0; //Lleva el conteo para determinar par o impar
int impares=0;
int pares=0;
//Variables de La imagen a tomar:
int width=1280;
int height=960;
cv::Mat imagen_s;
```

Una vez adquirida la imagen, mediante *threshold* [93] se procede a segmentar y mediante la función *findContours* [94], se detectan y cuentan el número de contornos (gusanos) detectados:

```
//Segmentación y conteo:
cv::threshold(imagen, imagen_s, 0, 255, cv::THRESH_OTSU);

namedWindow("segmentacion", 1);
imshow("segmentacion", imagen_s);
cv::imwrite ("imagen_seg.jpg", imagen_s);

vector<vector<cv::Point> > contornos;
vector<cv::Vec4i> h;
cv::findContours(imagen, contornos, h, CV_RETR_LIST,
CV_CHAIN_APPROX_NONE);
int numContours = contornos.size();
printf("Encontrados %d\n", numContours);

conteo=conteo+numContours;
```

El método escogido ha sido el *Otsu*, el cual es idóneo cuando las condiciones de iluminación varían a según el momento en que se realice el experimento.

Una vez detectados y contados, se hace la distinción mediante el operador %, el cual hace la división y devuelve el resto. Si este es 0 será par, en caso contrario será impar:

```
//Detectar par o impar:
if (conteo%2==0)
    opc=0; //Pares config. 1
else
    opc=1; //Impares config. 2
```

Cabe destacar que, puesto que es posible que detecte más de un *C. elegans*, puede que en dos iteraciones consecutivas el número pueda ser impar o par. Todo esto depende de la concentración de *C. elegans* con la que se trabaje.

Una vez determinado el caso, se hace una distinción para enviar una configuración u otra a Arduino:

```
//Opciones una vez se ha la hecho detección:
if((opc==1)&&(opc_ant!=opc))
{
    printf("Config 2\n");
    digitalWrite (pwmPin1, 1);
    opc_ant=opc;
    //mandar config 2
}

if((opc==0)&&(opc_ant!=opc))
{
    digitalWrite (pwmPin1, 0);
    printf("Config 1\n");
    opc_ant=opc;
    //mandar config 1
}
}
```

Finalmente, en el caso de haber salido (se ha activado el pulsador de salida), se libera la cámara y se envía la configuración 1 (configuración por defecto) al Arduino. Por último, se espera a la pulsación de una tecla en el caso de que se quiera revisar los datos de la consola, antes de finalizar el programa.

```
Camera.release();
digitalWrite (pwmPin1, 0);
printf("Fin de programa\n");
printf("Detectados: %d, Impares: %d Pares: %d\n", conteo, impares, pares);
getchar();
return 0;
}
```

Una vez explicado el programa a ejecutar en la Raspberry, se procede a analizar el diseñado para Arduino. Un programa para Arduino consta de 3 partes. En la primera parte, se definen las diferentes variables a utilizar:

```
int pinLed1=9;
int pinLed2=10;

//Valores de Duty Cycle:
//Caso1:
//int Vmax=99;
//int Vmin =19;
//Caso2:
int Vmax=120;
int Vmin=6;;

//Otros valores:
int tespera=3000; //Tiempo mínimo de espera en miliseg antes de retornar a la otra
//configuración.

float value = 0;
int val1=0;
int val2=0;
int val3=0;
float val_v1=0;
float val_v2=0;
float val_v3=0;
int conf=0;
int conf_ant=0;
```

Por otro lado, la segunda parte, *void setup* [95], es la parte en la que se realiza la configuración y se ejecutan aquellas instrucciones que solo se van a ejecutar una sola vez. En este caso, en dicha parte se configura la velocidad del puerto serie a 115200 baudios. Por otro lado, se fija la configuración por defecto para que el programa ya comience con esta y se configura la señal de frecuencia mediante la función *tone*, la cual generará una señal cuadrada de 40Hz entre 0 y 5 voltios.

```
void setup() {
  Serial.begin(115200); //iniciar puerto serie
  analogWrite(pinLed1,Vmax); //Config por defecto
  analogWrite(pinLed2,Vmin); //Config por defecto
  tone(2,40); //Señal de frecuencia 40Hz
}
```

Por último, en la tercera parte, *void loop* [96], se encuentra la parte del código que se ejecutará repetidamente mientras la placa se encuentre encendida. De este modo, en primer lugar, se lee el estado de la señal de Raspberry además del valor de GND de esta. Debido a problemas con la señal al realizar la lectura con `digitalRead()`, tanto la lectura del estado como la de GND, se realizan mediante `analogRead` y el valor resultante de la resta de ambas, se compara con 1,5 V (valores por debajo de 1,5 V son un 0 digital), para determinar el caso a tratar.

Una vez determinado el caso, se envía una opción u otra hacia las bombas. Cabe destacar que, resulta vital almacenar el estado anterior, con el objetivo de evitar que en cada iteración se sobrescriba el estado cuando el estado anterior es el mismo.

```
void loop() {
  //Lectura Entradas:
  val1 = analogRead(A0);
  val_v1=(5.0/1024)*val1;
  val2 = analogRead(A1);
  val_v2=(5.0/1024)*val2;
  val_v3=val_v1-val_v2;
  //Determinar la configuración a usar:
  if(val_v3<=1.5){
    conf=0;
  }
  else{
    conf=1;
  }

  //Actuación sobre las bombas:
  if((conf==0)&&(conf_ant!=conf)){
    analogWrite(pinLed1, Vmax);
    analogWrite(pinLed2, Vmin);
    conf_ant=conf;
    //Configuración 1
  }

  if((conf==1)&&(conf_ant!=conf)){
    delay(1);
    analogWrite(pinLed1, Vmin);
    analogWrite(pinLed2, Vmax);
    delay(tespera); //Esperar tespera
    conf_ant=conf;
    //Configuración 2
  }
}
```

El tiempo de espera dependerá de las diferentes pruebas, en este caso se prueba con 3 segundos, aunque la conmutación no fue posible a un tiempo inferior 50 segundos tal y como se comentará en el apartado 6.

## 5.2. PUESTA EN MARCHA Y MONTAJE

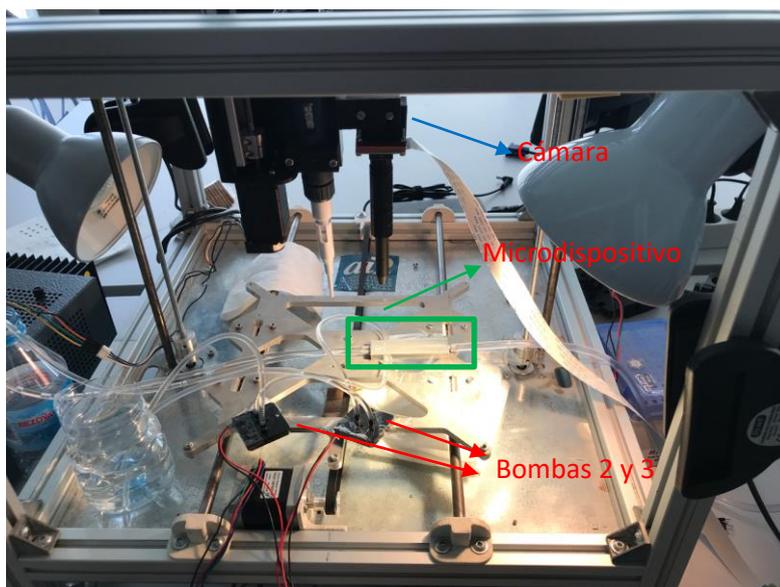
A lo largo del siguiente apartado se van a comentar los diferentes pasos a realizar durante las diferentes pruebas experimentales, además de comentar los diferentes montajes utilizados. Por último se tratará la configuración del sistema de visión.

### 5.2.1. Montaje

Durante las diferentes pruebas que se realizaron en el laboratorio, se fueron probando diferentes configuraciones con el objetivo de mejorar la solución.

El montaje fue colocado sobre el chasis de una impresora 3d antigua disponible en el laboratorio, la cual disponía de un carro con un soporte para la cámara, pudiendo moverla a lo largo del eje horizontal x y el eje vertical (eje z), permitiendo regular su posición sobre el eje longitudinal del microdispositivo y su altura respectivamente.

La primera configuración probada (figura 98), fue con tipo de luz frontal con la ayuda de una lámpara tal y como puede verse a continuación:



**Figura 98: Montaje del Sistema con luz frontal. Fuente propia**

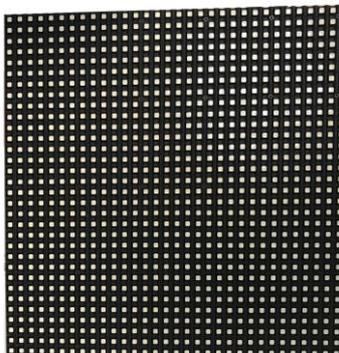
Observando la figura 98, puede verse como el microdispositivo se encuentra en el centro (rectángulo verde) y a un lado quedan las bombas piezoeléctricas (flechas rojas), las cuales se fijaron con cinta adhesiva dado que su vibración era muy pequeña. Por otro lado, también quedan a un lado el depósito de las bombas piezoeléctricas, el depósito de descarga del microdispositivo (a la izquierda) y el tubo proveniente de la bomba NE-300 (a la derecha). En la parte superior queda colocada la cámara con la óptica pin-hole (flecha azul).

Cabe destacar que, como posible solución a las pequeñas fugas, aunque en este segundo microdispositivo eran muy pequeñas, surgió la idea de fijar los tubos con pegamento al microdispositivo. Sin embargo, dicha idea se descartó puesto que durante el cebado era necesario colocar los tubos de salida de la bomba por debajo de esta, por lo que es necesario extraerlos del microdispositivo cada vez que se cebaba el sistema.

La solución propuesta en la figura 98 solución no proporcionó los resultados deseados, tal y como se comentará con detalle en el apartado de *Resultados*, por lo que se optó por utilizar otra técnica de iluminación.

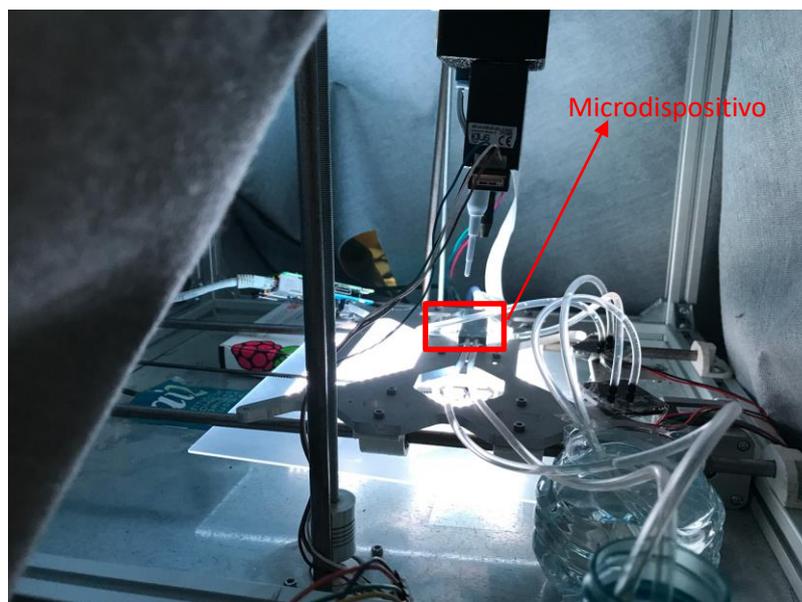
El segundo montaje realizado fue con iluminación backlight [97]. Dicha técnica consiste en colocar el microdispositivo entre la iluminación y la cámara, de modo que con una fuente de

iluminación potente, es posible iluminar a través del objeto. De este modo se trató de visualizar el fondo del canal y por tanto, a los *C. elegans*, los cuales son altamente traslucidos. Se utilizó como fuente, una lámpara led de alta potencia, la cual se encontraba disponible en el laboratorio (figura 99):



**Figura 99: Luz de alta potencia. Fuente propia**

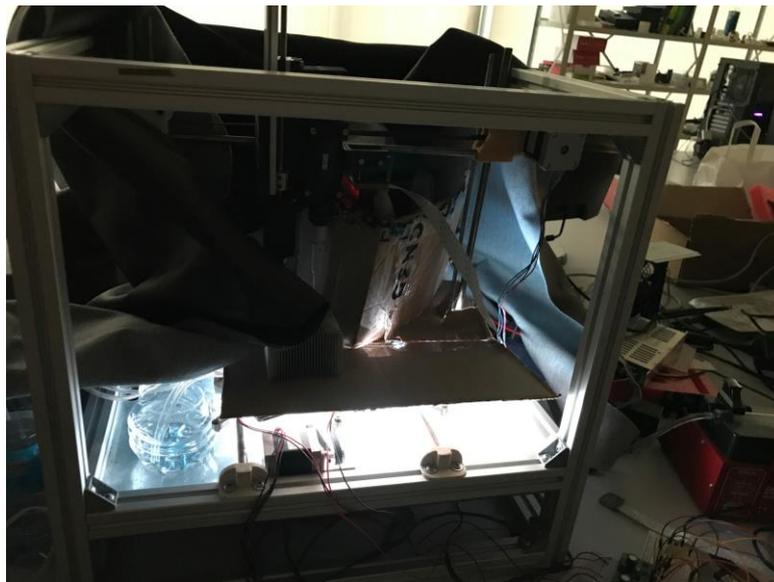
A continuación (figura 100), puede verse el montaje con el tipo de iluminación backlight:



**Figura 100: Montaje del Sistema con luz backlight, versión 1. Fuente propia**

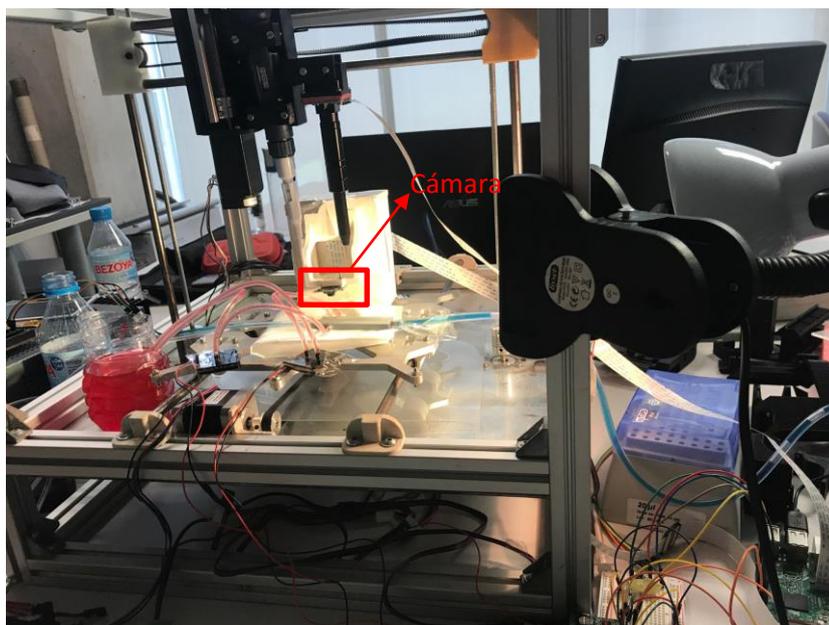
Tal y como puede verse en la figura anterior, se tapó todo el montaje con una tela, con el objetivo de evitar la entrada de luz desde el exterior.

Cabe destacar que, tras diversas pruebas, se detectó que a la cámara, le llegaba excesiva iluminación proveniente de la parte no tapada por la pieza, por lo que no se llegaba ver a esta. De este modo, tal y como puede verse en la figura 101, se colocó un trozo de cartón encima del microdispositivo, con una abertura del tamaño del microdispositivo y se cerró todavía más con cartón alrededor, con el objetivo de que no llegara el resto de luz a la cámara.



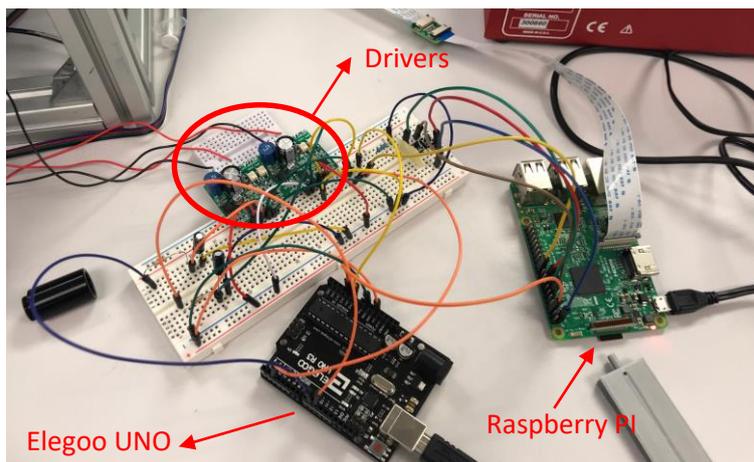
**Figura 101: Montaje del Sistema con luz backlight, versión 2. Fuente propia**

Por otro lado tal y como se comentó en el apartado 3.4.3, con el fin de evitar desajustar la otra cámara y grabar más fácilmente la distribución de los flujos tintados, se hizo uso de otra cámara. De este modo el montaje alternativo que se utilizó puede verse a continuación:



**Figura 102: Montaje alternativo para visualizar los flujos tintados. Fuente propia**

Por último, a continuación (figura 103), puede verse toda la parte del montaje electrónico con los diferentes dispositivos utilizados. Para mayor detalle de las diferentes conexiones puede consultarse el plano 7.



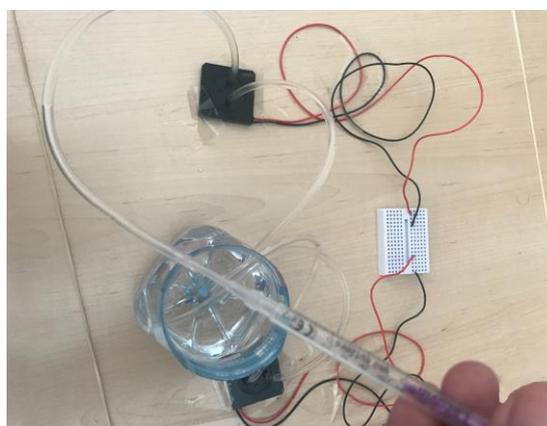
**Figura 103: Montaje de los diferentes dispositivos electrónicos. Fuente propia**

Observando la figura anterior pueden verse dos pulsadores. El primero de ellos, es el utilizado para finalizar el programa. Por otro lado, puesto que no fue posible la detección de *C. elegans* en el microdispositivo, el segundo pulsador se encarga de simular que ha sido detectado un *C. Elegans*, permitiendo así probar si es posible alternar entre las dos configuraciones de flujo (1 ó 2). Dicho pulsador no aparece referenciado en el plano 7, debido a que en el caso de haber sido detectados *C. elegans*, no sería necesario.

Cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre en Arduino, la placa Raspberry Pi dispone de resistencias Pull up y Pull down en todos los pines GPIO, configurables por software, por lo que se pueden conectar directamente los pulsadores a sus pines, sin que se genere una indeterminación en el estado de la señal.

### 5.2.2. Modo de operación

El primer paso a la hora de trabajar fue el cebado de las bombas piezoeléctricas. De este modo, tal y como puede verse en la figura 104, se debe introducir suavemente el fluido hasta llenar el tubo de entrada a la bomba, e inmediatamente después introducir el tubo en el depósito. Por otro lado, se debe colocar el tubo de salida de la bomba por debajo de esta, hasta que esté completamente lleno. Una vez realizado, la bomba queda cebada y el tubo de salida puede colocarse donde convenga.



**Figura 104: Cebado de la bomba. Fuente propia**

Cabe destacar que, para las primeras pruebas, se utilizó tanto el microdispositivo como las bombas, únicamente con agua con el fin de comprobar el correcto funcionamiento.

Una vez cebadas las bombas piezoeléctricas, se debe realizar la carga de los *C. elegans* en la jeringa. Los *C. elegans* se encuentran en placas de Petri sobre una superficie de agar, en la cual se han cultivado bacterias como alimento. De este modo, se debe introducir una pequeña cantidad de agua para disolver dicha superficie y poder absorberlos con la jeringa.

Una vez cargados, se coloca la jeringa sobre la bomba NE-300 (figura 105), conectando esta al tubo de entrada al microdispositivo:



**Figura 105: Bomba NE-300 con la carga de *C. elegans* en la jeringa. Fuente Propia**

Una vez cebadas las bombas piezoeléctricas y habiendo colocado la jeringa sobre la bomba NE-300, se procede a realizar las diferentes pruebas.

Para la parte de pruebas con flujos, se utilizó colorante alimentario para pastelería disuelto en agua. De este modo, el flujo principal quedará en color azul, y el flujo de control (flujo de las bombas piezoeléctricas), quedará en color rojo.

A la hora de realizar los videos de las diferentes pruebas, se hace uso el comando *raspivid* [98]. De este modo, se ejecuta el siguiente comando:

```
> raspivid -t 0 -awb OFF -awbg 1,1 -ss VALOR -o NOMBRE_ARCHIVO.h264
```

Donde  $-t 0$ , indica el tiempo de duración, el cual si es 0 finaliza a voluntad del usuario,  $-awb OFF$  desactiva el modo automático del Balance de blancos (AWB),  $-awbg 1,1$  es el balance de la ganancia roja y azul, la cual se deja en esos valores,  $-ss$  es el tiempo de exposición ('shutter speed') especificado en microsegundos, el cual dependerá del tipo de grabación que se vaya a realizar tiempo de grabación. De dicho parámetro se hablará con mayor detalle en el apartado 5.2.4. Por último  $-o NOMBRE_ARCHIVO.h264$  indica el nombre de salida del fichero de video con formato h264, el cual es un códec de video de alta compresión.

Por ultimo indicar que, puesto que tal y como se comentará en el capítulo 6, no fue posible detectar *C. elegans* en el microdispositivo, con el fin de poder realizar las diferentes pruebas, se simulará su detección mediante el uso de un pulsador. Al igual que con el resto de pines, el primer paso es definir el tipo (INPUT):

```
const int butPin = 17; //Broadcom pin 17, pin 11.Simula que se ha encontrado gusano
.
.
.
int main(){
.
.
.
pinMode(butPin, INPUT); //Definición del Pin. Simula que se ha encontrado gusano
```

Una vez definido el pin, y ya dentro del bucle *While*, junto antes de la distinción del caso, se hace la lectura del pin y la distinción en función de si es par o impar:

```
//Detección simulada con botón:
boton=digitalRead (butPin);
if((boton==1)&&(boton_ant!=boton))
{
    conteo++;
}
boton_ant=boton;

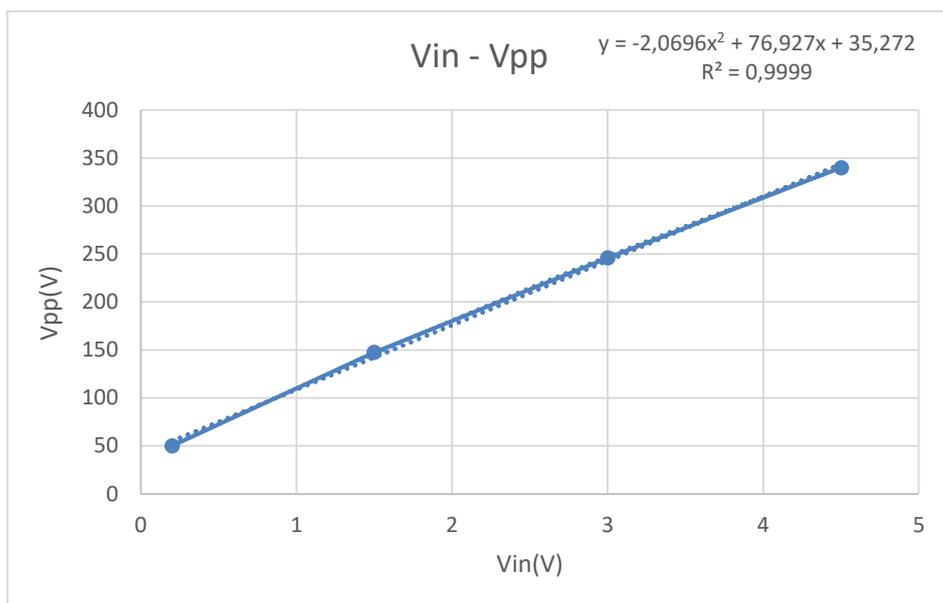
//Detectar par o impar:
if (conteo%2==0)
    opc=0; //Pares config. 1
else
    opc=1; //Impares config. 2
```

Posteriormente ya se continuaría con el envío de una configuración u otra tal y como se comentó en el apartado 5.1.4.

### 5.2.3. Condiciones de operación

Conocidos los caudales necesarios con ayuda del software de simulación, es necesario traducirlo en un valor de voltaje y ciclo de trabajo para poder trabajar con Arduino.

En primer lugar, a partir de las gráficas proporcionadas por el fabricante, se obtienen las ecuaciones que permiten hacer la conversión entre los diferentes parámetros. De este modo a continuación (figura 106), puede verse tanto la gráfica como la ecuación (ec. 28), que relaciona el voltaje de control ( $V_{in}$ ) y voltaje el suministrado por el driver ( $V_{pp}$ ):

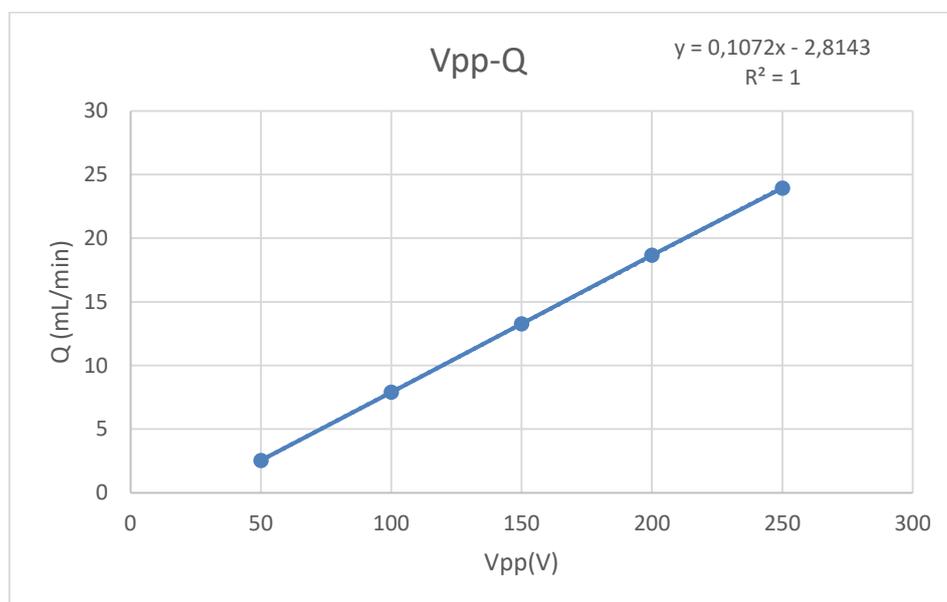


**Figura 106: Gráfica Vin-Vpp Driver MPD-200A. Fuente Propia**

$$V_{PP} (V) = -2,0696V_{in}^2 + 76.927V_{in} + 35.272 \quad (\text{ec. 28})$$

Tal y como puede verse, presenta un alto ajuste ( $R^2=0.9999$ ).

Por otro lado, la gráfica y la ecuación que relaciona el voltaje suministrado por el driver (A) y el caudal proporcionado por la bomba (Q), para 40 Hz (frecuencia con la que se trabaja), presentan la siguiente forma:



**Figura 107: Gráfica Vpp-Q Bomba SDMP 320. Fuente Propia**

$$Q(\text{mL}/\text{min}) = 0.1072V_{PP} - 2.8143 \quad (\text{ec. 29})$$

En este caso el ajuste también es muy bueno ( $R^2=1$ ).

Despejando  $V_{pp}$  de la ec. 29, y sustituyendo en la ec. 28, se obtiene la ecuación 30, la cual permite hacer la conversión directa entre el caudal deseado (Q) y el voltaje de control necesario ( $V_{in}$ ):

$$V_{in}(V) = \frac{-76.927 + \sqrt{6209.76 - 8.2784 \cdot \left(\frac{Q + 2.8143}{0.1072}\right)}}{-4.1392} \quad (\text{ec. 30})$$

Tras varias comprobaciones, se toma como correcta la solución de la raíz positiva.

De acuerdo con lo indicado en el apartado 4.2.3, se van a probar experimentalmente dos casos con diferentes condiciones de funcionamiento. A continuación (Tablas 10 y 11), pueden verse los diferentes valores de caudal para cada entrada y su correspondiente valor de ciclo de trabajo ('Dutty Cycle', DC), para cada condición de funcionamiento:

Caso 1				
Nº Entrada	Q (mL/min)	V (v)	DC (%)	DC Arduino
1	0,534	-	-	-
2	16,1	1,94	38,8	98,94≈99
3	4	0,371	7,42	18,92≈19

**Tabla 10: Condiciones de Operación caso 1**

Caso 2				
Nº Entrada	Q (mL/min)	V (v)	DC (%)	DC Arduino
1	1,22	-	-	-
2	19,2	2,36	47,2	120,36≈120
3	2	0,126	2,52	6,426≈6

**Tabla 11: Condiciones de Operación caso 2**

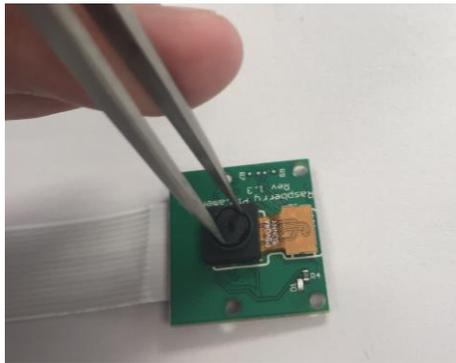
Tal y como se comentó en el apartado 5.1.2, el valor a introducir en Arduino debe ser un entero. En este caso se ha optado por hacer un redondeo.

#### 5.2.4. Configuración del sistema de visión

Una vez descrito el montaje y la forma de trabajo, se procede a describir el proceso para el ajuste del sistema de visión.

En el caso de la cámara seleccionada para el proceso de detección, a la hora de ajustar el enfoque, en primer lugar se hicieron pruebas fuera del montaje, con el objetivo de determinar la distancia de separación con el objeto. Una vez estimada se procede colocarla sobre el montaje (figura 98). Por otro lado, aparte de poder regular la altura y desplazamiento horizontal tal y como se comentó anteriormente, también puede ajustarse el enfoque girando los diferentes acoples alejando o acercando la lente pin-hole al objeto.

En el caso de la cámara que se utilizó para grabar los videos de la distribución de los flujos, el ajuste del enfoque debe hacerse manualmente girando la lente de la cámara. De este modo con ayuda de unas pinzas (figura 106), se ajusta el enfoque:



**Figura 108: Ajuste enfoque Raspberry Pi Camera Rev 1.3. Fuente Propia**

El concepto de tiempo de exposición (shutter time) [99], es el tiempo que permanece abierto el obturador de la cámara, es decir, es el tiempo que el sensor queda expuesto y por tanto está recibiendo luz. Se suele expresar en segundos y fracciones. La velocidad de obturación (shutter speed), es el valor inverso al tiempo de exposición pero ambos se refieren al mismo concepto. Dicho parámetro es el que se indica en el comando *raspivid*, indicado en el apartado 5.2.2.

De este modo mayores tiempos de exposición, implicará que el sensor queda expuesto más tiempo, siendo este caso especialmente indicado para condiciones de baja luminosidad, como es el caso del montaje con luz backlight. En dicho montaje es necesario utilizar elevados tiempos de exposición, para poder captar los canales iluminados por la poca luz que atraviesa el microdispositivo.

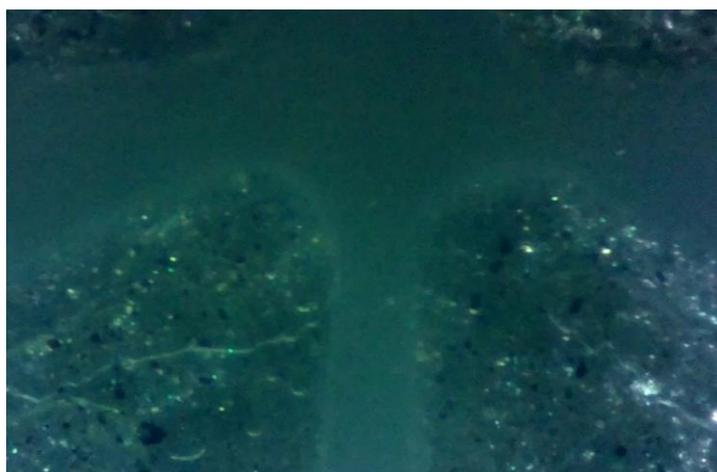


## **CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

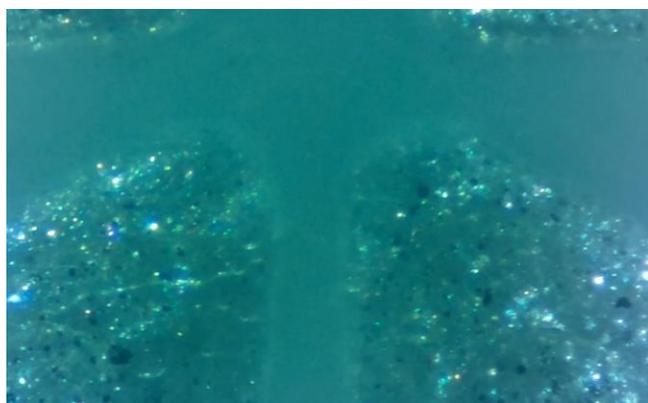
### **6.1. RESULTADOS**

Tal y como se comentó en el apartado 3, en un principio la solución se orientó a clasificar los *C. elegans* en función de si presentaban fluorescencia. Sin embargo, debido a la imposibilidad de conseguir este tipo de *C. elegans*, se optó por intentar clasificarlos enviando los gusanos pares por una salida y los impares por la otra.

En primer lugar, se trabajó con la técnica de iluminación frontal con la ayuda de una lámpara orientable. De este modo, tras varias pruebas se obtuvieron los siguientes dos resultados, ambos obtenidos enfocando de forma diferente con la lámpara, pero sin variar la configuración de iluminación frontal:



**Figura 109: Iluminación frontal, ajuste 1. Fuente Propia**



**Figura 110: Iluminación frontal, ajuste 2. Fuente Propia**

Ambas imágenes se obtuvieron con una velocidad de obturación de 33 milisegundos (raspivid - ss 33000). Cabe destacar que, esta configuración (figura 98) no proporcionó los resultados deseados, ya que no fue posible visualizar *C. elegans* tal y como puede verse en las figuras 109 y 110. Esto puede ser debido a que, tal y como puede verse el material contiene numerosas partículas brillantes, las cuales pueden hacer que los *C. elegans* no sean vistos.

Mediante la segunda técnica utilizada, la iluminación tipo backlight se trató de visualizar los *C. elegans*, tratando de que una pequeña parte luz que atraviesa el microdispositivo, iluminara su cuerpo altamente traslucido. De este modo mediante el primer montaje backlight (figura 100), se obtuvo el siguiente resultado (figura 111):



**Figura 111: Iluminación backlight shutter speed 1 segundo. Fuente propia**

Tras varias pruebas, se descubrió que llegaba mucha luz por alrededor del microdispositivo y esta volvía a ser proyectada sobre la superficie, por lo que el resultado era no era el deseado. Tal y como puede verse, la imagen queda muy iluminada si se compara con los resultados obtenidos mediante la segunda versión de este montaje.

Mediante la segunda versión del montaje con tipología de iluminación backlight (figura 101), al dejar libre únicamente la superficie del microdispositivo mediante un cartón, tal y como se describe en el apartado 5.2.1, la imagen obtenida es mucho más oscura. En este caso con velocidades de obturación de 33 ms, no era posible detectar nada, por lo que fue necesario incrementar a valores de varios segundos, lo cual no es asumible para este tipo de aplicación, por lo que sería necesario adoptar una serie de medidas las cuales se describirán en el apartado siguiente. De este modo a continuación, pueden verse los resultados para velocidades de obturación de 1 (figura 112) y 5 segundos (figura 113):



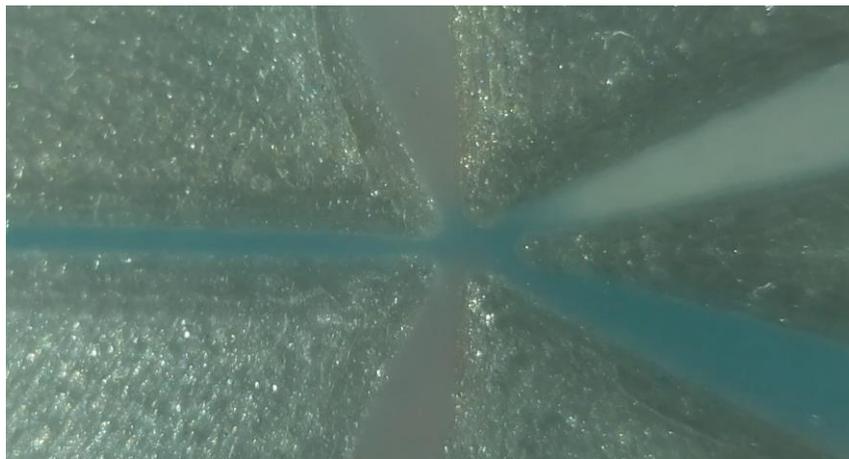
**Figura 112: Iluminación backlight shutter speed 1 segundo. Fuente propia**



**Figura 113: Iluminación backlight shutter speed 5 segundos. Fuente propia**

Ahora lo que realmente se ve es debido a la luz que atraviesa el microdispositivo y no debido a reflejos como ocurría en el caso anterior de iluminación backlight (figura 111). Sin embargo, tampoco fue posible detectar *C. elegans*, lo cual hace necesario pensar y tomar una serie de posibles medidas para solucionarlo (apartado 6.2). Dado este caso, se utilizó un botón con el objetivo se simular la detección (apartado 5.2.2) y poder hacer pruebas con la conmutación entre las dos configuraciones ( $Q_{max}$  y  $Q_{min}$ ), es decir intercambiar los puntos de funcionamiento de las bombas si el gusano detectado era de un tipo u otro.

Respecto a la prueba de distribución de flujos, tal y como se comentó en el apartado 4.2.3, se hicieron pruebas con dos casos con diferentes condiciones de operación (apartado 5.2.3), en las cuales se trató de visualizar la correcta distribución de flujos, tratando de comprobar si el flujo conmutaba de salida, según el tipo detectado. En ambos casos, el resultado obtenido fue muy similar, por lo que con el fin de no alargar excesivamente el presente documento se mostrará el resultado obtenido para el caso 2, mostrando cuando el flujo va por abajo (figura 114) y por arriba (figura 115):



**Figura 114: Prueba del flujo con colorantes, flujo hacia abajo. Fuente propia**



**Figura 115: Prueba del flujo con colorantes, flujo hacia arriba. Fuente propia**

Tal y como puede verse en ambas imágenes, las salidas no utilizadas quedan en tono blanco, lo que indica que se encuentran llenas de aire, y por tanto no sale fluido. Podría haberse asumido la salida de flujo de control (flujo rojo) por la salida contraria, siempre que la mayor parte de flujo azul (flujo que transportaría los *C. elegans*) saliera por la salida correspondiente.

Respecto al tiempo necesario para que el flujo cambie de salida, como mínimo fue necesario 50 segundos, es decir, fue necesario intercambiar los puntos de funcionamiento de las bombas y mantener la acción durante 50 segundos para que el flujo cambiara y saliera por la otra salida, lo cual no es asumible para la aplicación que se desea diseñar.

## **6.2. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS**

A lo largo de este presente proyecto se ha tratado de evaluar y diseñar un dispositivo que permitiera la manipulación e inspección de *C. elegans*, en función de si presentaban fluorescencia o no. Tal y como se comentó en el apartado 3, debido a la imposibilidad de conseguir este tipo de *C. elegans*, se optó por intentar clasificarlos enviando los gusanos pares por una salida y los impares por la otra. Dado este caso, se ha presentado el posible código para ambas soluciones.

Otra dificultad encontrada fue en la fabricación. En un primer lugar tal y como se indicó, se planteó el diseño para *C. elegans* L1, pero dada la imposibilidad de su puesta en práctica con la tecnología de microfabricación disponible, se extrapoló todo el diseño para *C. elegans* L4, el cual si fue posible fabricar.

En cuanto a los resultados obtenidos, puede verse como el objetivo ha sido conseguido en su mayoría. Se ha diseñado un dispositivo el cual con unas modificaciones puede llegar a dar los resultados deseados, se han seleccionado los diferentes equipos necesarios y se ha puesto en práctica para poder determinar su viabilidad. Por último, se han analizado los resultados obtenidos y se han buscado las posibles causas de fallo y mejoras a realizar.

En un primer momento fue necesario revisar numerosa documentación, tanto en la fase inicial de diseño como en las siguientes fases de selección de dispositivos y programación, lo cual hace que el presente documento conste de una extensa bibliografía, tal y como podrá verse en el apartado 7. Respecto a las simulaciones, en un primer lugar fue necesario comprender el funcionamiento del programa y consultar diversos ejemplos lo cual supuso un gran consumo de tiempo. Por otro lado, con el fin de no alargar excesivamente la presente memoria, únicamente se han mostrado los resultados de simulación más relevantes, dado que dicho proceso se extendió durante varios meses llegándose a realizar un gran número de simulaciones y más de 30 diseños diferentes. De este modo, en el apartado *Planos* únicamente se mostrarán aquellos diseños más relevantes, los cuales proporcionaron buenos resultados

Respecto a los equipos necesarios, fue necesario realizar una extensa búsqueda y contactar con varios proveedores, sobretodo en el tema del sistema de bombeo. De hecho, fue necesario contactar con una empresa japonesa (Takasago Electric), para la compra de las bombas piezoeléctricas y los drivers de las mismas, con la correspondiente dificultad y plazos de trabajo que supuso.

Tal y como se ha analizó en el apartado anterior, mediante ambas tipologías de iluminación no fue posible visualizar los *C. elegans*, posiblemente en parte al color del propio material de fabricación y al sellado, ya que este al ser cinta adhesiva tras un rato en contacto con el flujo, se volvía ligeramente blanqueada y perdía propiedades de traslucidez. Como posibles medidas a adoptar, destaca un rediseño bien seleccionando otro tipo de material más traslucido, o bien con otro tipo de sellado que al mojarse no quede ligeramente blanqueado, como puede ser el vidrio el cual podría permitir una mejor visión del fondo del canal. Cabe destacar que en el caso de usar un cristal, sería necesario lijar suavemente la superficie para reducir imperfecciones y mejorar el sellado. Por otro lado, se debería evitar uso de pegamentos para fijarlo dado el riesgo de que este entrara en los canales, por lo que se podría utilizar mordazas. Otra posible alternativa al uso de un cristal, podría ser recortar un trozo de acetato transparente con la forma del canal más un pequeño margen extra, el cual sería colocado sobre el canal y posteriormente tapada toda la superficie con resina epoxi transparente.

Respecto a la distribución de flujos, dado que el tiempo de conmutación era inasumible (50 segundos), como posibles alternativas destaca el uso de configuraciones menos extremas, de modo que ambas presiones (bombas 2 y 3) estén menos alejadas de un punto central y por tanto, haya un menor tiempo de conmutación. Por otro lado, un factor determinante en este tiempo es la longitud de los tubos. Reduciendo la longitud, los cambios producidos por la bomba

llegan antes al microdispositivo, por lo que el tiempo puede reducirse. Cabe destacar que por limitaciones prácticas, debe existir un mínimo de longitud de tubo, ya que las bombas no pueden estar encima del microdispositivo. Otra medida adicional podría ser utilizar tubo de menor diámetro con juntas flexibles para la transición entre el tubo de la bomba y este, de modo que la velocidad se incremente y por tanto los cambios sean efectivos más tempranamente.

Dados los resultados y teniendo en cuenta las diferentes modificaciones y mejoras propuestas, para corregir los diversos inconvenientes que se han encontrado durante las pruebas, el presente proyecto puede tener una alta viabilidad. Como posibles trabajos futuros, se propone llevar a cabo las diversas medidas mencionadas para solucionar los problemas encontrados.

## **CAPÍTULO 7. REFERENCIAS**

- [1] Sanchez-Salmerón, A. J.; Lopez-Tarazón, R.; Guzman-Diana, R., & Ricolfe-Viala, C. (2005). Recent development in micro-handling systems for micro-manufacturing. *Journal of materials processing technology*, 167(2-3), pp. 499-507.
- [2] Sanchez-Salmerón, A. J.; Lopez-Tarazón, R.; Guzman-Diana, R., & Ricolfe-Viala, C. (2010). An inter-machine material handling system for micro-manufacturing based on using a standard carrier. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 47(9-12), pp. 937-943.
- [3] Sanchez-Salmerón, A. J., & Ricolfe-Viala, C. (2010). A bi-linear-vibratory feeder system for micro-bulk-forming applications. *Steel Research International*, 81(9), pp. 1205-1208.
- [4] Sanchez-Salmerón, A. J., & Ricolfe-Viala, C. (2012). A flexible packaging station for micro-bulk-forming applications based on a standard carrier. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 61(5-8), pp. 529-536.
- [5] Qin, Y. (2010). *Micromanufacturing engineering and technology*. William Andrew Publishing.
- [6] Percoco, G., & Salmerón, A. J. S. (2015). Photogrammetric measurement of 3D freeform millimetre-sized objects with micro features: an experimental validation of the close-range camera calibration model for narrow angles of view. *Measurement Science and Technology*, 26(9), pp. 095203.
- [7] Percoco, G.; Lavecchia, F, & Salmerón, A. J. S. (2015). Preliminary study on the 3D digitization of millimeter scale products by means of photogrammetry. *Procedia CIRP*, 33, pp. 257-262.
- [8] Percoco, G.; Guerra, M. G.; Salmerón, A. J. S, & Galantucci, L. M. (2017). Experimental investigation on camera calibration for 3D photogrammetric scanning of micro-features for micrometric resolution. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 91(9-12), pp. 2935-2947.
- [9] Frangione, A.; Salmerón, A. J. S; Modica, F., & Percoco, G. (2019). Multi-step approach for automated scaling of photogrammetric micro-measurements. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 102(1-4), pp. 747-757.
- [10] Stroustrup, N.; Ulmschneider, B. E.; Nash, Z. M.; López-Moyado, I. F.; Apfeld, J., & Fontana, W. (2013). The *Caenorhabditis elegans* lifespan machine. *Nature methods*, 10(7), 665.
- [11] Churgin, M. A.; Jung, S. K.; Yu, C. C.; Chen, X.; Raizen, D. M., & Fang-Yen, C. (2017). Longitudinal imaging of *Caenorhabditis elegans* in a microfabricated device reveals variation in behavioral decline during aging. *Elife*, 6, pp. e26652.

- [12] Puchalt, J. C.; Sánchez-Salmerón, A. J.; Guerola, P. M., & Martínez, S. G. (2019). Active backlight for automating visual monitoring: An analysis of a lighting control technique for *Caenorhabditis elegans* cultured on standard Petri plates. *PLoS one*, 14(4), pp. e0215548.
- [13] de Carlos, I.; Valmas, N.; Hiliard, M. A., & Lu H. (2012). Laterally Orienting *C. elegans* Using Geometry at Microscale for High-Throughput Visual Screens in Neurodegeneration and Neuronal Development Studies. *PLOS ONE*, 7, pp. 1-8.
- [14] Yoon, S.; Piao, H.; Jeon, T. J., & Kim, S. M. (2016). Behavior Analysis of *C. elegans* to Electrical Stimulus in a Highly Controlled Microfluidic Chip. *Biophysical Journal*, 110(3), pp. 652a-653a.
- [15] León E, Torrealba F. (2011) Los Lab\_ On\_A\_Chip: Aplicaciones Existentes y Desafíos Futuros. *Revista Digital de Investigación y Postgrado de la Universidad Nacional Experimental Politécnica "Antonio José de Sucre", Vicerrectorado Barquisimeto. Venezuela*. Vol. 1. No. 1, pp 19-28.
- [16] Bakhtina, Natalia; MacKinnon, Neil; Korvink, Jan. (2016). Advanced Microfluidic Assays for *Caenorhabditis elegans*.
- [17] News Medical. (2019). What is Lab-on-a-Chip?. [Online]. Disponible en: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Lab-on-a-Chip.aspx> [Consultado: 3 Mayo 2019]
- [18] Elveflow. (2015). Introduction to Lab-on-a-Chip 2015 : Review, history and future. [Online]. Disponible en: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/introduction-to-lab-on-a-chip-2015-review-history-and-future/> [Consultado: 3 Mayo 2019]
- [19]. González F., Antonio. (2007). El Laboratorio en un chip. Universidad de Sevilla. Disponible en: [http://www.esi2.us.es/DFA/ARFAI/ficheros\\_2007/Microfluidica.pdf](http://www.esi2.us.es/DFA/ARFAI/ficheros_2007/Microfluidica.pdf)
- [20] Dpto. de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. (2014). Apuntes asignatura Mecánica de Fluidos. Documento no publicado. Universidad Politécnica de Valencia, Cap1, pp. 7-10.
- [21] Ralnd V. Giles. (1994). Mecánica de los fluidos e hidráulica. 3ªEd. McGraw-Hill, Madrid, Cap1, pp. 2-3.
- [22] University of Washington. (s.f.). Basic Microfluidic Concepts. [Online]. Disponible en: <https://faculty.washington.edu/yagerp/microfluidicstutorial/basicconcepts/basicconcepts.htm> [Consultado: 9 Mayo 2019]
- [23] Ong, Soon-Eng; Zhang, Sam; Du, Hejun & Fu, Yong Qing. (2008). Fundamental principles and applications of microfluidic systems. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, pp. 2759-2760.
- [24] Dpto. de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. (2014). Apuntes asignatura Mecánica de Fluidos. Documento no publicado. Universidad Politécnica de Valencia, Cap1, pp. 3.
- [25] Ralnd V. Giles. (1994). Mecánica de los fluidos e hidráulica. 3ªEd. McGraw-Hill, Madrid, Cap1, pp. 3-4.
- [26] Real Academia de Ingeniería. (s.f.). Número de Knudsen. [Online]. Disponible en: <http://diccionario.raing.es/es/lema/n%C3%BAmero-de-knudsen> [Consultado: 11 Mayo 2019].

- [27] W Barber, R; Emerson, David. (2002). The influence of Knudsen number on the hydrodynamic development length within parallel plate micro-channels. *Advances in Fluid Mechanics IV*, pp. 207-211.
- [28]. Herrera-Fierro Pilar; Behrouz, Shiari. (2014). NNIN/LNF Microfluidic Workshop. University of Michigan. [Online]. Disponible en: [https://inf.umich.edu/wp-content/uploads/2014/03/NNIN\\_LNF\\_Workshop\\_2014-1.pdf](https://inf.umich.edu/wp-content/uploads/2014/03/NNIN_LNF_Workshop_2014-1.pdf) [Consultado: 11 Mayo 2019].
- [29] Science Direct. (2013). Knudsen Number. [Online]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/knudsen-number> [Consultado: 11 Mayo 2019]
- [30]. Córdoba, Diego. (2011). Las ecuaciones de Navier-Stokes. CSIC, Instituto de Ciencias Matemáticas. [Online]. Disponible en: [http://garf.ub.es/Milenio/img/Presentacion\\_Navier\\_Stokes.pdf](http://garf.ub.es/Milenio/img/Presentacion_Navier_Stokes.pdf) [Consultado: 14 Mayo 2019]
- [31] Mora, Xavier. (2017). Las ecuaciones de Navier-Stokes. *Mètode Science Studies Journal*, Universitat de València, pp. 67-73.
- [32] Dpto. de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. (2014). Apuntes asignatura Mecánica de Fluidos. Documento no publicado. Universidad Politécnica de Valencia, Cap4, pp. 5-6.
- [33] Richardson, S. M. (2011). Poiseuille Flow. [Online]. Disponible en: <http://www.thermopedia.com/es/content/1042/> [Consultado: 14 Mayo 2019]
- [34] San-Miguel A. and Lu H. (2013). Microfluidics as a tool for *C. elegans* research. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, pp. 2.
- [35] University of Minnesota, College of Biological Sciences Science Direct. (s.f.). What is *C. elegans*?. [Online]. Disponible en: <https://cbs.umn.edu/cgc/what-c-elegans> [Consultado: 15 Mayo 2019]
- [36] Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). (s.f.). Nuevas estrategias en la evaluación de alimentos funcionales. [Online]. Disponible en: <https://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=295&url=nuevas-estrategias-en-la-evaluacion-de-alimentos-funcionales> [Consultado: 15 Mayo 2019].
- [37] Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC. (2019). Una investigación en *C. elegans* demuestra que la ingesta de un carotenoide de la mandarina reduce un 30% la grasa corporal. [Online]. Disponible en: <https://www.iata.csic.es/es/noticias/una-investigacion-en-c-elegans-demuestra-que-la-ingesta-de-un-carotenoide-de-la-mandarina> [Consultado: 15 Mayo 2019].
- [38] Seres modélicos CSIC. (s.f.). La doble vida de un gusano discreto. [Online]. Disponible en: <http://www.seresmodelicos.csic.es/cuc.html> [Consultado: 15 Mayo 2019].
- [39] Corsi A.K.; Wightman B.; Chalfie M. (2015). A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- [40] Wormatlas. (2012). Introduction to *C. elegans* Anatomy. [Online]. Disponible en: <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html> [Consultado: 16 Mayo 2019].

- [41] Wormatlas. (2015). Introduction to the dauer larva - overview. [Online]. Disponible en: <https://www.wormatlas.org/dauer/introduction/DIntroframeset.html> [Consultado: 16 Mayo 2019]
- [42] Keil, Wolfgang; M. Kutscher, Lena; Shaham, Shai; D. Siggia, Eric. (2016). Long-Term High-Resolution Imaging of Developing *C. elegans* Larvae with Microfluidics. *Developmental Cell*, pp 202.
- [43] Letizia, Maria Cristina; Cornaglia, Matteo; Trouillon, Raphaël; Sorrentino, Vincenzo; Mouchiroud, Laurent; Bou Sleiman, Maroun S.; Auwerx, Johan; Gijs, Martin A. M. (2018). Microfluidics-enabled phenotyping of a whole population of *C. elegans* worms over their embryonic and post-embryonic development at single-organism resolution. *Microsystems & Nanoengineering* volume, vol 4, nº 6, pp 7.
- [44] Hostettler, L.; Grundy, L.; Käser-Pébernard, S.; Wicky, C.; Schafer, W. R.; Glauser, D. A. (2018). The Bright Fluorescent Protein mNeonGreen Facilitates Protein Expression Analysis In Vivo. *G3:Genes/Genomes/Genetics*, pp 607-613.
- [45] San-Miguel A. and Lu H. (2013). Microfluidics as a tool for *C. elegans* research. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, pp. 5-6.
- [46] Bakhtina, Natalia; MacKinnon, Neil; Korvink, Jan. (2016). Advanced Microfluidic Assays for *Caenorhabditis elegans*, pp. 96-97
- [47] Bakhtina, Natalia & Korvink, Jan. (2014). Microfluidic laboratories for *C. elegans* enhance fundamental studies in biology. *RSC Advances*, vol 4, pp. 4700-4702.
- [48] Pittman, Will E; B Sinha, Drew; B Zhang, William; Kinser, Holly; Pincus, Zachary. (2017). A Simple Culture System for Long-Term Imaging of Individual *C. elegans*. *Lab Chip*, vol. 17, pp. 15.
- [49] Rezai, Pouya; Salam, Sangeena; Selvaganapathy, Ponnambalam; Gupta, Bhagwati. (2012). Electrical sorting of *Caenorhabditis elegans*. *Lab on a chip*, vol. 12, pp. 723-725.
- [50] Wang, Xixian; Hu, Rui; Ge, Anle; Hu, Liang; Wang, Shanshan; Feng, Xiaojun; Du, Wei; Liu, Bifeng. (2015). Highly efficient microfluidic sorting device for synchronizing developmental stages of *C. elegans* based on deflecting electrotaxis. *Lab Chip*, vol. 15, pp. 2513-2519.
- [51] Yan, Yuanjun; Ng, Li Fang; Theng Ng, Li; Bum Choi, Kwan; Gruber, Jan; Bettiol, Andrew; V Thakor, Nitish. (2014). A Continuous-Flow *C. elegans* Sorting System with Integrated Optical Fiber Detection and Laminar Flow Switching. *Lab on a chip*, vol.14, pp. 1-7.
- [52] Chung, Kwanghun; Crane, Matthew; Lu, Hang. (2008). Automated on-Chip Rapid Microscopy, Phenotyping and Sorting of *C. elegans*. *Nature methods*, vol.5, pp. 1-6.
- [53] Union Biometrica INC. (s.f.). Copas Biosorter. [Online]. Disponible en: <https://www.unionbio.com/copas/> [Consultado: 20 Mayo 2019].
- [54] Union Biometrica INC. (2015). 41 COPAS FP Large Particle Flow Cytometers system specifications. [Online]. Disponible en: [https://www.unionbio.com/documents/COPAS\\_FP\\_System\\_Specs.pdf](https://www.unionbio.com/documents/COPAS_FP_System_Specs.pdf) [Consultado: 21 Mayo 2019].
- [55] Union Biometrica INC. (s.f.). COPAS FP Instruments. [Online]. Disponible en: [https://www.unionbio.com/documents/COPAS\\_FP\\_Brochure.pdf](https://www.unionbio.com/documents/COPAS_FP_Brochure.pdf) [Consultado: 21 Mayo 2019].

- [56] Elveflow. (s.f.). PDMS: a review. Introduction to Poly-di-methyl-siloxane (PDMS). [Online]. Disponible en: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/the-poly-di-methyl-siloxane-pdms-and-microfluidics/> [Consultado: 22 Mayo 2019].
- [57] San-Miguel A. and Lu H. (2013). Microfluidics as a tool for *C. elegans* research. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, pp. 11-14.
- [58] Ultimaker GrupoSicnova. Ultimaker 3. [Online]. Disponible en: <https://ultimaker.tr3sdland.com/producto/ultimaker-3/>. [Consultado: 2 Julio 2019].
- [59] Blog de HXX. Materiales de impresión 3D (I): PLA (ácido poliláctico). (2015). [Online]. Disponible en: <http://hxx.es/2015/03/12/materiales-de-impresion-3d-i-pla-acido-polilactico/>. [Consultado: 2 Julio 2019].
- [60] Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, pp. 1-10.
- [61] He, Fanglian. (2011). Common Worm Media and Buffers. *Bio-protocol* 2011, vol 1, nº55.
- [62] Lüersen, Kai; Faust, Ulla; Gottschling, Dieter-Christian; Döring, Frank. (2014). Gait-specific adaptation of locomotor activity in response to dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Experimental Biology*, vol 217, pp 2483.
- [5063] Blog Historia de la Informática, Etsinf UPV. (2013). Raspberry Pi. [Online]. Disponible en: <https://histinf.blogs.upv.es/2013/12/18/raspberry-pi/>. [Consultado: 28 Mayo 2019].
- [64] Raspberry Pi Foundation. (s.f.). About UsRaspberry Pi. [Online]. Disponible en: <https://www.raspberrypi.org/about/>. [Consultado: 28 Mayo 2019].
- [65] Raspberry Pi Foundation. (s.f.). Raspberry Pi 3 Model B Specifications. [Online]. Disponible en: <https://www.raspberrypi.org/products/raspberry-pi-3-model-b/>. [Consultado: 28 Mayo 2019].
- [66] Wiring Pi, GPIO Interface library for the Raspberry Pi. [Online]. Disponible en: <http://wiringpi.com/>. [Consultado: 6 Junio 2019].
- [67] Raspberry Pi Pinout [Online]. Disponible en: <https://es.pinout.xyz/pinout/>. Consultado: [6 Junio 2019].
- [68] Tiendatec. (s.f.). Cámara con foco manual para Raspberry Pi. [Online]. Disponible en: <http://arduino.cl/que-es-arduino> . [Consultado: 2 Septiembre 2019].
- [69] Pi Supply. (s.f.). Raspberry PI Camera Board v 1.3. [Online]. Disponible en: <https://uk.pi-supply.com/products/raspberry-pi-camera-board-v1-3-5mp-1080p?lang=es> . [Consultado: 2 Septiembre 2019].
- [70] OpenCV Org. (s.f.). About OpenCV. [Online]. Disponible en: <https://opencv.org/about/>. [Consultado: 10 Junio 2019].
- [71] New Era Pump Systems Inc. (s.f.). NE-300 Just Infusion Syringe Pump. [Online]. Disponible en: <http://www.syringepump.com/download/NE-300Brochure.pdf> [Consultado: 12 Junio 2019].
- [72] Takasago Electric Inc. (2015). User's manual SDMP320, pp. 1-9.
- [73] Takasago Electric Inc. (2015). User's manual MPD-200A, pp. 1-6.

- [74] Arduino. (s.f.). ¿Qué es Arduino?. [Online]. Disponible en: <http://arduino.cl/que-es-arduino> . [Consultado: 17 Junio 2019].
- [75] Aprendiendo Arduino. (2015). Aplicaciones Arduino. [Online]. Disponible en: <https://aprendiendoarduino.wordpress.com/tag/aplicaciones-arduino> . [Consultado: 17 Junio 2019].
- [76] Arduino Store. Arduino UNO Rev3 Tech Specs. [Online]. Disponible en: <https://store.arduino.cc/arduino-uno-rev3> . [Consultado: 17 Junio 2019].
- [77] ANSYS Inc. (2017). ANSYS 18 Fluent Tutorial Guide, pp. 20-60.
- [78] Computational Fluid Dynamics. (2012). Tips & tricks: inflation layer meshing in Ansys. [Online]. Disponible en: <https://www.computationalfluidynamics.com.au/tips-tricks-inflation-layer-meshing-in-ansys/> . Consultado: 21 Marzo 2019].
- [79] Ansys Fluent 12.0/12.1 Documentation. (s.f.). Pressure-Based. [Online]. Disponible en: <http://www.afs.enea.it/project/neptunius/docs/fluent/html/th/node361.htm> . [Consultado: 21 Marzo 2019].
- [80] COMSOL. (2012). Comsol Multiphysics Reference Guide.
- [81] COMSOL. (s.f.). Application Gallery, Star-Shaped Microchannel. [Online]. Disponible en: <https://www.comsol.com/model/star-shaped-microchannel-480>. [Consultado: 3 Mayo 2019].
- [82] Cmake. (s.f.). About CMake. [Online]. Disponible en: <https://cmake.org/overview/> . [Consultado: 17 Julio 2019].
- [83] Alejandría. (s.f.). Entendiendo make y los archivos Makefiles. [Online]. Disponible en: [http://alejandria.nidaval.com/scripts/Editorial.dll?SE=2\\_1\\_0\\_T4\\_A168\\_175](http://alejandria.nidaval.com/scripts/Editorial.dll?SE=2_1_0_T4_A168_175) . [Consultado: 29 Julio 2019].
- [84] Luis Llamas. (2015). Salidas Analógicas PWM en Arduino. [Online]. Disponible en: <https://www.luisllamas.es/salidas-analogicas-pwm-en-arduino> . [Consultado: 3 Julio 2019].
- [85] Arduino Reference. AnalogWrite(). [Online]. Disponible en: <https://www.arduino.cc/reference/en/language/functions/analog-io/analogwrite/>. Consultado: [3 Julio 2019].
- [86] Arduino Playground. (s.f.). Señales analógicas de salida en Arduino (PWM). [Online]. Disponible en: <https://playground.arduino.cc/ArduinoNotebookTraduccion/Appendix3/>. [Consultado: 3 Julio 2019].
- [87] Geeky Theory. (s.f.). Arduino + Raspberry Pi - Raspduino. [Online]. Disponible en: <https://geekytheory.com/arduino-raspberry-pi-raspduino>. [Consultado: 4 Julio 2019].
- [88] Luis Llamas. (2014). Leer un pulsador con Arduino. [Online]. Disponible en: <https://www.luisllamas.es/leer-un-pulsador-con-arduino/> . [Consultado: 4 Julio 2019].
- [89] Wiring Pi. (2019). GPIO Interface library for the Raspberry Pi, Core Functions. [Online]. Disponible en: <http://wiringpi.com/reference/core-functions/>. [Consultado: 4 Julio 2019].

- [90] OpenCV documentation. (2014). Histograms, calcHist. [Online]. Disponible en: <https://docs.opencv.org/2.4/modules/imgproc/doc/histograms.html> . [Consultado: 10 Julio 2019].
- [91] OpenCV documentation. (2014). Operations on Arrays, minMaxLoc. [Online]. Disponible en: [https://docs.opencv.org/2.4/modules/core/doc/operations\\_on\\_arrays.html](https://docs.opencv.org/2.4/modules/core/doc/operations_on_arrays.html) . [Consultado: 10 Julio 2019].
- [92] Pagano, Daniel J. AND Kingston, Elena R. AND Kim, Dennis H. (2015). Tissue Expression Pattern of PMK-2 p38 MAPK Is Established by the miR-58 Family in *C. elegans*. *PLOS Genetics*, vol. 11, pp. 5.
- [93] OpenCV documentation. (s.f.). Image Thresholding. [Online]. Disponible en: [https://docs.opencv.org/master/d7/dd0/tutorial\\_js\\_thresholding.html](https://docs.opencv.org/master/d7/dd0/tutorial_js_thresholding.html). [Consultado: 2 Septiembre 2019].
- [94] OpenCV documentation. (2014). Finding contours in your image. [Online]. Disponible en: [https://docs.opencv.org/2.4/doc/tutorials/imgproc/shapedescriptors/find\\_contours/find\\_contours.html](https://docs.opencv.org/2.4/doc/tutorials/imgproc/shapedescriptors/find_contours/find_contours.html). [Consultado: 2 Septiembre 2019].
- [95] Arduino Reference. setup(). [Online]. Disponible en: <https://www.arduino.cc/reference/en/language/structure/sketch/setup/>. Consultado: [10 Julio 2019].
- [96] Arduino Reference. loop(). [Online]. Disponible en: <https://www.arduino.cc/reference/en/language/structure/sketch/loop/>. Consultado: [10 Julio 2019].
- [97] Infaimon. (s.f.). Iluminación por contraste (Backlight). [Online]. Disponible en: <https://www.infaimon.com/enciclopedia-de-la-vision/iluminacion-por-contraste-backlight/>. [Consultado: 10 Septiembre 2019].
- [98] Raspberry Pi Org. (2018). Raspberry Pi Camera Module, raspivid. [Online]. Disponible en: <https://www.raspberrypi.org/documentation/raspbian/applications/camera.md>. [Consultado: 9 Septiembre 2019].
- [99] El Blog de la Fotografía. (2018). Tiempo de exposición en fotografía. [Online]. Disponible en: <https://elblogdelafotografia.com/tiempo-de-exposicion-en-fotografia/>. [Consultado: 10 Septiembre 2019].



**PRESUPUESTO**

---

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

---

## PRESUPUESTO

### 1. PRESUPUESTO

A continuación se van a describir las diferentes unidades de obra y el presupuesto completo del presente proyecto:

#### CAPITULO 1 : Dispositivo y Sistema de Bombeo

Unidad de obra 1: Dispositivo Microfluídico					
Cod.	Unidad	Descripción	Cantidad	P.unitario(€)	P.total(€)
<b>MAT1</b>	Ud	Dispositivo microfluídico	2	60,00	120,00
%	%	Costes directos complementarios	0,02	120,00	2,40
				Coste total	122,40 €
Unidad de obra 2: Sistema de bombeo en la entrada 1					
Cod.	Unidad	Descripción	Cantidad	P.unitario(€)	P.total(€)
<b>MAT2</b>	Ud	Bomba NE-300	1	468,27	468,27
<b>MAT3</b>	m	Tubo flexible RS PRO PVC 25m Transparente, Dint 3 mm	0,5	0,38	0,19
<b>MAT4</b>	Ud	Jeringa BD Emerald 5 ml	1	0,50	0,50
%	%	Costes directos complementarios	0,02	468,96	9,38
				Coste total	478,34 €
Unidad de obra 3: Sistema de bombeo en la entrada 2					
Cod.	Unidad	Descripción	Cantidad	P.unitario(€)	P.total(€)
<b>MAT5</b>	Ud	Bomba Piezoelectrica SDMP 320 20 mL/min	1	126,72	126,72

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

<b>MAT6</b>	Ud	Driver MPD-200A para bomba piez.	1	114,15	114,15
<b>MAT7</b>	m	Tubo flexible Saint-Gobain Plástico 15m Transparente, Dint 2.4 mm	1,85	1,60	2,95
%	%	Costes directos complementarios	0,02	243,83	4,88
				Coste total	248,71 €

Unidad de obra 4: Sistema de bombeo en la entrada 3

<b>Cod.</b>	Unidad	Descripción	Cantidad	P.unitario(€)	P.total(€)
<b>MAT5</b>	Ud	Bomba Piezoelectrica SDMP 320 20 mL/min	1	126,72	126,72
<b>MAT6</b>	Ud	Driver MPD-200A para bomba piez.	1	114,15	114,15
<b>MAT7</b>	m	Tubo flexible Saint-Gobain Plástico 15m Transparente, Dint 2.4 mm	1,85	1,60	2,95
%	%	Costes directos complementarios	0,02	243,83	4,88
				Coste total	248,71 €

Total CAPITULO 1

727,05 €

**CAPITULO 2 : Electrónica e Informática**

Unidad de obra 5: Sistema de visión y actuación

<b>Cod.</b>	Unidad	Descripción	Cantidad	P.unitario(€)	P.total(€)
<b>MAT8</b>	Ud	Raspberry Pi 3 Model B	1	31,63	31,63
<b>MAT9</b>	Ud	Adaptador Corriente Raspberry Pi	1	12,65	12,65
<b>MAT10</b>	Ud	Cámara para Raspberry Pi con cable, objetivo y acoples	1	34,95	34,95
<b>MAT11</b>	Ud	Conector empalme cable cámara	1	4,95	4,95

Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

<b>MAT12</b>	Ud	Cable cámara 50 cm	1	7,09	7,09
<b>MAT13</b>	Ud	Samsung MicroSDHC EVO Plus 32GB Clase 10	1	6,55	6,55
<b>MAT14</b>	Ud	Elegoo UNO R3	1	9,99	9,99
<b>%</b>	<b>%</b>	Costes directos complementarios	0,02	107,81	2,16
				<b>Coste total</b>	<b>109,97 €</b>

Unidad de obra 6: Filtros RC

<b>Cod.</b>	<b>Unidad</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>P.unitario(€)</b>	<b>P.total(€)</b>
<b>MAT15</b>	Ud	Resistencia 3300 Ohm	2	0,02	0,04
<b>MAT16</b>	Ud	Condensador 10 µF	2	0,35	0,70
<b>%</b>	<b>%</b>	Costes directos complementarios	0,02	0,74	0,01
				<b>Coste total</b>	<b>0,75 €</b>

Unidad de obra 7: Interconexión dispositivos

<b>Cod.</b>	<b>Unidad</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>P.unitario(€)</b>	<b>P.total(€)</b>
<b>MAT17</b>	Ud	Breadboard ELEGOO MB-102	1	3,33	3,33
<b>MAT18</b>	Ud	Breadboard ELEGOO 170x6	1	2,33	2,33
<b>MAT19</b>	Ud	Pack Jumper Cable 65Ud macho a macho	1	4,27	4,27
<b>MAT20</b>	Ud	Pack Cable de Puente Macho a Hembra 40Ud	1	3,99	3,99
<b>MAT21</b>	Ud	Resistencia 10 kOhm	1	0,04	0,04
<b>MAT22</b>	Ud	Pack 20 Pulsadores	1	0,27	0,27
<b>%</b>	<b>%</b>	Costes directos complementarios	0,02	14,23	0,28
				<b>Coste total</b>	<b>14,51 €</b>

Total CAPITULO 2

125,24 €

### CAPITULO 3 : Ingeniería

#### Unidad de obra 8: Trabajo del Ingeniero

Cod.	Unidad	Descripción	Cantidad	P.unitario(€)	P.total(€)
<b>MO1</b>	h	Ingeniero en practicas	360	16	5760
%	%	Costes directos complementarios	0,02	5760	115,2
				Coste total	5875,2

TOTAL CAPITULO 3 5.875,20 €

Presupuesto ejecución material	6.727,48 €
Gastos generales (13%)	874,57 €
Beneficio industrial (6%)	52,47 €
Presupuesto ejecución por contrata	7.654,53 €
21% IVA	1.607,45 €
Presupuesto Base licitación	9.261,98 €

Asciende el presupuesto a la cantidad de NUEVE MIL DOSCIENTOS SESENTA Y UNO EUROS CON NOVENTA Y OCHO CÉNTIMOS

## 2. VALORACIÓN ECONÓMICA DEL PRESUPUESTO

Tal y como puede verse, en un principio el coste puede parecer elevado, sin embargo costes como son los de ingeniería únicamente repercutirían en las primeras unidades fabricadas. De este modo una vez desarrollado el dispositivo, cada uno de estos podría tener un coste alrededor de 1000 euros, por lo que se trataría de un dispositivo económico frente al resto de alternativas del mercado, las cuales tienen un coste muy superior. Cabe destacar que, en la Unidad de obra 1, se han incluido dos dispositivos, dado que se llegaron a imprimir dos prototipos diferentes, tal y como se ha comentado a lo largo del presente documento.

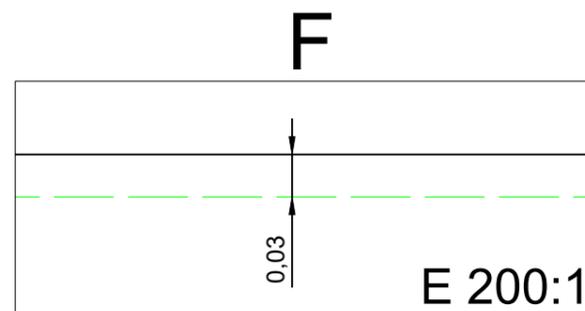
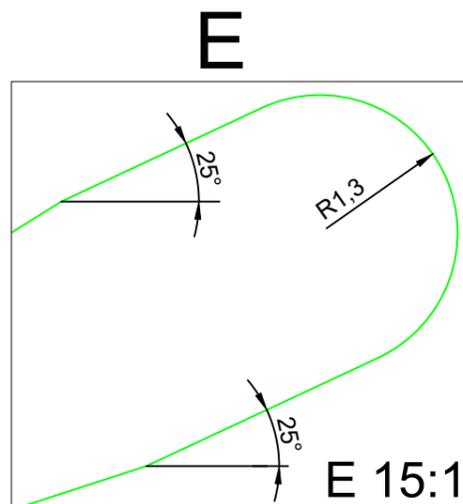
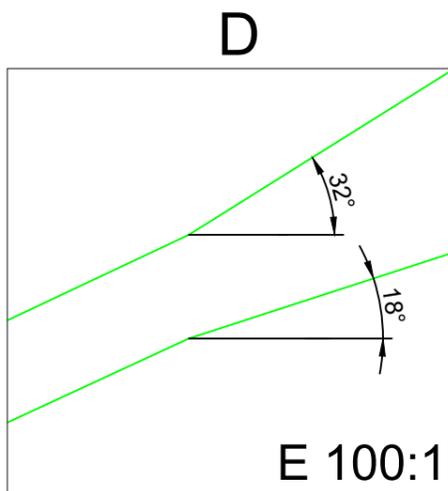
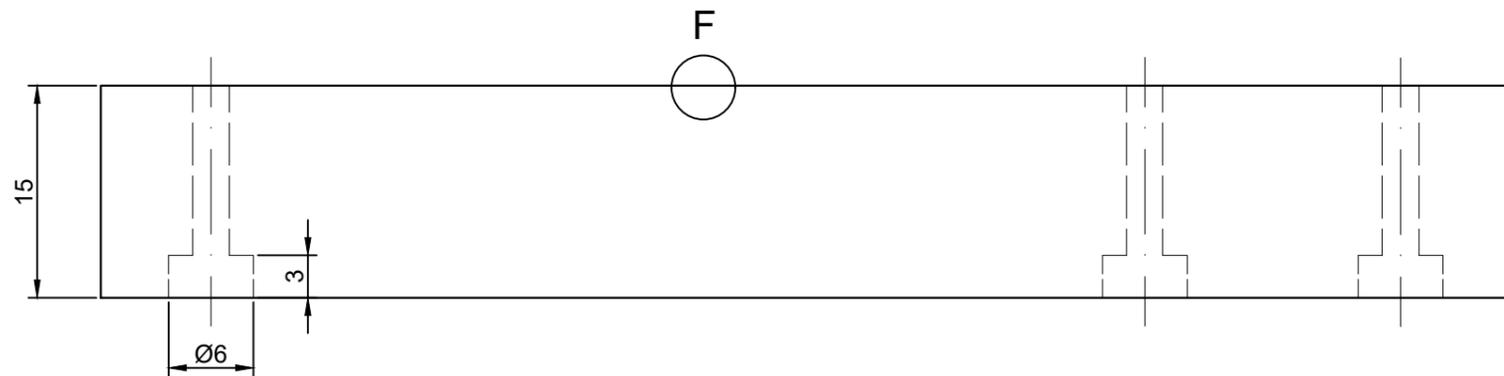
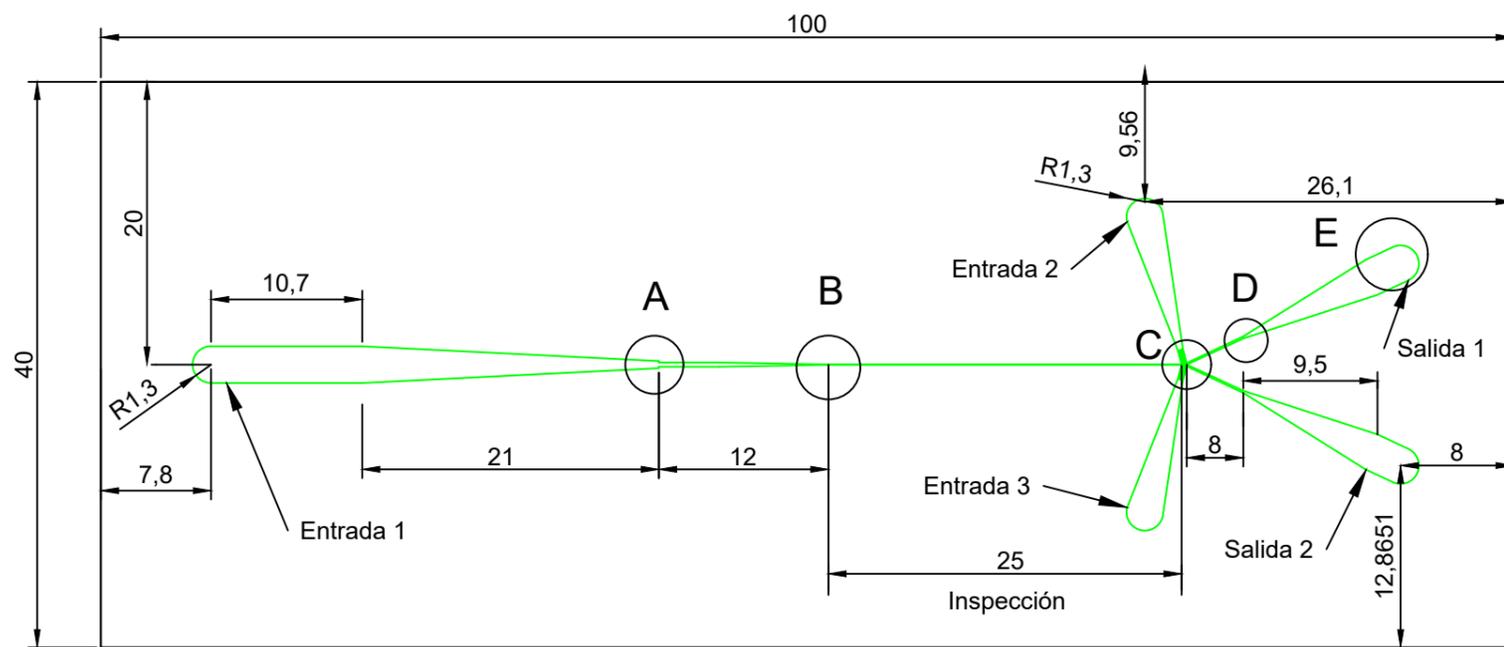
Por otro lado, en el caso de que se deseara trabajar con varios de estos dispositivos en el laboratorio, se podría reutilizar toda la parte de bombeo y electrónica, haciendo a este sistema ampliamente versátil y reutilizable, además de poder introducir mejoras y modificaciones debido a que se trata de una plataforma abierta.

Finalmente, por todo lo anterior y teniendo en cuenta las modificaciones mencionadas en el apartado 6.2, con el objetivo de obtener un dispositivo totalmente funcional, se deduce que podría ser una alternativa viable para la manipulación e inspección de *C. elegans*.

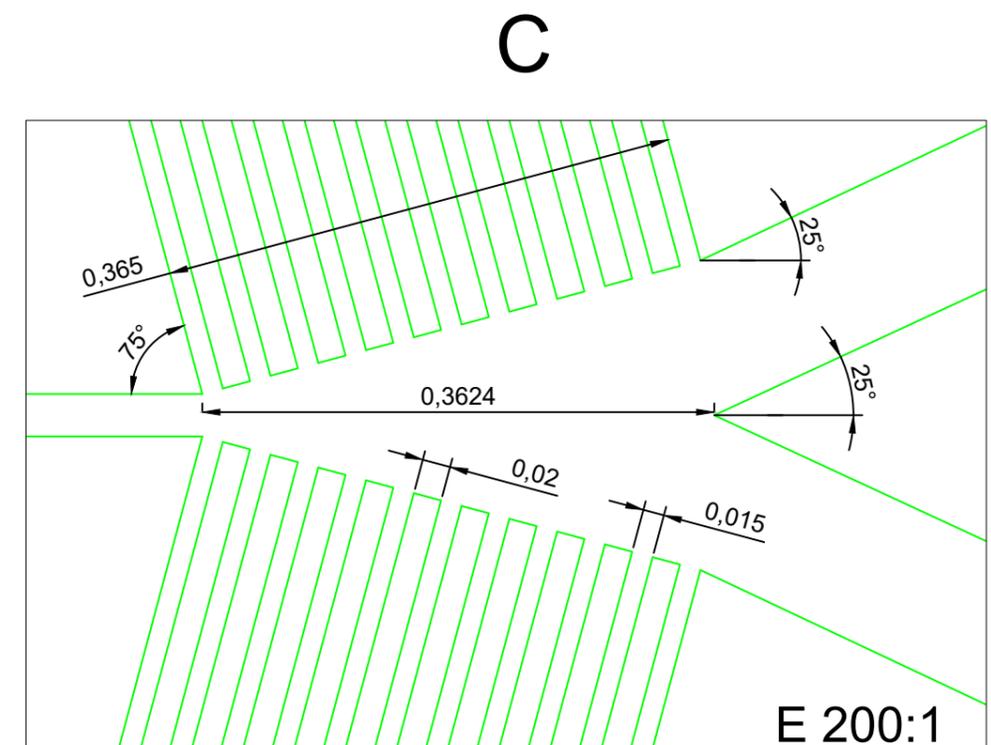
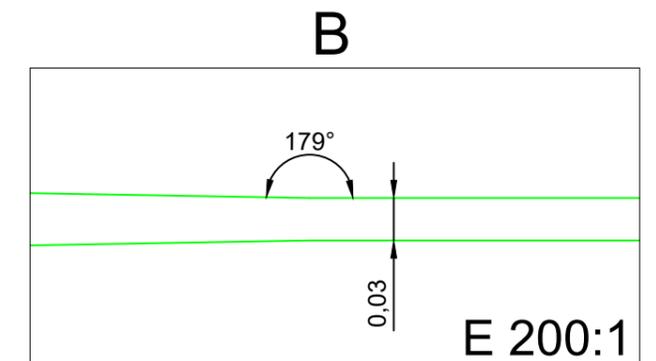
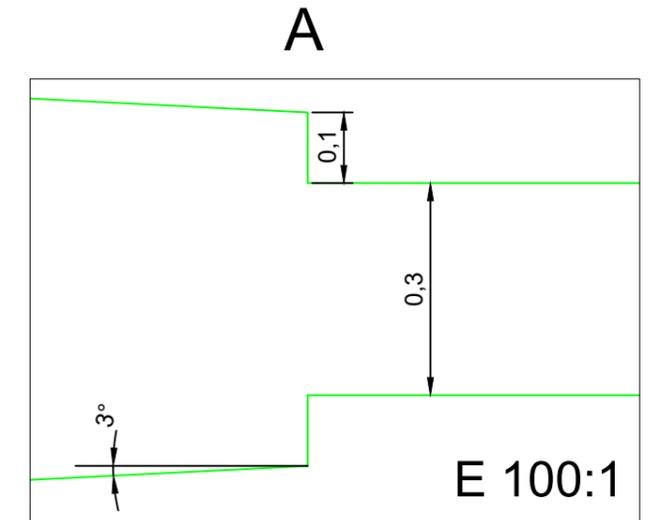


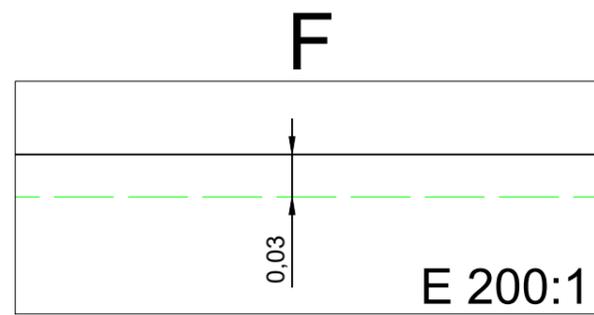
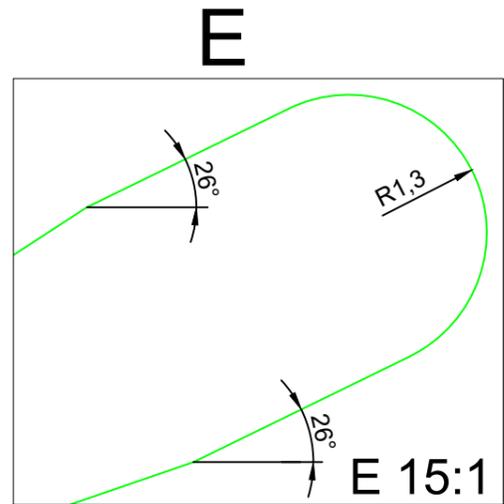
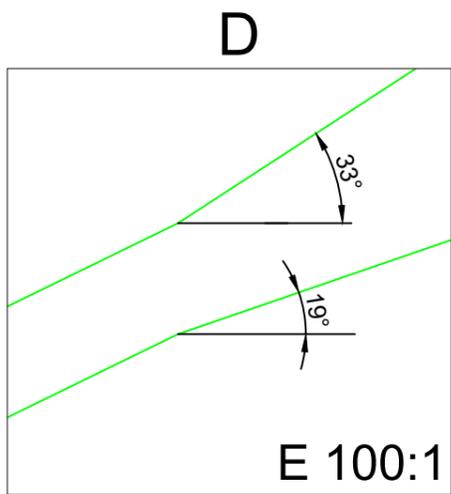
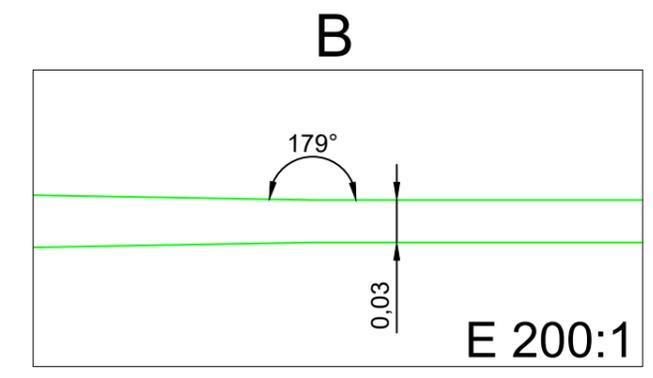
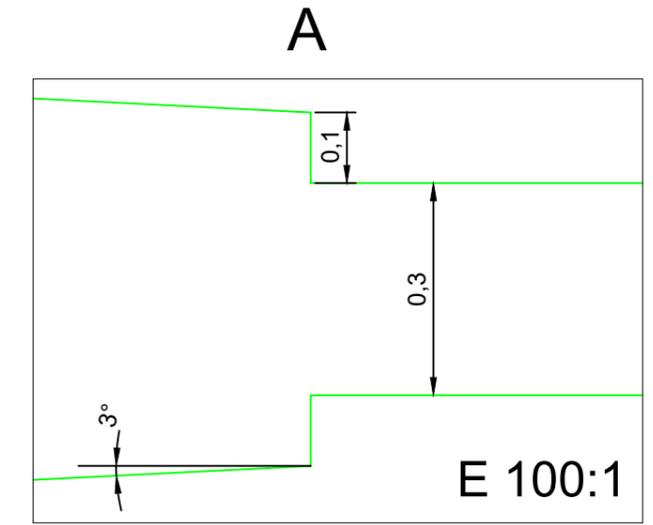
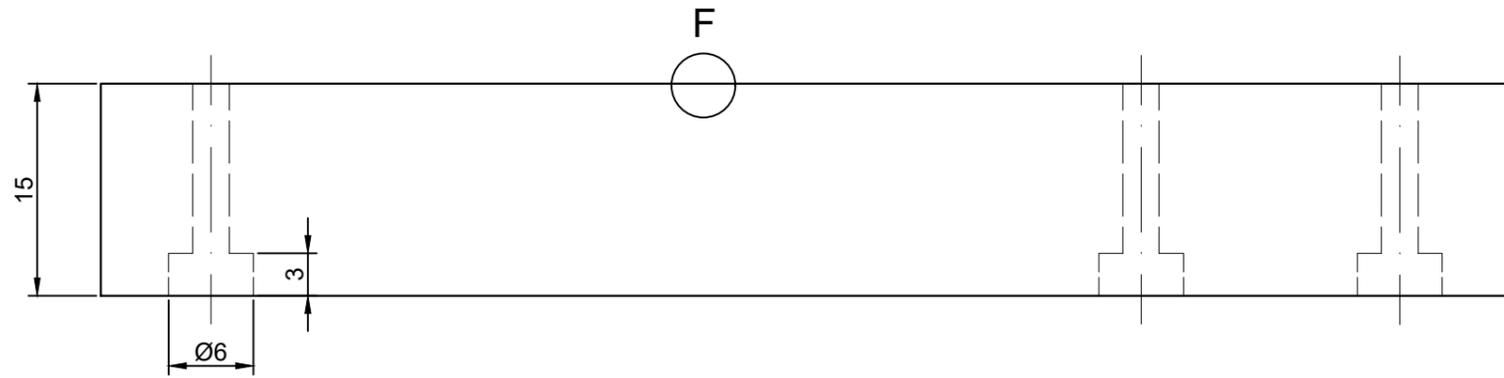
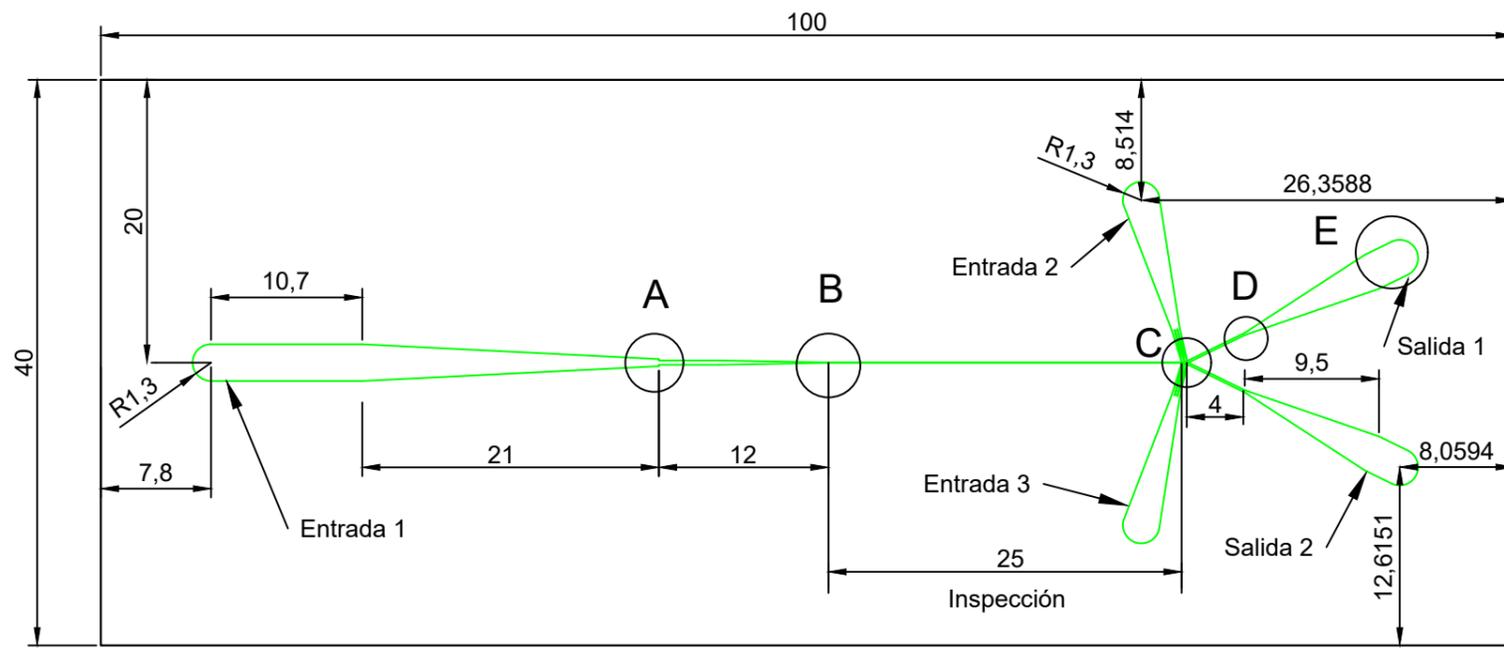
Estudio de un Dispositivo Basado en Microfluídica para la Manipulación y la Inspección de *C. elegans*

---

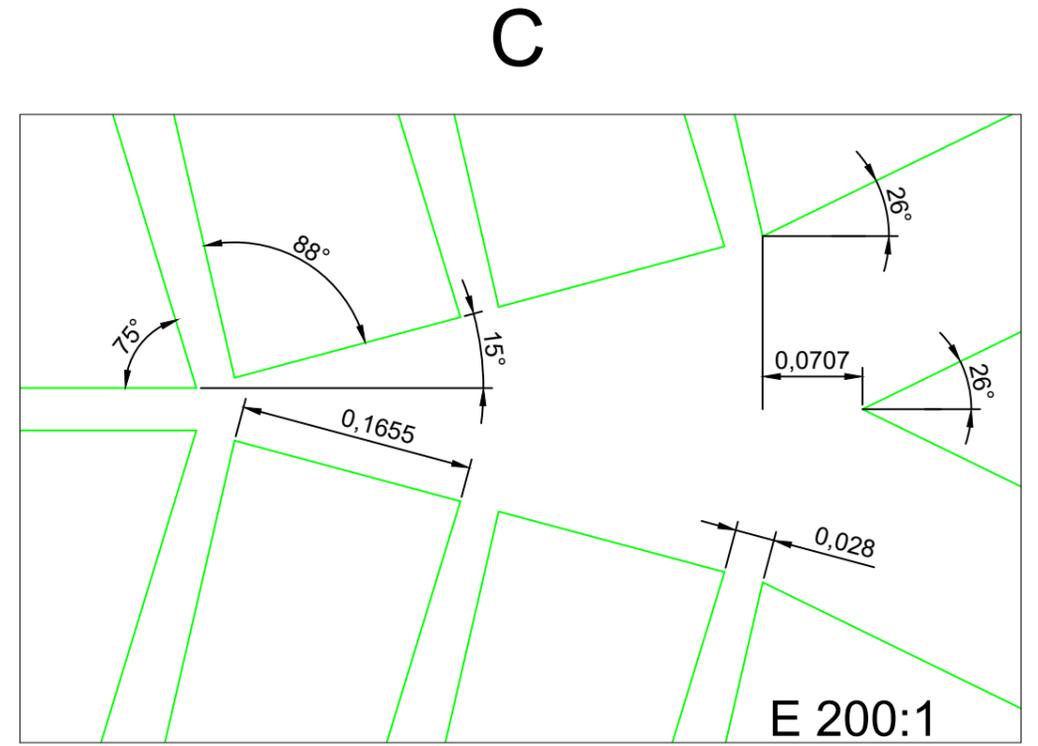


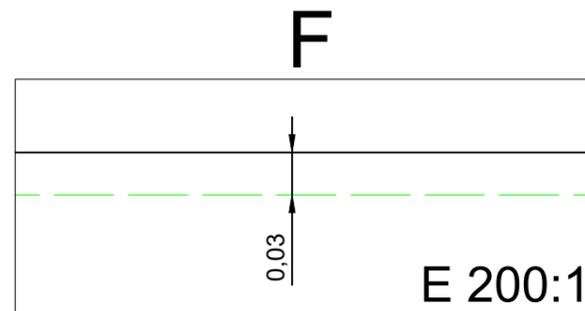
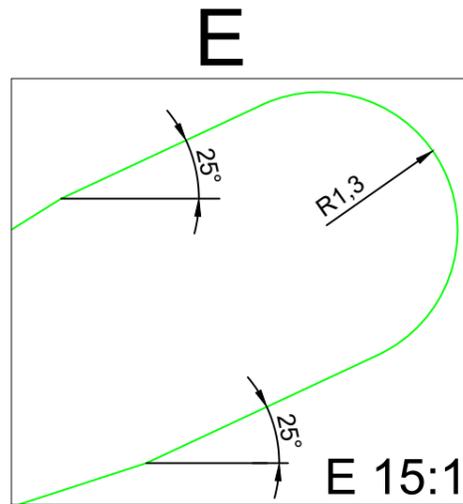
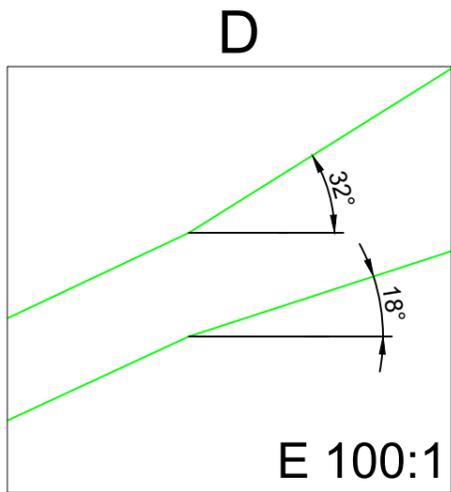
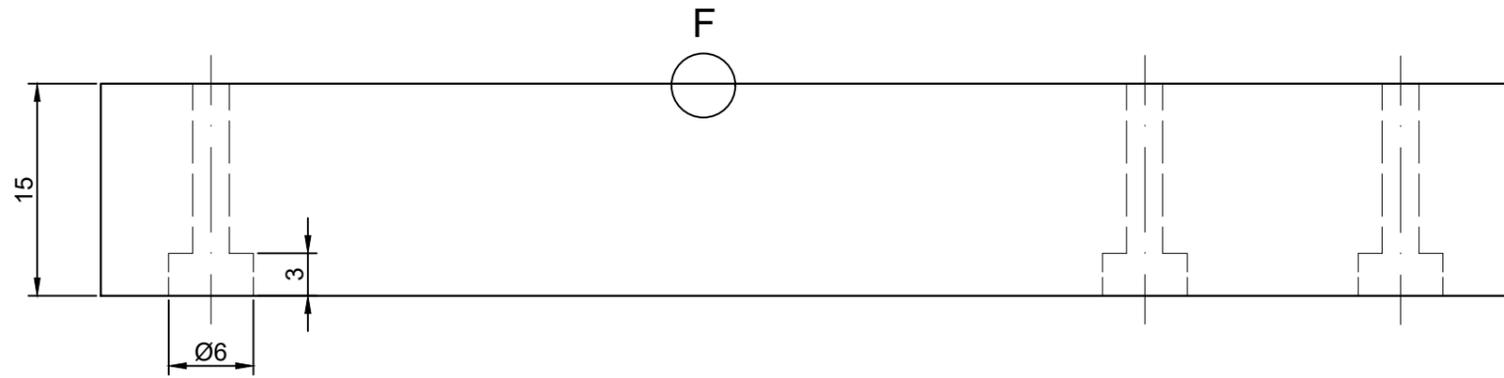
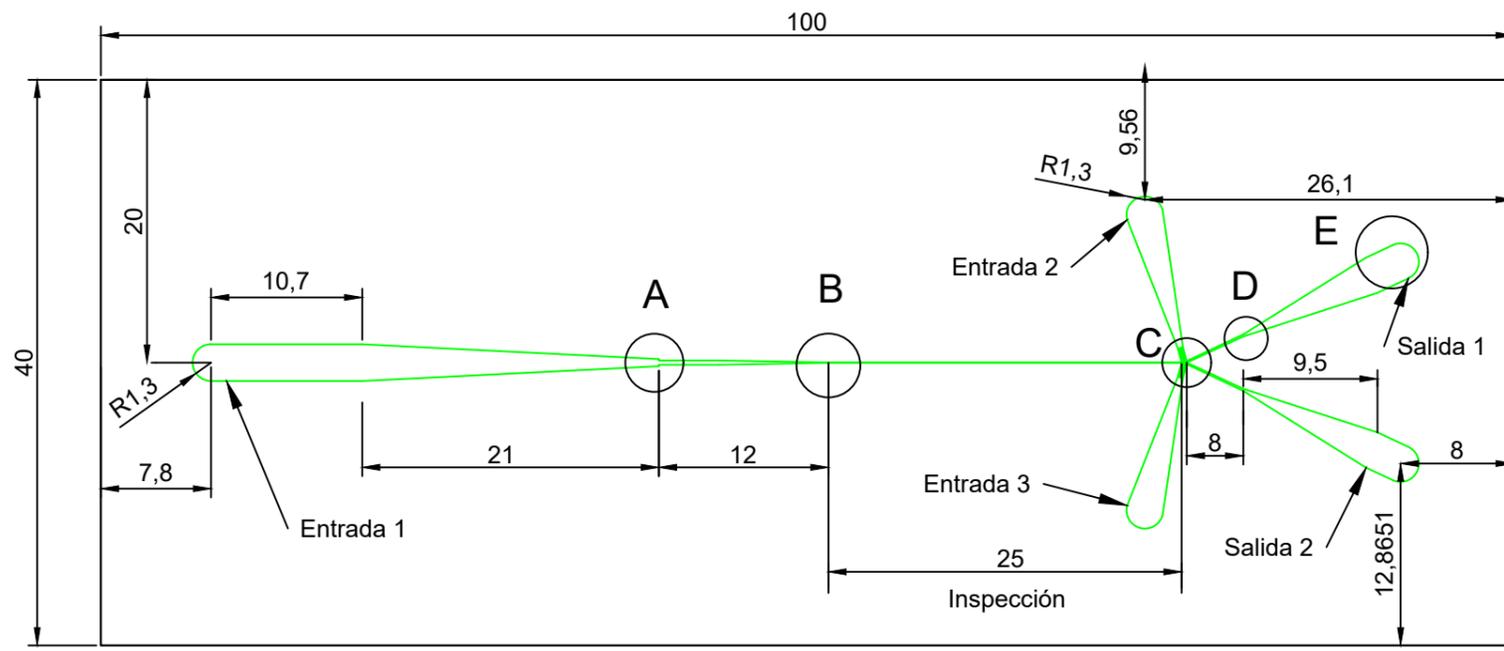
Canales



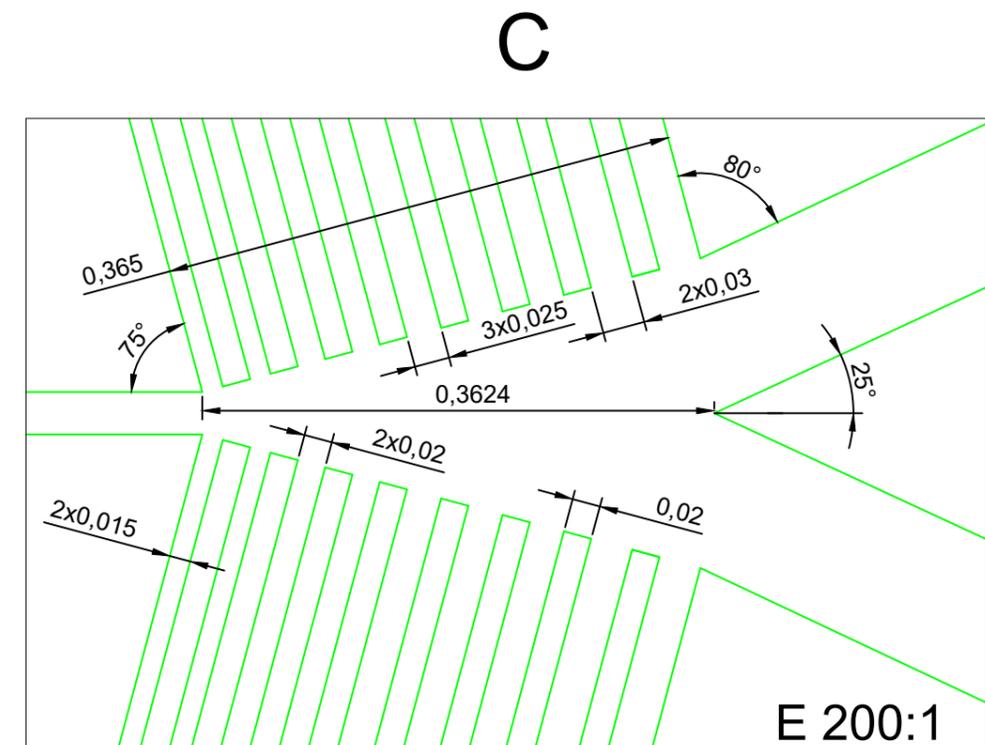
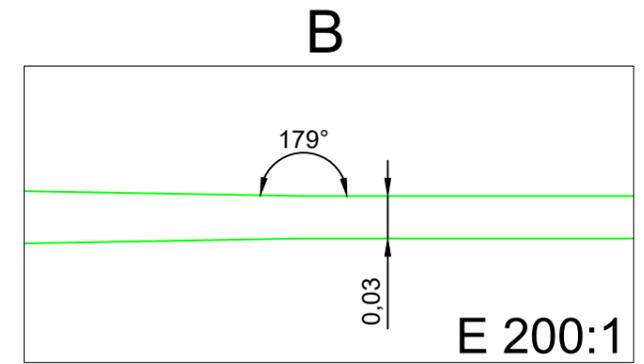
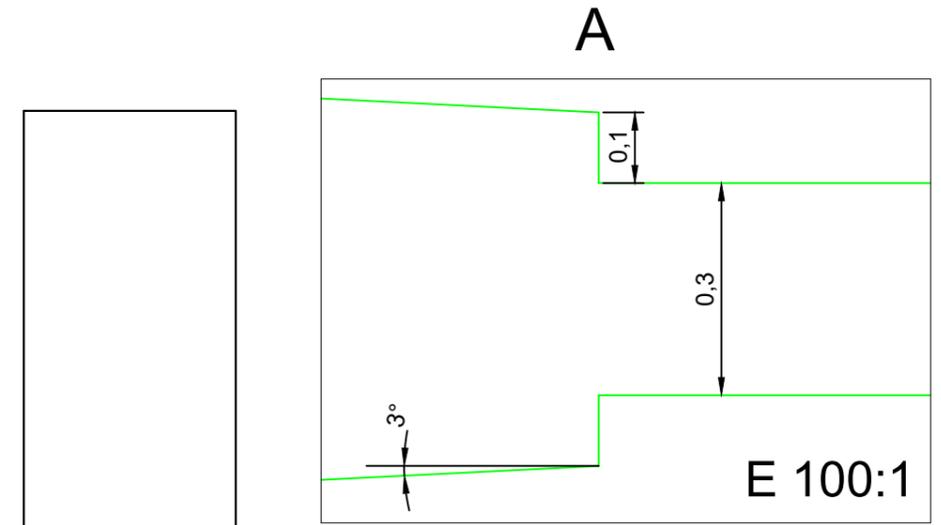


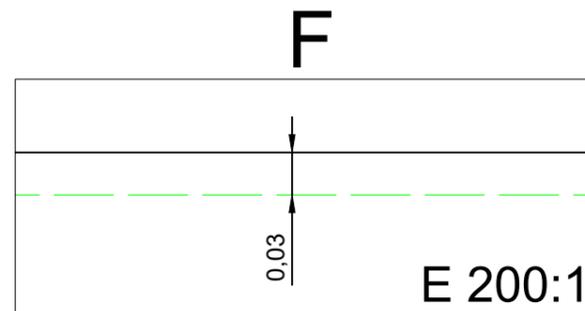
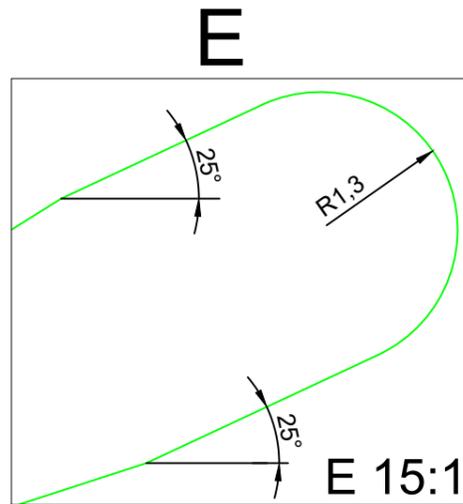
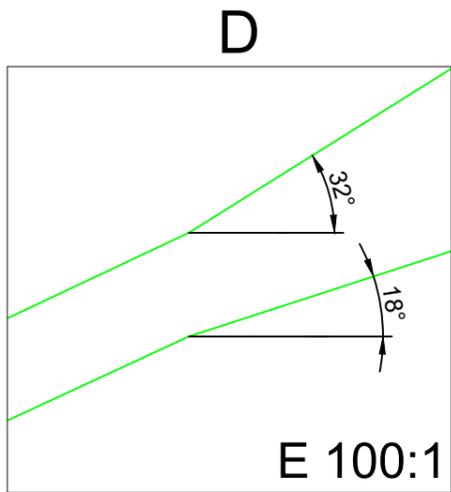
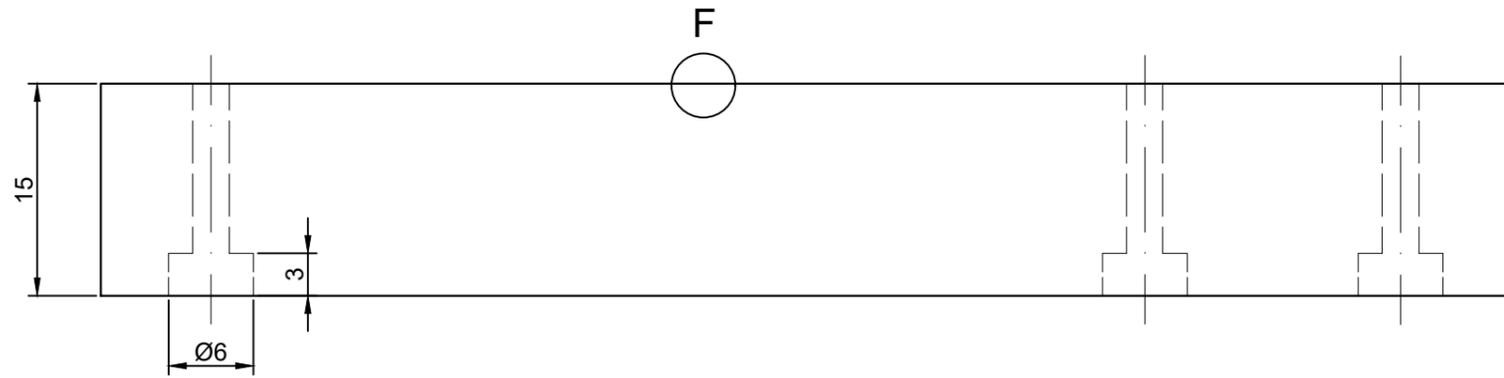
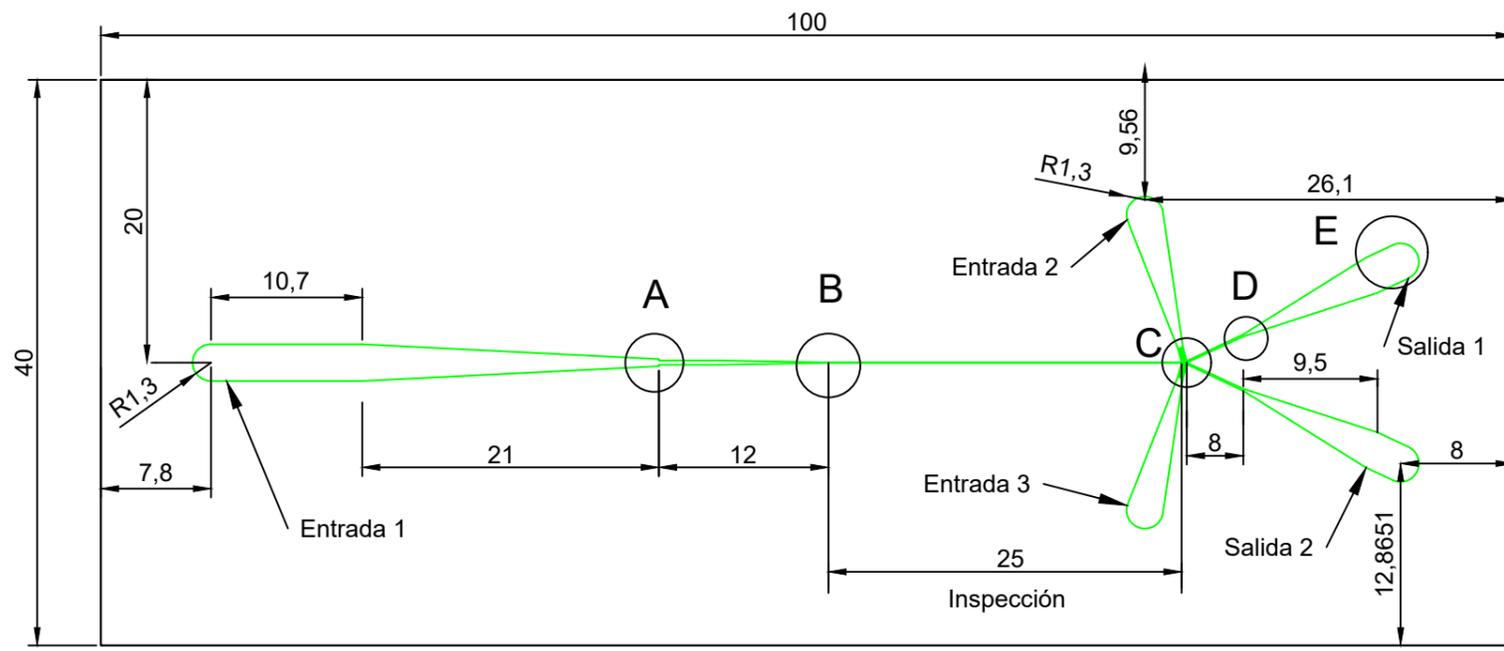
Canales



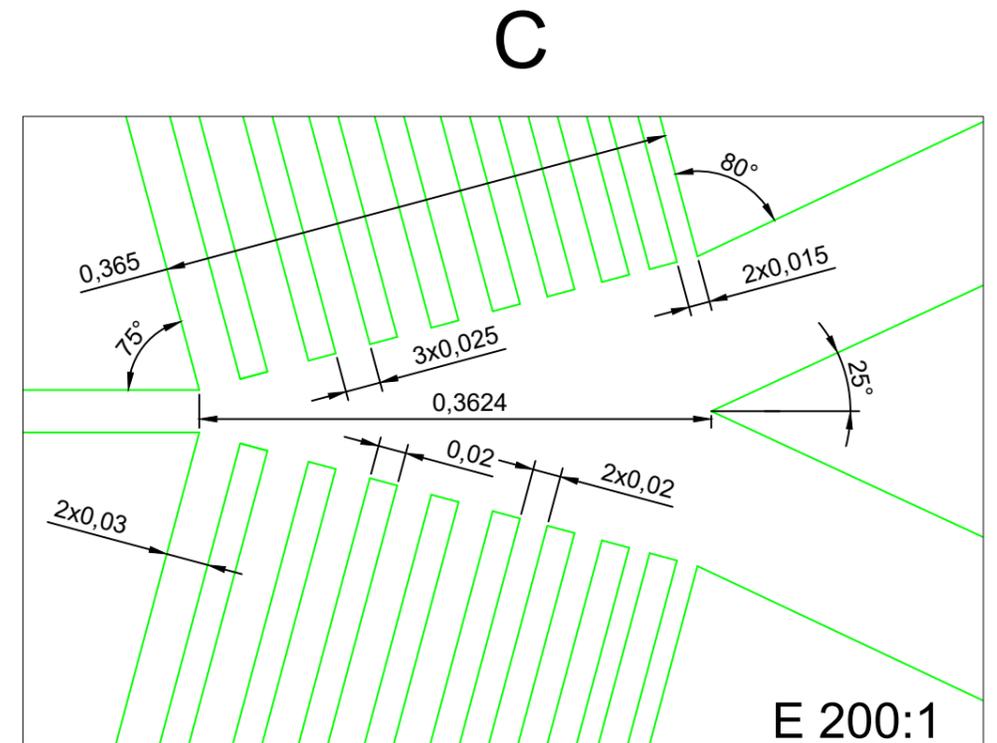
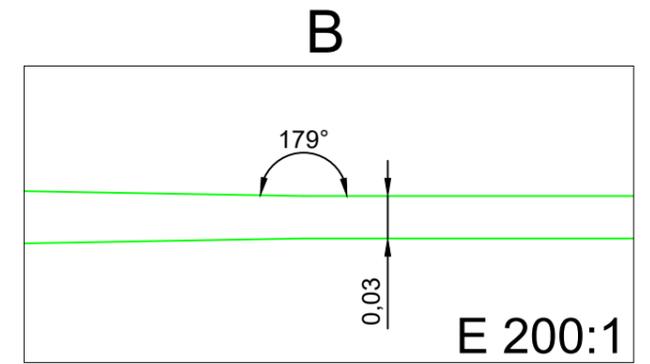
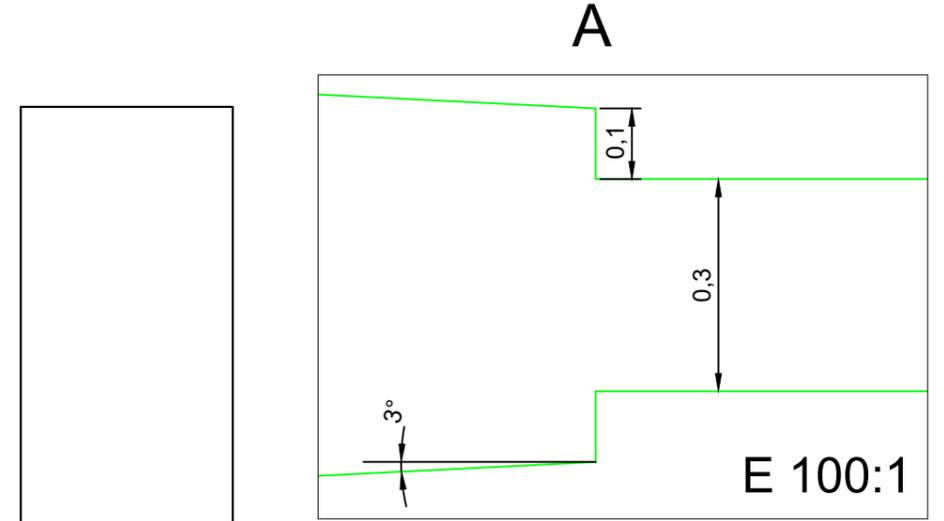


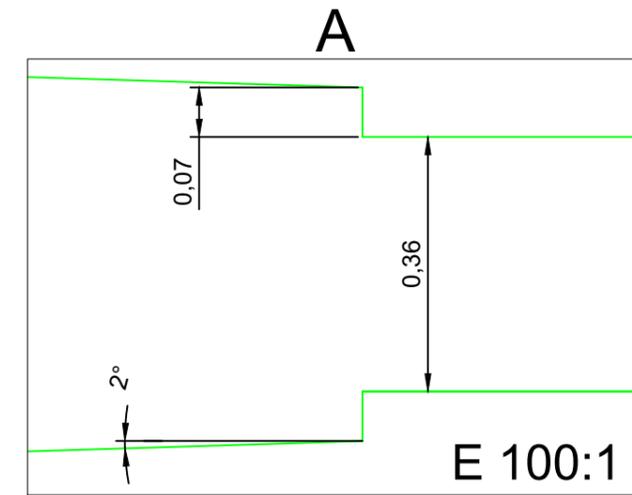
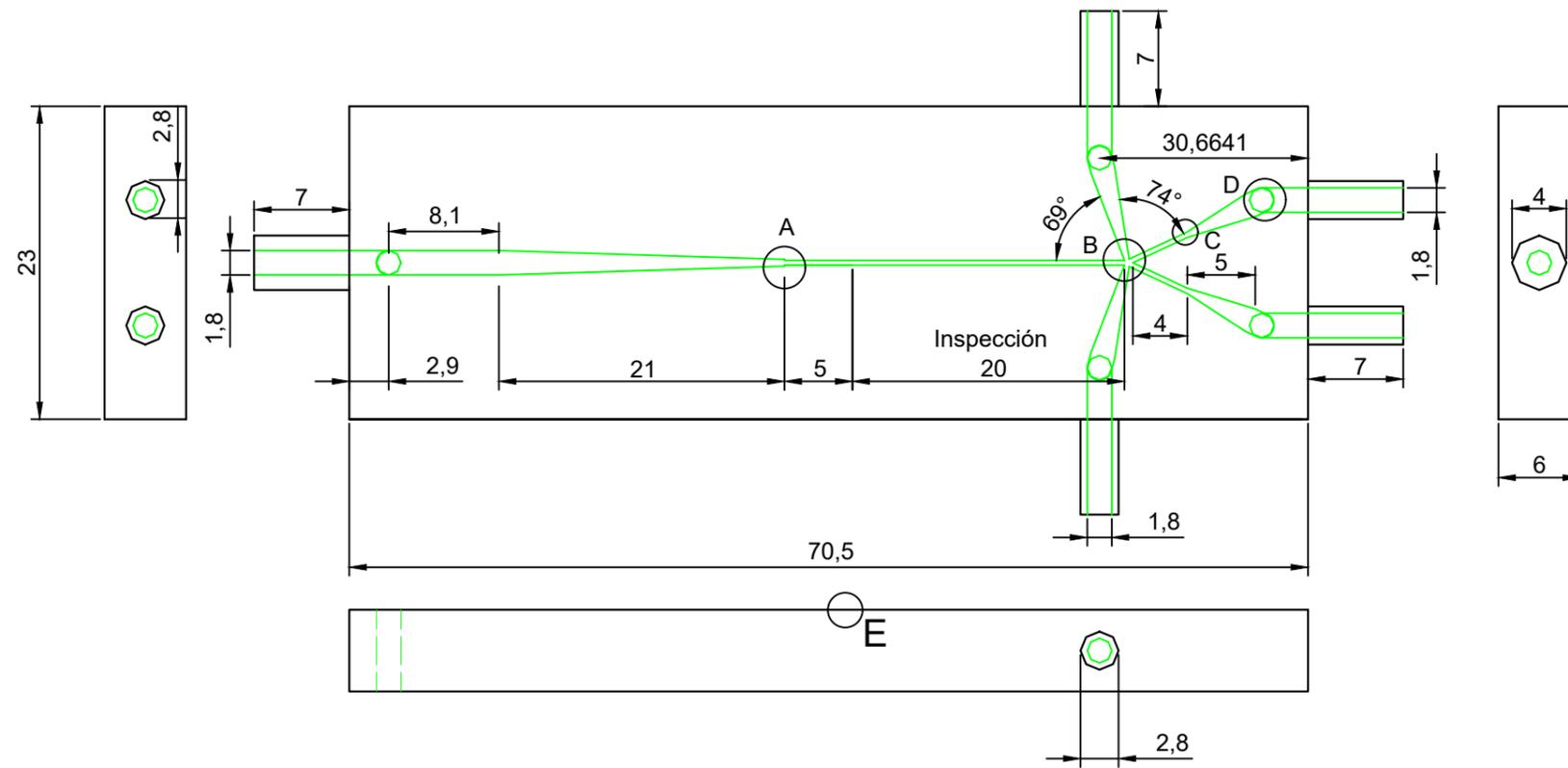
Canales





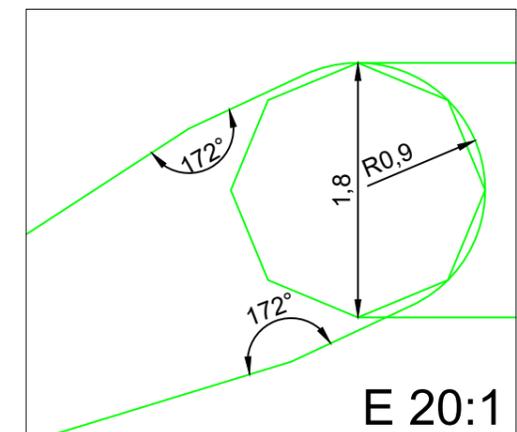
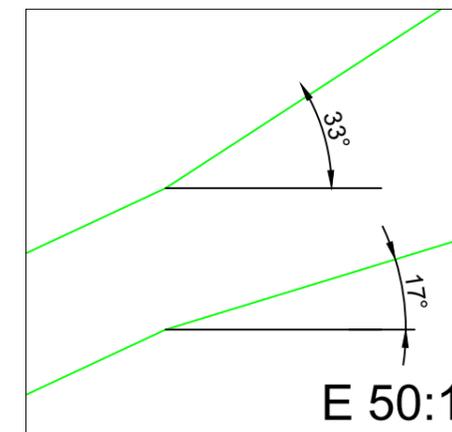
■ Canales



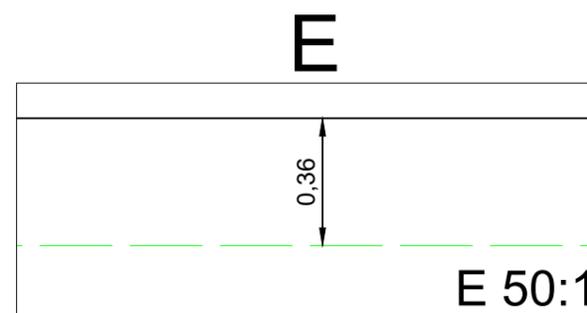
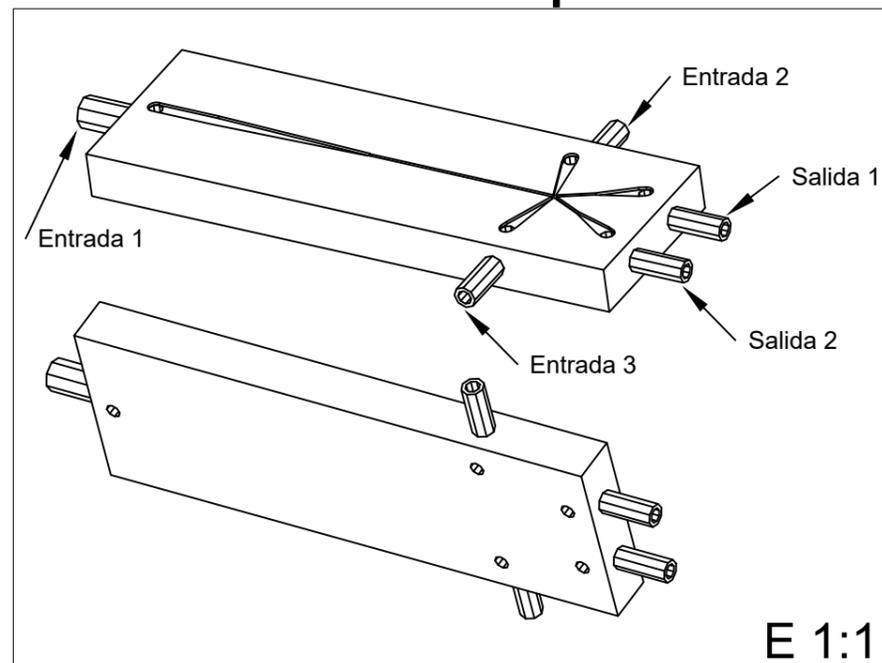


C

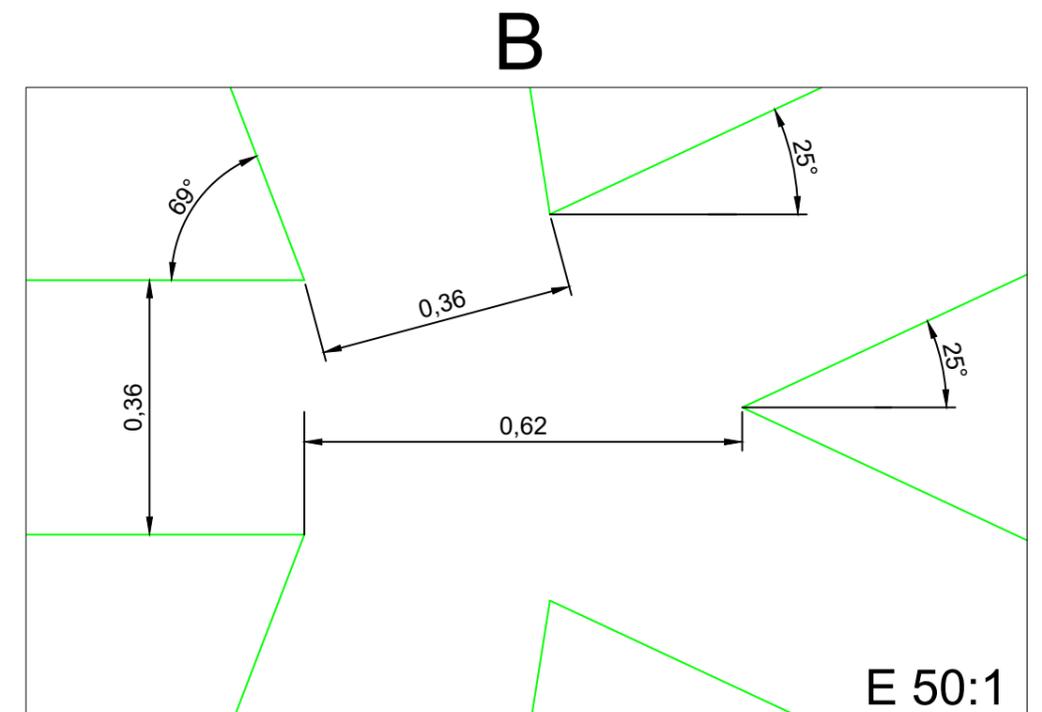
D

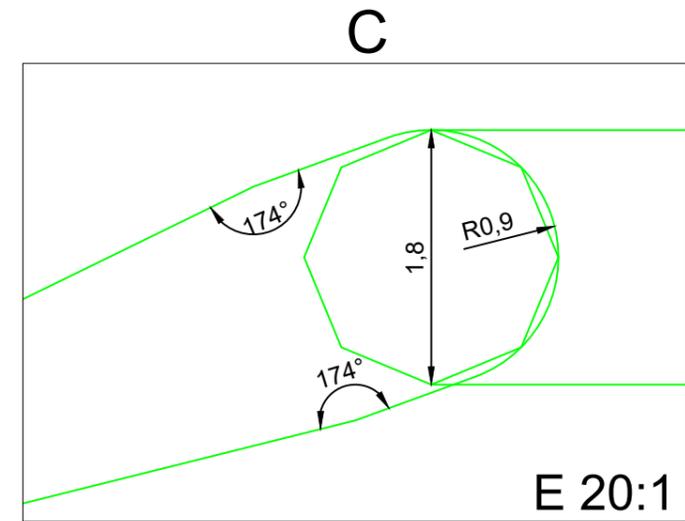
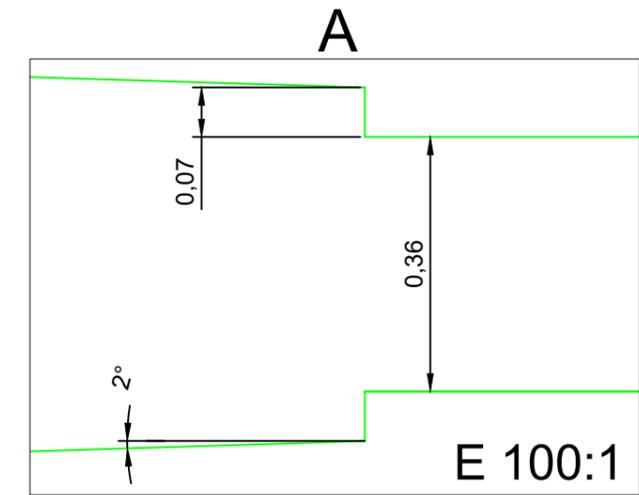
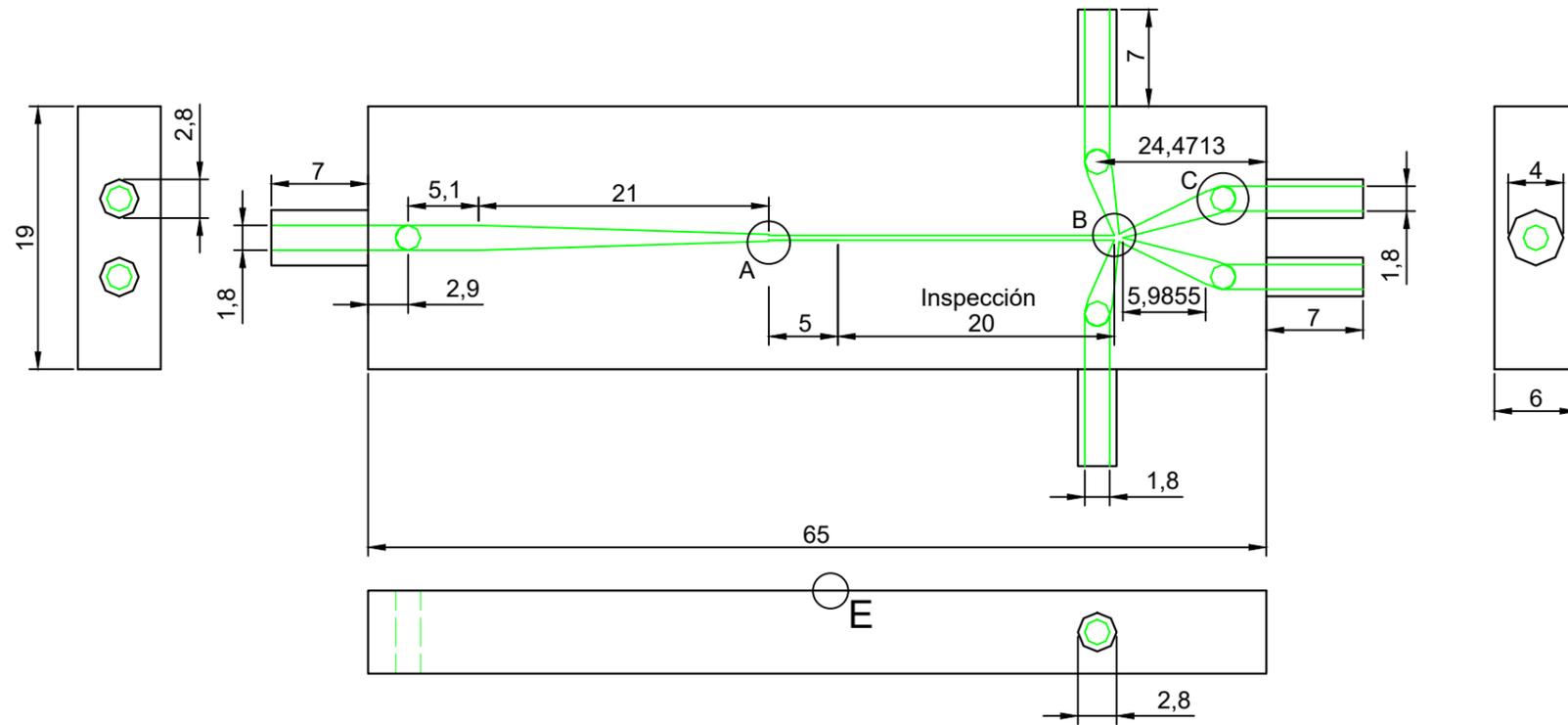


## Vista 3D Dispositivo

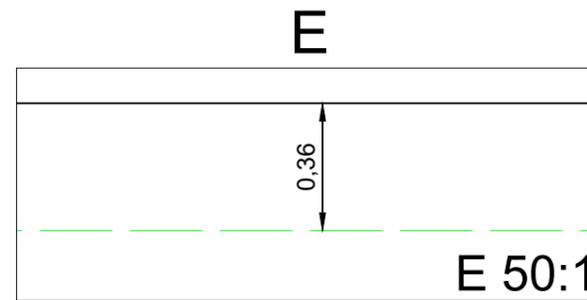
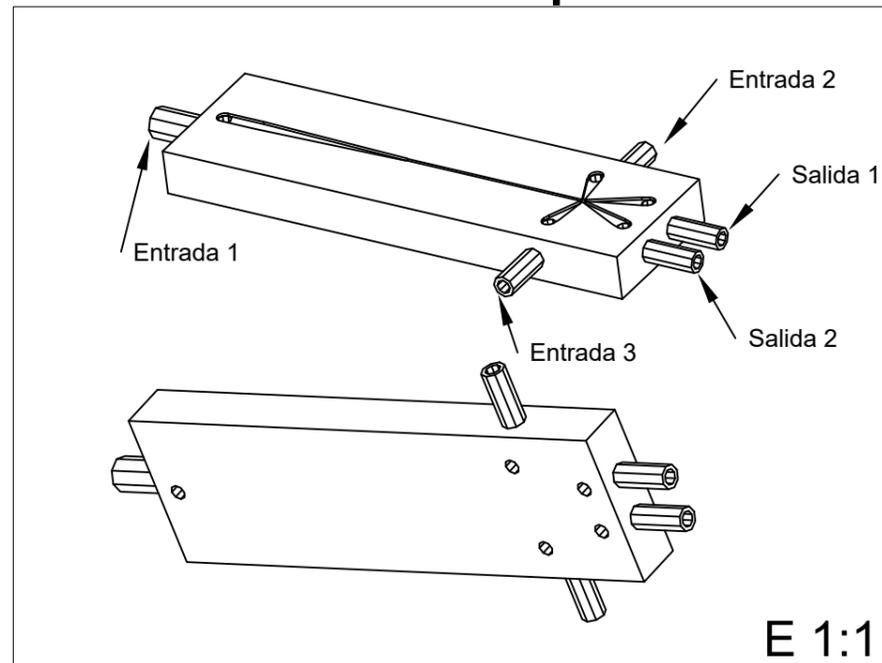


■ Canales





## Vista 3D Dispositivo



 Canales

