



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIEROS  
INDUSTRIALES VALENCIA

**TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

# **DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE BIORREACTOR CON SISTEMA DE INTERCAMBIO DE MEDIOS DE CULTIVO**

AUTORA: ANA LEONOR LEÓN ORTUÑO

TUTORA: MARÍA SALUD GUILLEM SÁNCHEZ

COTUTORES: BATISTE ANDREU MARTÍNEZ CLIMENT  
MIGUEL RODRIGO BORT

**Curso Académico: 2015-16**



## AGRADECIMIENTOS

*“A mi tutora, María, y en especial a Ramón Albert, por su apoyo y dedicación en este trabajo*

*A todos los profesores que me han dado clase, porque sin sus enseñanzas y formación  
no sería la ingeniera biomédica que soy*

*A mi madre y mi hermana, por levantarme siempre ante las dificultades y  
animarme a luchar por conseguir mis sueños*

*A mis amigos, por compartir conmigo estos maravillosos cuatro años  
y convertirlos en inolvidables”*



## Resumen

El infarto de miocardio supone la principal causa de muerte en los países industrializados. El problema es que los tratamientos clínicos convencionales presentan ciertas limitaciones. Este fenómeno ha propiciado el auge de nuevos campos como la Ingeniería Tisular Cardíaca, cuyo principal objetivo es regenerar el miocardio dañado creando tejidos artificiales a partir de la combinación de biomateriales y células cardiomiogénicas. Sin embargo, para ello es imprescindible disponer de un biorreactor que permita controlar las condiciones físico-químicas del entorno en que estas células van a crecer y madurar.

En el presente Trabajo Final de Grado se ha desarrollado un prototipo de biorreactor basado en un sistema automático de intercambio del medio de cultivo presente en una siembra de células, que permite mantener unas condiciones de cultivo óptimas, y por consiguiente, garantizar la supervivencia celular. Éste está integrado por dos bombas que trabajan de forma coordinada para retirar y suministrar el medio y un sensor óptico que se encarga de medir el pH, medida que se toma como indicativa de la necesidad de cambiar el medio de cultivo. Además, se ha desarrollado una interfaz gráfica de usuario en MATLAB® que permite al usuario manejar el sistema e introducir los parámetros de control de manera más sencilla e intuitiva.

Este biorreactor se caracteriza por presentar un sistema de administración de volumen muy preciso (pudiendo suministrar una cantidad mínima de 1 µl) y un sistema de medida de pH que reporta errores dentro de un intervalo de confianza de  $0.1525 \pm 0.0914$ , lo que resulta suficientemente aceptable para satisfacer las especificaciones requeridas en el presente proyecto. Actualmente, el biorreactor desarrollado está siendo utilizado en experimentos de cardiología en la unidad de investigación del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

**Palabras clave:** *Infarto de miocardio, Ingeniería Tisular, Instrumentación biomédica, Biorreactores, Cultivos celulares, Renovación medio de cultivo, Medición de pH.*



## Resum

L'infart de miocardi suposa la principal causa de mort en els països industrialitzats. El problema és que els tractaments clínics convencionals presenten certes limitacions. Aquest fenomen ha propiciat l'auge de nous camps com l'Enginyeria Tisular Cardíaca, el principal objectiu de la qual és regenerar el miocardi danyat creant teixits artificials a partir de la combinació de biomaterials i cèl·lules cardiomiogèniques. No obstant això, per a això és imprescindible disposar d'un bioreactor que permeti controlar les condicions fisicoquímiques de l'entorn en què aquestes cèl·lules van a créixer i madurar.

En el present Treball Final de Grau s'ha desenvolupat un prototip de bioreactor basat en un sistema automàtic d'intercanvi del medi de cultiu present en una sembra de cèl·lules, que permet mantindre unes condicions de cultiu òptimes, i per consegüent, garantir la supervivència cel·lular. Aquest està integrat per dues bombes que treballen de forma coordinada per a retirar i subministrar el medi, i un sensor òptic que s'encarrega de mesurar el pH, mesura que es pren com indicativa de la necessitat de canviar el medi de cultiu. A més, s'ha desenvolupat una interfície gràfica d'usuari en MATLAB® que permet a l'usuari manejar el sistema i introduir els paràmetres de control de manera més senzilla i intuïtiva.

Aquest bioreactor es caracteritza per presentar un sistema d'administració de volum molt precís (podent subministrar una quantitat mínima de 1 µl) i un sistema de mesura de pH que reporta errors dins d'un interval de confiança de  $0.1525 \pm 0.0914$ , la qual cosa resulta prou acceptable per a satisfer les especificacions requerides en el present projecte. Actualment, el bioreactor desenvolupat està sent utilitzat en experiments de cardiologia en la unitat d'investigació de l'Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

**Paraules clau:** *Infart de miocardi, Enginyeria Tisular, Instrumentació biomèdica, Biorreactors, Cultius cel·lulars, Renovació medi de cultiu, Mesura pH.*





## **Abstract**

Myocardial infarction supposes the main cause of death in the industrialized countries. The problem relies on the fact that the clinical conventional treatments show certain limitations. This phenomenon has propitiated the rise of new fields such as Cardiac Tissue Engineering, whose main objective is the damaged myocardium regeneration, creating artificial tissues from the combination of biomaterials and cardiomyogenic cells. Nevertheless, it is indispensable for this to have a bioreactor that allows to control the environmental physical and chemical conditions in which these cells are going to grow and mature.

In this Final Project a bioreactor prototype has been developed, based on an automatic renovation system of the culture medium present in a sowing cell, which allows to maintain a culture optimal conditions, and therefore, to guarantee the cell survival. The device consists of two pumps that work in a coordinated way in order to withdraw and supply the medium, and an optical sensor that is in charge of the measurement of pH, which is taken as an indicator of the need to change the culture medium. Furthermore, a user interface has been developed in MATLAB® that allows the user to handle the system and to enter the control parameters in a simpler and more intuitive way.

This bioreactor is characterized by having a really accurate volume administering system (being able to supply a minimal quantity of 1  $\mu$ l) and a pH measurement system that reports errors within a confidence interval of  $0.1525 \pm 0.0914$ , which is considered pleasing enough to satisfy the required specifications in this project. Currently, the developed bioreactor is being used in cardiology experiments in the Research Unit of the Gregorio Marañón Hospital in Madrid.

**Keywords:** *Myocardial infarction, Tissue Engineering, Biomedical instrumentation, Bioreactors, Cell cultures, Culture medium renovation, pH measurement.*



# **ÍNDICE GENERAL**

- **DOCUMENTO I: MEMORIA**
- **DOCUMENTO II: PRESUPUESTO**



# MEMORIA

---

*DOCUMENTO I*



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Motivación.....</b>	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Antecedentes clínicos .....</b>	<b>4</b>
3.1.1 Infarto de miocardio. ....	4
3.1.2 Ingeniería Tisular Cardíaca.....	4
3.1.3 Medios de cultivo.....	7
<b>3.2 Antecedentes técnicos .....</b>	<b>9</b>
3.2.1 Biorreactores: descripción y estado del arte .....	9
3.2.2 Técnicas de medición de pH .....	13
3.2.3 Bombas de inyección: aplicaciones y estado del arte.....	14
3.2.4 Prototipado de piezas: Impresión 3D .....	15
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Hardware.....</b>	<b>19</b>
4.1.1 Diseño bomba de inyección.....	19
4.1.2 Diseño soporte sensor RGB.....	23
4.1.3 Diseño electrónico.....	25
<b>4.2 Control electrónico del biorreactor .....</b>	<b>36</b>
4.2.1 Modo de funcionamiento manual .....	36
4.2.2 Modo de funcionamiento automático .....	38
4.2.3 Interfaz gráfica de usuario.....	38
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Curva de calibración de volumen .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Curva de calibración de pH .....</b>	<b>46</b>
<b>5.3 Estudio comparativo con sistema de medida de pH estándar.....</b>	<b>49</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>6.1 Líneas futuras .....</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO I. ESQUEMAS ELÉCTRICOS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO II. CÓDIGO ARDUINO .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO III. TABLAS DE RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>





## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el campo de la Ingeniería Tisular ha experimentado un crecimiento exponencial. El interés en la misma radica en el hecho de que esta técnica tiene como objetivo la creación de tejidos artificiales 3D o sustitutos celulares que permitan la regeneración de tejidos u órganos restaurando, manteniendo y mejorando sus funciones (Fisher et al, 2013). En particular, recientemente ha emergido con fuerza el campo de la Ingeniería Tisular Cardíaca, debido a que las enfermedades cardíacas siguen siendo una de las principales causas de muerte en los países desarrollados, donde lidera el infarto de miocardio contribuyendo al menos a una quinta parte de las muertes reportadas. Así, la Ingeniería Tisular Cardíaca proporciona una alternativa a las limitaciones que presentan las terapias clínicas actuales (cirugía de by-pass, trasplante cardíaco, tratamiento farmacológico, dispositivos de asistencia ventricular, etc.) intentando restaurar el miocardio dañado a través del diseño de constructos que permitan recuperar la función mecánica del corazón (Pascual-Gil et al, 2015; Ye y Black, 2011; Domenech et al, 2016).

Este campo permite tanto la generación artificial de tejido cardíaco funcional para su uso como parches en el miocardio dañado (Martínez-Ramos et al, 2014; Pok y Jacot, 2011), como la generación de sistemas biológicos in vitro que permitan estudiar el comportamiento físico-químico de los cardiomiocitos mediante tests controlados para investigar las posibles patologías asociadas o bien desarrollar terapias efectivas basadas en células con potencial cardiorregenerativo (Freed et al, 2006; Wendt et al, 2009). Actualmente, la investigación se está centrando en identificar la fuente ideal de células para crear tejido cardíaco bioartificial (Finosh y Jayabalan, 2012). Así, los resultados de los ensayos clínicos demuestran que la implantación de células madre adultas es una técnica segura y que mejora la función cardíaca (Houtgraaf et al, 2012; Vunjak-Novakovic y Scadden, 2011).

Sin embargo, este campo se encuentra todavía en fase de experimentación ya que aún existen algunos problemas asociados a la complejidad estructural y funcional de este tipo de tejido que necesitan ser resueltos (Vunjak-Novakovic et al, 2010). La generación bioartificial de tejido con una compleja estructura y función no es factible realizarla mediante el cultivo de células en sistemas basados en placas Petri únicamente, ya que sin el entorno y estímulos físico-químicos apropiados, las células no son capaces de mantener su forma, fenotipo y función, perdiendo así la habilidad de proliferar y formar tejidos organizados (Bilodeau y Mantovani, 2006). Es por esto que el uso de biorreactores se ha convertido en un aspecto fundamental de la Ingeniería Tisular. Sin embargo, éstos presentan el inconveniente de que se trata de sistemas con un alto coste económico y muy poco adaptables.

En el presente proyecto se ha desarrollado y validado un prototipo de biorreactor basado en impresión 3D cuyo objetivo es mantener unas condiciones óptimas de cultivo en células destinadas a fines de regeneración de miocardio, gracias a la actuación de un sistema automático que permite realizar un cambio del medio de cultivo (sin la necesidad de extraer el cultivo del incubador) siempre que detecta que dichas condiciones no son las apropiadas para el crecimiento y maduración celular, lo cual viene indicado por una disminución del pH del medio.

Cabe mencionar que el presente trabajo se ha llevado a cabo en el Instituto Universitario de Investigación Biomédica bioITACA de la Universidad Politécnica de Valencia. Además, para la elaboración del mismo se ha contado con el apoyo y colaboración de la unidad de investigación del

## INTRODUCCIÓN

Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, en cuyo laboratorio se ha instalado el biorreactor desarrollado.

### **1.1 Motivación**

Bajo este contexto, la principal motivación para la realización del presente proyecto es la de desarrollar un nuevo tipo de biorreactor que permita el cambio automático del medio de cultivo cuando las condiciones del mismo no sean óptimas para la supervivencia celular, destinado principalmente a aplicaciones de Ingeniería Tisular Cardíaca, y que permita además superar las limitaciones que presentan los actuales sistemas comerciales y sea adaptable a las necesidades del experimento.

Lo que se pretende además con este biorreactor es fabricar un equipo que facilite al personal de laboratorio el complicado, costoso y exhaustivo proceso que supone intercambiar el medio de cultivo cada cierto período de tiempo de forma manual. Su capacidad de funcionamiento automático tiene como intención ahorrar tiempo de trabajo al personal evitando que éste se vea obligado incluso a acudir días festivos al laboratorio para realizar el proceso de recambio del medio, pudiendo emplear dicho tiempo en seguir investigando o en realizar otras tareas más importantes durante el experimento.

Por otra parte, el hecho de cambiar el medio de manera automática pretende eliminar la necesidad de extraer el cultivo del incubador para hacerlo, reduciendo así el riesgo de contaminación que supone el traslado del mismo a la campana de flujo laminar para realizar el cambio manual y el riesgo de exposición de cualquier zona u objeto no esterilizado con el cultivo.

Asimismo, el propósito es que su diseño basado en impresión 3D reporte el beneficio de contar con un sistema propio cuyo hardware sea fácilmente modificable según las preferencias del usuario, escalable y totalmente reproducible. También, como ventaja frente a los equipos comerciales, el objetivo es contar con un sistema de código abierto, característica que lo convierta en fácilmente programable y adaptable a las necesidades del experimento siempre que se requiera.

Por último, el desarrollo de este nuevo biorreactor tiene como última finalidad disponer de un equipo con un reducido coste económico en comparación con otros equipos disponibles en el mercado, permitiendo destinar dicho ahorro económico a otras necesidades del experimento.

## OBJETIVOS

### 2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto es el diseño, desarrollo y validación de un prototipo de biorreactor que permita el intercambio automático del medio en un cultivo de células, tomando como referencia de que éste debe renovarse la medida del nivel de pH, todo ello con el fin de mantener en todo momento bajo control las condiciones óptimas de cultivo que permitan el adecuado crecimiento y maduración de las células hacia tejido cardíaco.

Para llevar a cabo el presente proyecto, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Diseño e implementación de un sistema de intercambio de medio de cultivo.
- Incorporación de un sistema de registro automático de pH en tiempo real y de manera continua.
- Programación del microcontrolador para el control del sistema desde el PC y de forma inalámbrica.
- Diseño y programación de una interfaz gráfica de usuario.
- Obtención de las curvas de calibración de volumen y pH necesarias.
- Comprobación del correcto funcionamiento y sinergia del biorreactor desarrollado.



### 3. ANTECEDENTES

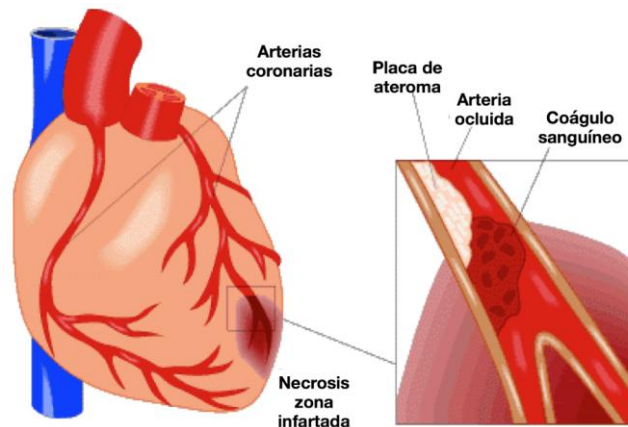
#### 3.1. Antecedentes clínicos

##### 3.1.1 Infarto de miocardio

La principal causa de muerte en la cultura occidental es la cardiopatía isquémica, consecuencia de un flujo sanguíneo coronario insuficiente (Hall y Guyton, 2011). La causa más frecuente de una disminución del flujo sanguíneo coronario es la aterosclerosis, donde la placa aterosclerótica provoca la aparición de un coágulo de sangre (trombo) en la zona que provoca la oclusión de la arteria coronaria.

Si esta oclusión de la arteria es completa, el flujo sanguíneo cesa en los vasos coronarios distales a la oclusión haciendo que la zona de miocardio irrigada por los mismos se vuelva necrótica y pierda su función muscular. Esto es lo que se conoce como infarto de miocardio (véase Figura 1). Pasadas unas semanas o meses, se forma en esa zona tejido de granulación que forma una escara fibrótica en el músculo cardíaco. El infarto puede alcanzar todo el espesor de la pared, denominándose transmural, o bien limitarse al tercio o mitad interna de la misma, lo que se conoce como infarto subendocárdico.

Además, el infarto de miocardio puede presentar una gran variedad de complicaciones. Entre ellas, la más habitual es la insuficiencia cardíaca, que se manifiesta por una capacidad de bomba del ventrículo muy deprimida como consecuencia de la reducción de masa contráctil, y que puede llegar a desencadenar el fallo cardíaco o un shock cardiogénico (Virag et al, 2007). Otras complicaciones frecuentes son la aparición de arritmias cardíacas, el estancamiento de sangre en el sistema venoso (pudiendo provocar edema pulmonar) o la rotura de la zona infartada.



**Figura 1. Infarto de miocardio. Se muestra un corazón que ha sufrido un infarto con su correspondiente necrosis muscular y una ampliación de la placa de ateroma que forma el coágulo sanguíneo y la oclusión de la arteria coronaria (National Institutes of Health).**

##### 3.1.2 Ingeniería Tisular Cardíaca

Entre los tratamientos actuales frente al fallo cardíaco ocasionado tras un infarto de miocardio se incluyen los dispositivos de asistencia mecánica y, en última instancia, el trasplante cardíaco. Sin

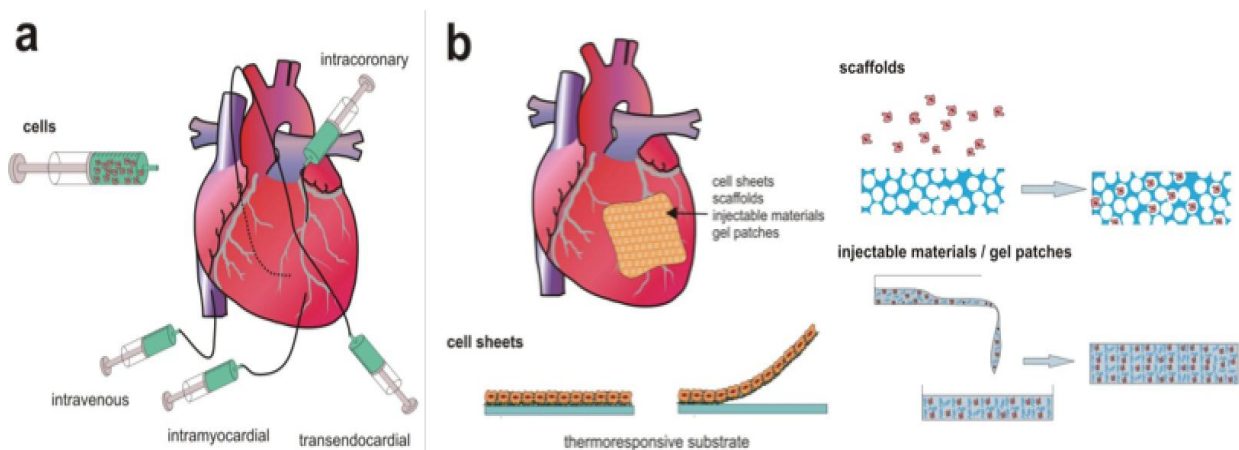
ANTECEDENTES

embargo, estos tratamientos presentan limitaciones tales como posibles rechazos, infecciones o la existente baja tasa de donantes (Canver y Chanda, 2001). Por este motivo, la investigación se está centrando en el desarrollo de nuevas terapias que permitan reparar el miocardio dañado, con el objetivo de mejorar la calidad de vida del paciente y su pronóstico (Nugent y Edelman, 2003).

Durante casi una década, se ha estudiado como terapia celular la posibilidad de inyectar directamente sobre el tejido dañado células aisladas con potencial cardiomiogénico (véase Figura 2A) (Murry et al, 2005). Sin embargo, ensayos clínicos han reportado que aproximadamente el 90% de las células se pierden en la circulación o se escapan del sitio de inyección (Leor et al, 2000), y que el 90% de las células que consiguen penetrar, mueren durante la primera semana (Müller-Ehmsen et al, 2002).

En este contexto nace la Ingeniería Tisular Cardíaca, cuyo objetivo es generar músculo cardíaco biocompatible y no inmunológico con propiedades morfológicas y funcionales idénticas a las del miocardio nativo (Zimmermann y Cesnjevar, 2009). Para conseguir este propósito, en los últimos años se han establecido cuatro enfoques distintos (véase Figura 2B):

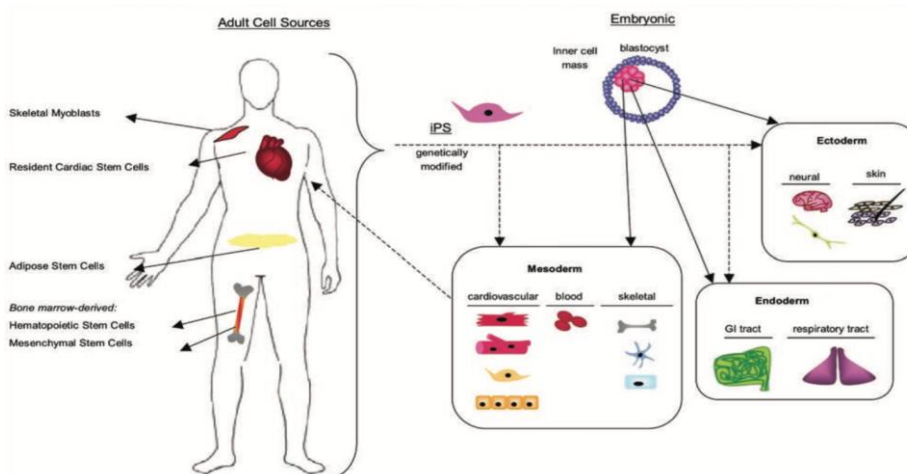
- Apilamiento de capas de cardiomiocitos que formen un constructo de tejido cardíaco contráctil (Shimizu et al, 2002).
- Decelularización de tejido cardíaco. Esta técnica consiste en eliminar todos los componentes celulares del tejido cardíaco con el objetivo de conservar su matriz extracelular (que mantiene intacta la orientación de las fibras cardiacas y la estructura vascular) para sembrar en ella nuevas células madre cardiomiogénicas (Ott et al, 2008).
- Generación de injertos/parches de tejido cardíaco in vitro. Esta técnica consiste en el cultivo in vitro de células en matrices sintéticas o scaffolds hechas de biomateriales y su posterior implantación en la superficie del pericardio (Zimmermann et al, 2006).
- Inyección en el miocardio de células madre contenidas en un biomaterial (hidrogel) que es capaz de liberarlas directamente en la pared del miocardio dañado, favoreciendo su retención (Lu et al, 2009).



**Figura 2. Aproximaciones actuales a la ingeniería de tejido cardíaco. (A) Terapia celular clásica. (B) Diferentes métodos para la generación de parches cardíacos: multicapas de cardiomiocitos, integración en scaffolds o biomateriales inyectables (Arnal-Pastor et al, 2013).**

ANTECEDENTES

En cualquier caso, para una adecuada regeneración del miocardio la selección del tipo de célula que se va a implantar es fundamental (Passier et al, 2008). La Figura 3 muestra los tipos de células humanas más examinadas para regeneración cardíaca.



**Figura 3. Células empleadas en reparación cardíaca. Se muestra tanto la fuente de células utilizadas (células madre adultas, células madre embrionarias, células madre cardíacas o células madre pluripotenciales inducidas) como las células en las que éstas pueden diferenciarse (Vunjak-Novakovic et al, 2010).**

Las células madre embrionarias podrían ser la fuente de cardiomiocitos ideal para la regeneración del miocardio ya que presentan capacidad de vasculogénesis y miogénesis, son omnipotentes y pueden integrarse eléctricamente con el miocardio nativo (Caspi et al, 2007). Sin embargo, presentan las desventajas de que no son autólogas (por lo que su implantación puede producir rechazo inmunológico), son propensas a formar teratomas y su utilización conlleva implicaciones éticas (Nussbaum et al, 2007).

Otra alternativa es la utilización de células madre adultas procedentes de la médula ósea (hematopoyéticas o mesenquimales), del tejido adiposo, etc., ya que éstas proporcionan la ventaja de que no exhiben rechazo inmunológico (Gimble et al, 2007; Kocher et al, 2001). Sin embargo, se ha demostrado que las células mesenquimales son capaces de inducir vasculogénesis pero no necesariamente miogénesis (Dai et al, 2005). Otras células madre adultas que se empezaron a implantar con éxito fueron los mioblastos esqueléticos, pero recientes estudios han demostrado que están relacionadas con la aparición de arritmias (Reinecke et al, 2000).

La opción ideal sería la utilización de células madre cardíacas, las cuales no presentan ningún inconveniente a la hora de diferenciarse en cardiomiocitos y formar tejido miocárdico, ya que están programadas para ello (Barile et al, 2007). Desafortunadamente, la técnica para extraer dichas células es muy compleja y únicamente se consigue recolectar una pequeña cantidad (Smits et al, 2009).

Con el objetivo de superar los problemas de las células madre embrionarias relacionados con el rechazo inmunológico, han surgido recientemente las llamadas células madre pluripotenciales inducidas (Takahashi et al, 2007). Se trata de células somáticas modificadas genéticamente con factores que les confieran dicha pluripotencialidad, con la ventaja de que también son autólogas (Narazaki et al, 2008).

## ANTECEDENTES

Por otra parte, otro de los requisitos esenciales para una correcta regeneración del miocardio es la formación de una adecuada matriz extracelular en términos de composición, estructura y propiedades mecánicas, que permita una adecuada proliferación y diferenciación celular. Ésta puede fabricarse artificialmente (scaffold) para los casos de generación de parches cardíacos o bien se puede inducir a las células a que formen su propia matriz en el caso de ser directamente inyectadas en el miocardio dañado (Dawson et al, 2008; Lee et al, 2008).

Por último, también es fundamental un acoplamiento electromecánico de las células con el miocardio dañado y la generación de fuerza contráctil para restablecer la función muscular del miocardio. Así, diversos estudios han demostrado que el entrenamiento electromecánico de las células a implantar supone una herramienta indispensable para la maduración y diferenciación de las células hacia tejido cardíaco adulto (Zimmermann et al, 2006; Radisic et al, 2004).

### 3.1.3 Medios de cultivo

El cultivo celular es una de las herramientas más utilizadas en biología celular y molecular puesto que permite obtener excelentes modelos de sistemas biológicos para estudiar la fisiología y bioquímica de las células, el efecto de ciertos fármacos en las células, la mutagénesis y carcinogénesis, realizar pruebas de citotoxicidad y desarrollar terapias celulares. También se utiliza para el desarrollo y producción a gran escala de componentes biológicos (cultivo de virus para vacunas) y su principal ventaja es que garantiza la consistencia y reproducibilidad de los resultados utilizando un único lote de clones (Freshney, 1986).

Para que el crecimiento in vitro de células sea el adecuado y las células puedan mantener su función y estructura, éstas deben sembrarse en un recipiente que contenga un medio lo más parecido posible al medio extracelular fisiológico. Así, todo medio de cultivo debe estar provisto con los componentes nutricionales básicos (aminoácidos para la síntesis de proteínas, monosacáridos como principal fuente de energía, vitaminas y algunos iones y oligoelementos), la cantidad de hormonas y factores de crecimiento necesarios, una presión osmótica apropiada y un pH óptimo, el cual varía en función del tipo de célula (Rizzino et al, 1979).

El medio utilizado puede ser natural o sintético. Los medios naturales se corresponden con los fluidos propios del organismo (plasma, suero, linfa), por lo que éstos presentan la ventaja de que son ricos en nutrientes y hormonas y además presentan una presión osmótica y pH muy similar a la del organismo. Sin embargo, su proceso de producción es muy complejo y existe una gran variación entre los diferentes lotes, cosas que dificultan su reproducibilidad y estandarización. Además, en el caso del suero, algunos de sus componentes pueden ser tóxicos para las células o bien, para algunas células, el suero puede inhibir su proliferación. Todos estos factores han hecho que poco a poco los medios naturales de cultivo hayan sido reemplazados por medios sintéticos.

Los medios sintéticos son medios diseñados y preparados artificialmente, estandarizados y con una amplia variedad de usos en función de cuales sean los requisitos de experimentación. Éstos se dividen principalmente en los siguientes grupos:

- Medios basales. Estos medios contienen los componentes básicos esenciales (aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y carbohidratos como glucosa) con los que las células pueden experimentar un buen crecimiento. Además, éstos incluyen suero como suplemento.



## ANTECEDENTES

- Medios con suero reducido. Son medios que incorporan una mayor cantidad de nutrientes con el objetivo de reducir la cantidad de suero en el medio y con ello los efectos no deseados provocados por el mismo.
- Medios sin suero. Estos medios sustituyen los componentes que aportaría el suero por los nutrientes y hormonas apropiados. La ventaja que presentan estos medios es que permiten obtener medios selectivos donde crecer un tipo de célula específico (escogiendo la combinación adecuada de factores de crecimiento) (Mariani et al, 1991).
- Medios químicamente definidos. Los componentes de estos medios se producen en bacterias o levaduras mediante ingeniería genética, de manera que la naturaleza química y las cantidades de estos componentes en el medio son completamente conocidas (Stoll et al, 1996).
- Medios sin proteínas. Estos medios no contienen componentes proteicos, tales como hormonas o factores de crecimiento. Se ha demostrado que la ausencia de proteínas en el medio favorece un mejor crecimiento celular y expresión de las proteínas, así como elimina el riesgo de transmisión de enfermedades sanguíneas, convirtiéndolos en medios de cultivo más seguros (Darfler et al, 1990).

Por otra parte, estos medios se complementan con soluciones salinas (Balanced Salt Solutions, BSS) que proveen a las células de agua e iones inorgánicos a la vez que mantienen la presión osmótica y pH fisiológicos. También se suelen incorporar antibióticos (penicilina o estreptomycin) para evitar la posible contaminación del medio (Perlman et al, 1979) y en ocasiones, estos medios también pueden incorporar soluciones (tripsina o EDTA) que permitan digerir las células adheridas a los recipientes de cultivo.

Además, los medios de cultivo también incorporan soluciones tampón para regular el pH y mantenerlo dentro de un rango fisiológico. Normalmente se utiliza el tampón bicarbonato de sodio, pero cuando se requiere un control y estabilidad del pH mucho mayor, se emplean adicionalmente tampones orgánicos (los denominados *Good's buffers*: HEPES, Tricina, etc.) que presentan una mayor capacidad tamponadora. El inconveniente de estos últimos es que son más caros que el tampón de bicarbonato de sodio y tóxicos a determinadas concentraciones.

La selección del medio de cultivo depende del tipo de célula que se pretenda cultivar, el objetivo o utilidad del cultivo y los recursos disponibles en el laboratorio. En la actualidad, los medios más comúnmente empleados que hay disponibles en el mercado son: Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), RPMI-1640, HamF10/HamF12, 199/109 y McCoy's 5A.

### **3.1.3.1 DMEM**

DMEM es una variación del medio EMEM y contiene aproximadamente 4 veces más aminoácidos y vitaminas que éste y de 2 a 4 veces más glucosa. Así, en función de la concentración de glucosa, existen dos tipos de DMEM: con alta concentración de glucosa (4500 g/L) y con baja concentración de glucosa (1000 g/L). Este medio también incluye nitrato férrico, piruvato de sodio y algunos suplementos de aminoácidos. Además, se trata de un medio basal que no contiene proteínas ni factores de crecimiento, por lo que está enriquecido con suero fetal bovino (FBS).

Por otra parte, suele utilizar una solución tampón de bicarbonato de sodio (normalmente de 3.7 g/L) y rojo fenol como indicador colorimétrico de pH. A un pH fisiológico (7.2-7.4) este indicador

## ANTECEDENTES

es de color rojo intenso, pero cuando el nivel de pH disminuye (el medio se vuelve ácido), el rojo fenol se vuelve de color amarillo y cuando el nivel de pH aumenta (el medio se vuelve alcalino) se vuelve de color fucsia.

En el presente proyecto se utilizó DMEM con alta concentración de glucosa y suplemento de piruvato y glutamina de la marca GIBCO® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), como se muestra en la Figura 4, para realizar la calibración de pH del sistema.



**Figura 4. Medio de cultivo DMEM.**

## 3.2 Antecedentes técnicos

### 3.2.1 Biorreactores: descripción y estado del arte

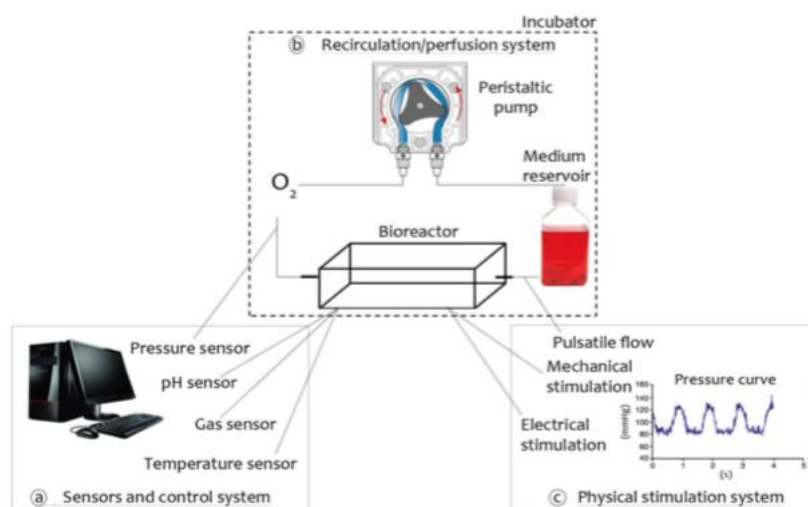
Se conoce como biorreactor al equipo o sistema capaz de mantener una o varias propiedades fisico-químicas (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) bajo control dentro de los rangos fisiológicos de manera que se reproduzcan las condiciones ambientales necesarias para la supervivencia o cultivo de un tejido o célula. En general, los biorreactores están diseñados para cumplir una o varias de las siguientes funciones: 1) asegurar la uniformidad en la distribución celular, 2) mantener las concentraciones de gases y nutrientes deseadas, 3) exponer al tejido a diversos estímulos físicos y/o 4) suministrar información acerca de la formación del tejido (Barron et al, 2003). Además, se trata de sistemas cerrados, estandarizados y casi automáticos, características que aseguran una mayor reproducibilidad, trazabilidad, escalabilidad y menor riesgo de contaminación que los procesos tradicionales manuales (Ratcliffe y Niklason, 2002).

El uso de biorreactores permite llevar a cabo una gran variedad de procesos biológicos: 1) expansión celular, 2) siembra de células en scaffolds, 3) diferenciación celular y maduración de tejido, 4) efectos causados por determinados fármacos en células y tejidos e 5) investigación de patologías. Además, estos también resultan útiles para estudiar las funciones de las células y el desarrollo del tejido bajo determinadas condiciones ambientales (Freed et al, 2006).

El diseño y desarrollo de un biorreactor es una tarea compleja que requiere de conocimientos tanto de biología como de ingeniería. En función de los requisitos estructurales y funcionales de las células que se desean crecer, las especificaciones de diseño del biorreactor son unas u otras, haciendo que existan diferentes tipos de biorreactores. Sin embargo, todo biorreactor debería estar equipado con sensores y sistemas de control que monitoricen de forma automática y en tiempo real los parámetros del cultivo (temperatura, pH, concentraciones de gases, presión, eliminación de residuos, etc.), sistemas de perfusión que permitan el intercambio de medio de cultivo y una adecuada distribución de

ANTECEDENTES

los nutrientes a todas las células, y sistemas de estimulación física que reproduzcan las condiciones fisiológicas del entorno y favorezcan la maduración del tejido (Martin et al, 2009) (véase Figura 5).



**Figura 5. Esquema de los diferentes sistemas que conforman un biorreactor. Se muestra a la izquierda los diferentes sensores y sistemas de control, a la derecha los sistemas de estimulación física y en el centro el sistema de perfusión (Bilodeau y Mantovani, 2006).**

Centrándonos en el diseño de biorreactores para la producción de tejido cardíaco, la presencia de sistemas de estimulación física (mecánica y eléctrica) es fundamental para promover la proliferación, diferenciación y síntesis de proteínas, así como para promover la maduración estructural y funcional del tejido en términos de morfología, fuerza mecánica y función eléctrica (Tandon et al, 2010; Mertsching y Hansmann, 2009; Bursac et al, 2007).

Sin embargo, el adecuado entrenamiento físico del tejido y las características de las células vienen condicionados por los parámetros bioquímicos del medio. Según Masters y Stacey (2007), en un cultivo celular los nutrientes y factores de crecimiento se van agotando con el tiempo y por el contrario, la concentración de productos metabólicos aumenta. Estos últimos pueden ser muy dañinos para las células, por lo que para asegurar el adecuado crecimiento y proliferación de las mismas es importante disponer de sistemas que cambien el medio de cultivo cada 1-2 días o en algunos casos, dos veces por semana es suficiente. Además, cuando el cultivo es utilizado con fines experimentales, es recomendable cambiar el medio 24 h antes.

Además, la velocidad a la que se administra la cantidad de nutrientes y oxígeno necesarios (perfusión) debe ser la misma que la velocidad a la que las células lo consumen. Si es más lenta, la concentración local de oxígeno disminuye a niveles no aceptables, afectando a la viabilidad celular y la actividad enzimática y pudiendo ocasionar la apoptosis de las células (Catapano, 1996). También, la falta de perfusión limita en gran medida el grosor del tejido creado (Kofidis et al, 2003). Por el contrario, una mayor velocidad de perfusión y presión parcial de  $O_2$  están relacionadas con un mayor metabolismo aeróbico y un mayor contenido de proteínas y ADN (Carrier et al, 2002).

Por otra parte, para asegurar la homeostasis, los fluidos intracelulares y extracelulares deben contener una cantidad equilibrada de ácidos y bases, manteniendo el pH de la sangre entre 7.2 y 7.4.

## ANTECEDENTES

El control de este parámetro es muy importante ya que la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> disminuye al disminuir el pH. Por lo que niveles bajos de pH harán que la cantidad de O<sub>2</sub> disponible para las células sea menor.

En cuanto a los requisitos de temperatura, la temperatura del cuerpo se encuentra normalmente alrededor de los 37°C. Por encima de los 41°C o por debajo de los 35°C puede haber riesgo de muerte celular. Es por esto que la mayoría de biorreactores trabajan total o parcialmente dentro de un incubador o bien introducen a través de su sistema de perfusión un componente que intercambie calor. También, es necesario mantener un ambiente humidificado para evitar la pérdida de medio por evaporación en los casos de sistemas de cultivo no sellados (siembra en placas Petri por ejemplo).

Finalmente, la Tabla 1 recoge algunos de los tipos de biorreactores para Ingeniería Tisular Cardíaca que se han diseñado en investigación durante los últimos años, tanto para el control de parámetros físicos como químicos.

**Tabla 1. Tabla resumen de los biorreactores desarrollados en la última década.**

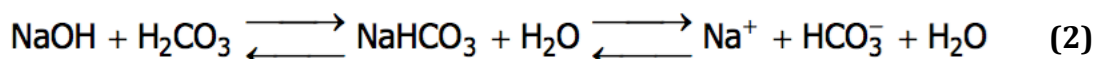
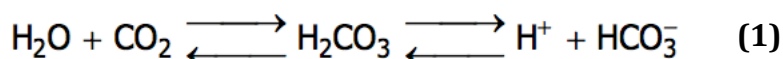
<i>Autores</i>	<i>Tipo de células</i>	<i>Scaffold</i>	<i>Dispositivo</i>	<i>Parámetros monitorizados</i>
<i>Fink et al. 2000</i>	Células embrionarias de pollito	Mezcla de células, colágeno I y Matrigel	Sistema de estiramiento	Actividad contráctil
<i>Papadaki et al. 2001</i>	Células de rata neonatal	Malla de PGA	Biorreactor giratorio con placa Petri montada encima	Propiedades electro-fisiológicas
<i>Carrier et al. 2002</i>	Células de rata neonatal	Malla de PGA	Biorreactor giratorio con placa Petri montada encima	pH, pO <sub>2</sub> , pCO <sub>2</sub>
<i>Radisic et al. 2004</i>	Células de rata neonatal	Espojas de colágeno	Biorreactor de estimulación eléctrica	Actividad eléctrica y contráctil
<i>Birla et al. 2007</i>	Células de rata neonatal	Gel de fibrina con trombina	Biorreactor de estimulación mecánica	Actividad contráctil
<i>Barash et al. 2010</i>	Células de rata neonatal	Alginato poroso	Biorreactor de estimulación eléctrica y perfusión	pH, pO <sub>2</sub> , pCO <sub>2</sub>
<i>Boudou et al. 2012</i>	Células de rata neonatal	Matrices 3D de colágeno y fibrina	Cantilever MEMS	Actividad contráctil
<i>Kensah et al. 2013</i>	Células madre embrionarias de humano	Mezcla de células, colágeno I y Matrigel	Biorreactor de estimulación mecánica	Actividad contráctil

Cabe destacar que en el mercado existen multitud de biorreactores utilizados para la generación de reacciones químicas o para el cultivo de material biológico bajo condiciones específicas (i.e. Harvard Apparatus, Lambda, Synthecon, General Electric). Sin embargo, en la mayoría de casos se trata de equipos con un alto coste económico (por encima de los 150.000 €) con una mínima versatilidad, diseñados específicamente para cumplir los requisitos de una preparación en concreto y de difícil adaptación a otros tejidos o entornos.

### 3.2.1.1 Incubadores

En la actualidad, los incubadores forman parte del equipamiento esencial que debe estar presente en todo laboratorio de investigación biomédica donde se trabaje con cultivos celulares (Vukasinovic et al, 2009). En general, el incubador básico es un sistema cuyo objetivo principal es regular y mantener constante la temperatura de un cultivo celular (normalmente a 37°C). Pero también existen otros incubadores (i.e. Thermo Scientific, Binder, NuAire) basados en sistemas más complejos que además de regular la temperatura, permiten controlar la humedad y la cantidad de CO<sub>2</sub> presente en el ambiente del incubador (incluso algunos pueden controlar el nivel de O<sub>2</sub>), pues es necesario mantener dentro de un rango adecuado estos tres parámetros para conseguir un entorno lo más fisiológico posible y para preservar la viabilidad de las células.

Es muy importante el control de este último parámetro en aquellos medios de cultivo que empleen como solución tampón bicarbonato sódico, ya que el pH del medio depende de la cantidad de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) disuelto en el medio producido por el metabolismo de las células y la cantidad de iones bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) proporcionados por la solución tampón de bicarbonato sódico. Como se puede apreciar en la reacción 1, un aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> provoca una disminución del pH acidificando el medio, mientras que un aumento de la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> provoca un aumento del pH alcalinizando el medio según muestra la reacción 2.



Así, para conseguir un pH constante dentro de un rango fisiológico debe existir un balance equilibrado entre la concentración de CO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> del medio, y para ello es necesaria una aportación de CO<sub>2</sub> exógeno por parte del incubador, pues cambios en la concentración del CO<sub>2</sub> atmosférico (en aquellos casos en los que el recipiente del cultivo no esté sellado) pueden regular el pH del medio. La Tabla 2 muestra los niveles de CO<sub>2</sub> exógeno que se recomienda emplear en función de la cantidad de bicarbonato presente en el medio (Butler, 2004).

**Tabla 2. Niveles de CO<sub>2</sub> recomendados para medios con tampón bicarbonato sódico.**

Bicarbonato en el medio (mM)	Nivel de CO <sub>2</sub> en fase gaseosa	Ejemplo de medio de cultivo
26	5%	RPMI-1640
44	10%	DMEM

### 3.2.2 Técnicas de medición de pH

La medida del pH es una de las herramientas más comúnmente empleadas en un laboratorio que trabaja con muestras bioquímicas debido a que la mayoría de procesos químicos y biológicos (i.e. el medio extracelular debe tener un pH específico para que las células puedan vivir) son dependientes del pH. Por tanto, es muy importante mantener bajo control dicha magnitud. Las técnicas tradicionalmente utilizadas para la medida del pH se clasifican en cuatro categorías: indicadores de pH, tiras de pH, electrodos de metal y electrodo de vidrio.

Las dos primeras se basan en el cambio de color que experimenta la solución (o bien la tira de papel impregnada con indicador) como consecuencia de un cambio en la conformación del indicador de pH (i.e. rojo fenol) cuando entra en contacto con H<sup>+</sup>. Así, el pH se determina por comparación visual del color obtenido con la paleta de colores de ese indicador (véase Figura 6A), cada uno de los cuales tiene asociado un pH. Estos métodos son sencillos pero muy poco precisos. En cuanto a los electrodos de metal (electrodo de hidrógeno y electrodo de antimonio), el pH se determina usando técnicas electroquímicas calculando el potencial establecido entre un electrodo de medida y otro de referencia. Sin embargo éstos no se suelen emplear debido por un lado a los inconvenientes que supone manipular el H<sub>2</sub> y por otro lado, en el caso del electrodo de antimonio, a su baja capacidad de reproducibilidad, limitando sus aplicaciones a casos en los que la solución contiene F<sup>-</sup> y no se requiere de una gran precisión en la medida (Huang y Guo, 2000). Debido a los problemas relacionados con estos electrodos, el método de medida estándar que más se utiliza es el electrodo de vidrio (véase Figura 6B), basado también en una medida potenciométrica del pH. Desafortunadamente, este electrodo presenta algunas desventajas que en ocasiones limitan su campo de aplicación. Entre ellas destaca el hecho de que es inestable para soluciones con pH extremos (muy ácido o muy alcalino) y a temperaturas superiores a 100°C, presenta un tiempo de respuesta lento, es muy difícil su miniaturización, existe riesgo de rotura de la sonda de vidrio y presentan una vida útil corta si el mantenimiento no es el adecuado.

Para superar las limitaciones que presentan las técnicas convencionales, actualmente se están investigando y desarrollando una gran variedad de tecnologías alternativas para la medida del pH. En primer lugar, se ha reportado el uso de sensores basados en métodos ópticos, los cuales emplean fibra óptica para detectar la absorbancia que presenta un determinado indicador de pH a una determinada longitud de onda (Cemal et al, 2004). Estos permiten obtener una respuesta más rápida y precisa que los electrodos de pH, así como trabajar a altas temperaturas y en ambientes turbios sin dañarse. Otra tecnología que está en estudio es el uso de sensores magnetoelásticos, cuya medida de pH está relacionada con los cambios que se producen en su frecuencia de resonancia al variar la masa de hidrogel depositada sobre el mismo (Ruan et al, 2003). Por otra parte, se ha innovado en las técnicas potenciométricas llevando a cabo modificaciones en los electrodos empleados hasta el momento. De



ANTECEDENTES

esta manera, han surgido los llamados electrodos basados en óxidos de metal (i.e.  $\text{IrO}_x$ ) (Yao et al, 2001), los cuales presentan buena estabilidad en un rango amplio de pH y en ambientes agresivos sometidos a altas temperaturas y presiones, así como una respuesta rápida. También, se ha optado por utilizar electrodos hechos de polímeros conductores especiales (Xu et al, 2001), los cuales se ha demostrado que presentan buena estabilidad y reproducibilidad. Por otro lado, también se han desarrollado microsensores basados en cantiléver (véase Figura 6C), los cuales relacionan la deflexión que provoca la deposición de un determinado polímero sobre ellos con el nivel de pH (Bashir et al, 2002). La gran ventaja que presentan es su extremadamente pequeño tamaño. Por último, la innovación más reciente es el desarrollo de sensores ISFET (véase Figura 6D) fabricados con una gran variedad de materiales (Li et al, 2004), y la última tendencia es la producción de nanosensores ISFET que incorporan nanocables de silicio en su estructura como canal de conducción (Cui et al, 2001). Estos permiten disponer de sensores extremadamente sensibles, de tamaño muy pequeño y capaces de detectar multitud de sustancias sin marcadores y en tiempo real. Sin embargo, éstos presentan un mayor coste económico, una menor estabilidad y precisión y tienen un tiempo de vida útil más corto.

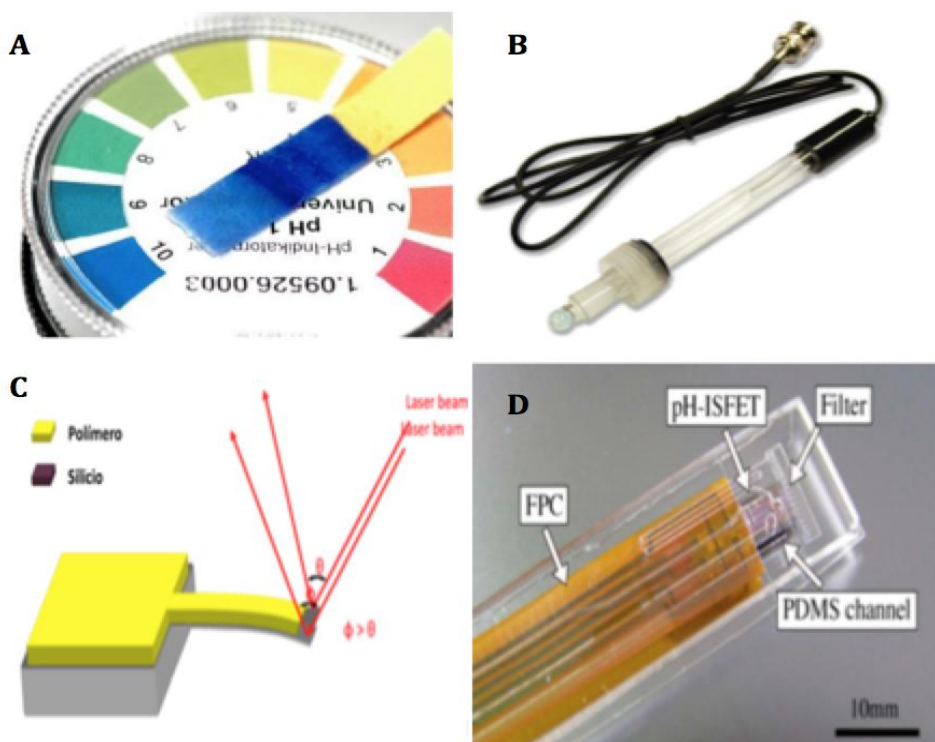


Figura 6. Algunas técnicas de medida del pH: a) tiras de pH con indicador, b) electrodo de vidrio, c) microcantiléver, d) ISFET

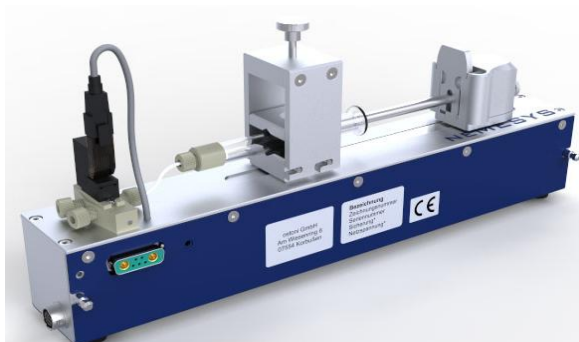
### 3.2.3 Bombas de inyección: aplicaciones y estado del arte

Las bombas de inyección son sistemas que se pueden emplear en multitud de aplicaciones, ya que son útiles cuando se desea administrar continuamente pequeños volúmenes de una determinada sustancia durante un largo período de tiempo a baja velocidad.

## ANTECEDENTES

Su uso principal se encuentra en el ámbito médico, donde las bombas de inyección son una parte fundamental en el cuidado paliativo, ya que son las encargadas de administrar de forma continua y subcutánea los medicamentos necesarios para mitigar diversos síntomas en aquellos pacientes en los que no se pueden administrar oralmente. Además, su robusto software reduce el número de errores de administración asociados con un cálculo incorrecto de la dosis (Larsen et al, 2005) y su automaticidad ahorra tiempo de trabajo al personal de enfermería (Mukoreka et al, 2015). Entre las bombas de inyección comercializadas y destinadas al cuidado paliativo actualmente, las más empleadas son las Smiths Medical MS16, MS16A y MS26 (Irving et al, 2007). Otros sistemas en uso son el Eden Medical's MP Daily y el Cardinal Health AD o el Niki/McKinley T34 (Costello et al, 2008). También existen otras bombas de inyección las cuales todavía se encuentran en fase de investigación, como es el caso de Infonde (Italfarmaco S.p.A., Milan, Italy) para la administración del fármaco Iloprost como tratamiento contra el escleroderma (Laria et al, 2015).

Entre otra de sus aplicaciones destaca su uso en sistemas de microfluídica, en los cuales se requiere de la generación de un flujo muy pequeño de líquido (del orden de nanolitros) con un mínimo de pulsación. Para ello se emplean bombas de inyección que presenten una gran precisión y máxima estabilidad, como es el caso de la bomba neMESYS (Cetoni GmbH, Korbussen, Alemania) que muestra la Figura 7, características que justifican su elevado coste económico. También se utiliza en química para la incorporación progresiva de una cantidad exacta de volumen (i.e. reactivos) en una solución (Tawfik et al, 2012).



**Figura 7. Bomba de inyección neMESYS (Cetoni GmbH).**

Por último, las bombas de inyección también se utilizan en ocasiones en los laboratorios de investigación clínica como dispensadores de medio. Es en esta aplicación en la que se ha basado la bomba de inyección diseñada en el presente proyecto, la cual forma parte del sistema de recambio de medio de cultivo.

### 3.2.4 Prototipado de piezas: Impresión 3D

En los últimos años, los avances en informática con el desarrollo de computadores más potentes y nuevos software de diseño así como la aparición de nuevos materiales, han impulsado enormemente la tecnología de impresión 3D (Lipson y Kurman, 2013). Además, también ha influido el hecho de que los componentes requeridos en la fabricación de impresoras 3D han podido miniaturizarse y los costes de las mismas se han reducido considerablemente, haciendo que prácticamente cualquier persona pueda disponer de una impresora 3D (Kelly, 2013). Esta tecnología



## ANTECEDENTES

permite a los ingenieros desarrollar y evaluar sus productos de manera económica antes de invertir grandes cantidades de dinero directamente en su fabricación, también se está utilizando recientemente en el campo médico para la impresión de injertos 3D y además permite a los arquitectos reproducir sus maquetas de manera más sencilla.

La impresión 3D se basa en la utilización de técnicas de fabricación aditiva para crear objetos tridimensionales a partir de archivos digitales que definen la geometría de dicho objeto. Este archivo digital se consigue diseñando el objeto mediante programas de modelado 3D (i.e. FreeCAD, modelador paramétrico que se ha utilizado en el presente proyecto para la creación de las piezas) si lo que se quiere es imprimir un objeto completamente nuevo o bien mediante escáneres 3D si lo que se quiere es imprimir una copia de un objeto ya existente. Así, el software divide el modelo 3D virtual en múltiples capas 2D. A continuación, la impresora deposita el material correspondiente a cada capa y superpone todas las capas sucesivamente hasta que consigue reproducir el modelo 3D en su totalidad y crear el objeto.

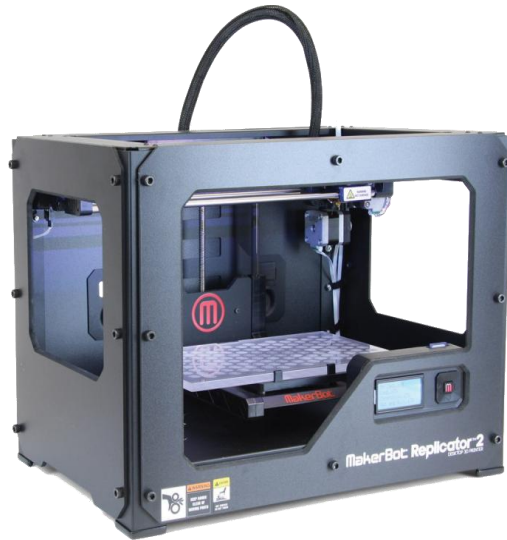
Sin embargo, aunque todas las impresoras utilizan procesos aditivos de fabricación, no todas utilizan la misma tecnología y depositan de la misma manera las capas de material. Algunas usan el fundido o ablandamiento del material para producir las capas, mientras que otras depositan materiales líquidos que son curados con diferentes tecnologías. El tipo de impresión más utilizado hasta la actualidad es la extrusión de plástico fundido (FDM).

Este método utiliza plástico o metal en forma de filamento enrollado como material de impresión. Los dos tipos de plástico más empleados son el ácido poliláctico (PLA) y el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS). El filamento empieza a desenrollarse conforme va avanzando hacia la punta del inyector para suministrar el material necesario. La punta del inyector se calienta y va fundiendo el material a medida que éste pasa a través de ella para depositarse sobre la plataforma o bien para fusionarse con la capa subyacente previamente depositada. El material es extruido en forma líquida, pero inmediatamente se enfría pasando a un estado sólido y consistente. Además, el inyector se mueve en ambas direcciones (eje X y eje Y) para ir generando la capa (primero el contorno y a continuación el interior) así como en el eje Z para depositar la siguiente capa con la finalidad de reproducir las especificaciones de diseño definidas por el archivo digital de CAD. Este movimiento se consigue gracias al mecanismo de control numérico que incorpora la impresora y el cual está controlado directamente por el software de diseño (Mireles et al, 2012; Pilipovic et al, 2015).

Entre las ventajas que hacen de esta tecnología la más empleada en impresión 3D destacan su alta velocidad de producción (desde varios minutos a pocas horas), su gran precisión temporal, seguridad (empleo de materiales no tóxicos), bajo coste de producción y mantenimiento, su baja temperatura de operación, su facilidad de uso, su capacidad de producir varias piezas duraderas y fuertes simultáneamente, así como su capacidad de poder trabajar con una gran variedad de materiales y de producir casi cualquier objeto. Sin embargo también cuenta con algunas desventajas como son el requerimiento en ocasiones de estructuras de soporte, la deformación de la pieza debido a las fluctuaciones de temperatura que ocurren durante la producción, una resistencia del objeto menor en la dirección perpendicular a la dirección en la que se han depositado las capas, una baja precisión dimensional y la imposibilidad de producir bordes afilados y tamaños de pieza muy grandes.

## ANTECEDENTES

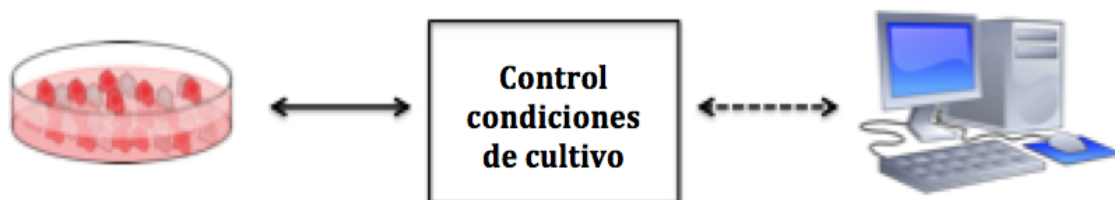
Cabe destacar que es esta tecnología en la que se basa la impresora 3D Replicator 2 (MakerBot, Brooklyn, NY, USA), la cual se empleó para la fabricación de todas las piezas desarrolladas en el presente proyecto (véase Figura 8).



**Figura 8. Impresora 3D Replicator 2 (Makerbot).**

## 4. METODOLOGÍA

Como se puede observar en la Figura 9, el biorreactor desarrollado se basa en un sistema que tomando como indicador el pH del medio de cultivo permite, a partir de un intercambio del medio, mantener en todo momento unas condiciones de cultivo adecuadas. Este sistema de control se comunica con el ordenador a través de una red de comunicaciones inalámbrica basada en el protocolo Zigbee (puesto que parte del sistema trabaja dentro del incubador y no es viable una comunicación con el PC a través de un cable USB). Así mismo, el usuario tiene la posibilidad de configurar el modo de control deseado (manual o automático) del sistema y otros parámetros de control necesarios de manera sencilla e intuitiva gracias a que éste cuenta con una interfaz gráfica de usuario, la cual se programó en el entorno GUIDE de Matlab.



**Figura 9. Diagrama general de funcionamiento del sistema. El PC/usuario mediante una comunicación inalámbrica con el sistema, monitoriza continuamente el medio de cultivo y actúa sobre el mismo para mantener bajo control las condiciones de cultivo (imagen propia).**

Para llevar a cabo la función de mantener bajo control las condiciones óptimas del medio, como ilustra la Figura 10, el equipo desarrollado requiere la participación conjunta y coordinada de dos módulos. Por una parte, un sistema de intercambio de medio formado por dos bombas actuadoras, una bomba peristáltica que retira el medio de cultivo rico en productos metabólicos de desecho y otra bomba de inyección que suministra al cultivo celular el nuevo medio rico en nutrientes. Por otra parte, un sensor óptico que monitoriza continuamente el nivel de pH con el fin de disponer de un indicador que asegure que el medio no reúne las condiciones de cultivo adecuadas y debe ser renovado.

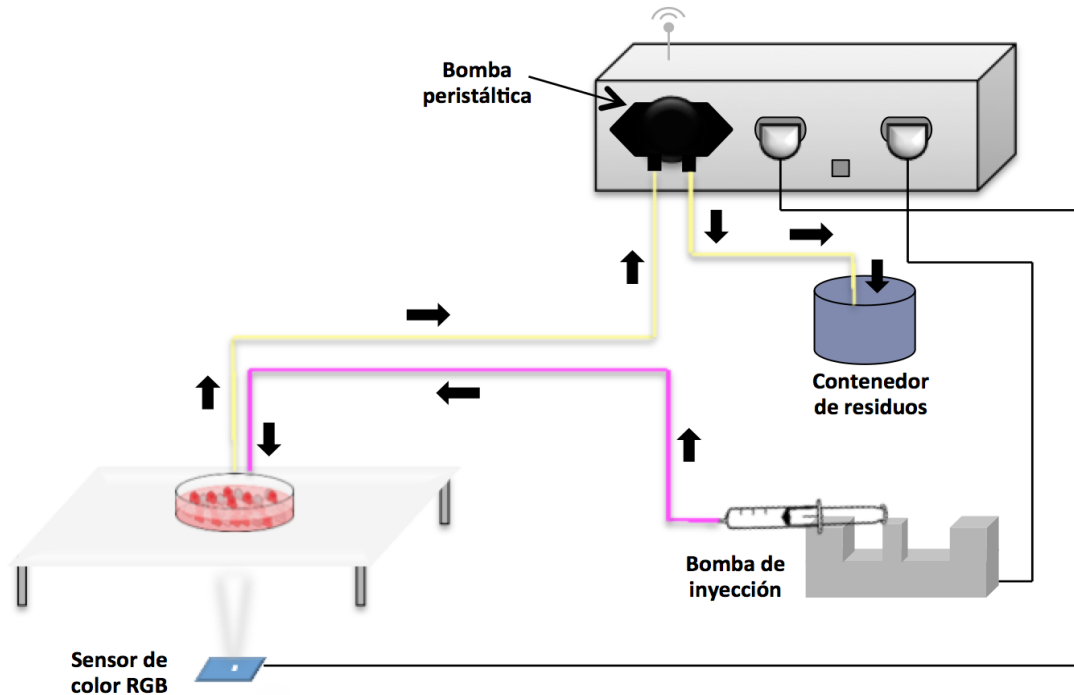


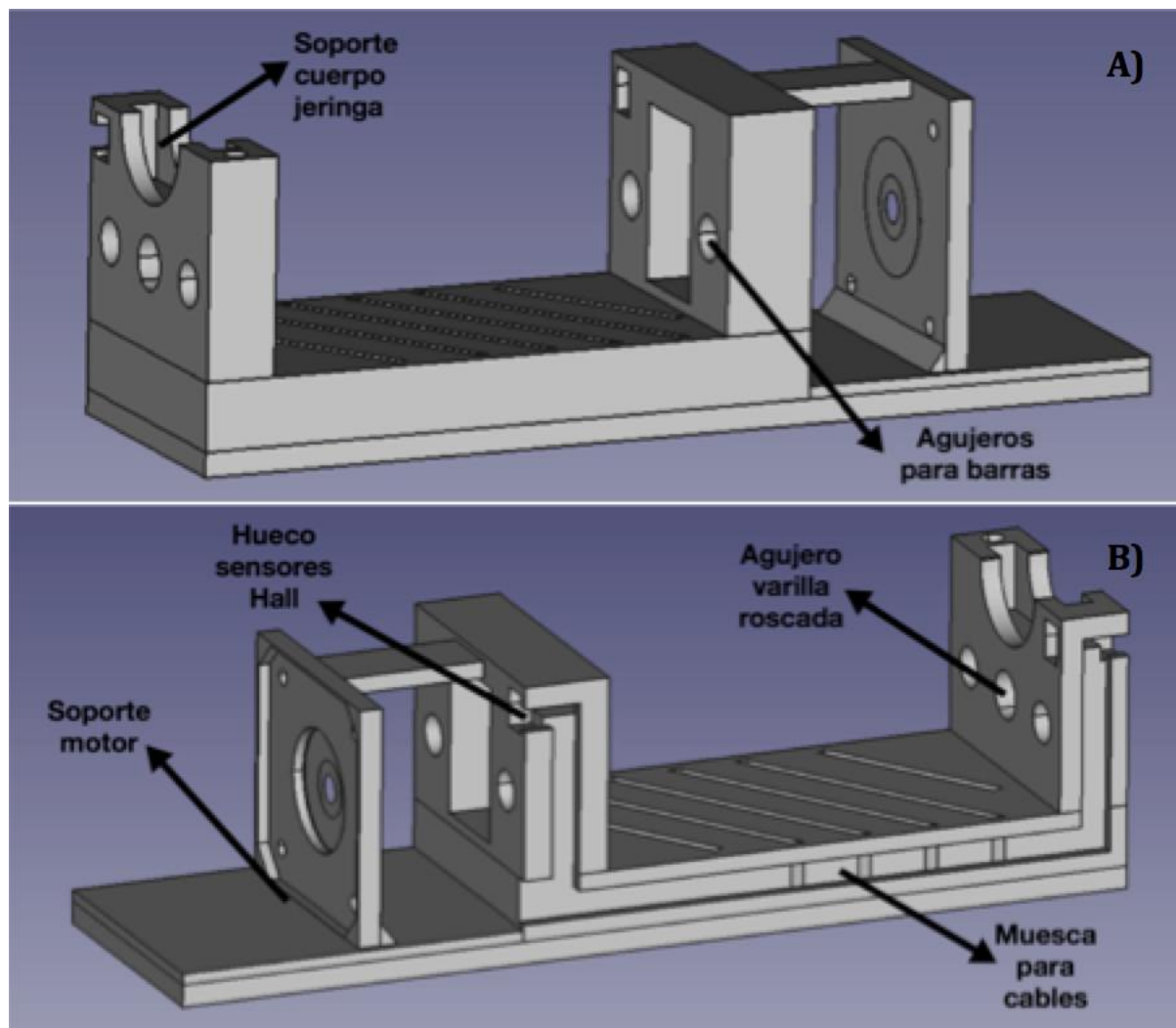
Figura 10. Ilustración de los distintos módulos que conforman el biorreactor. Se muestra una representación esquemática del módulo de intercambio de medio: bomba peristáltica y bomba de inyección, y el módulo de monitorización de pH (imagen propia).

## 4.1 Hardware

### 4.1.1 Diseño bomba de inyección

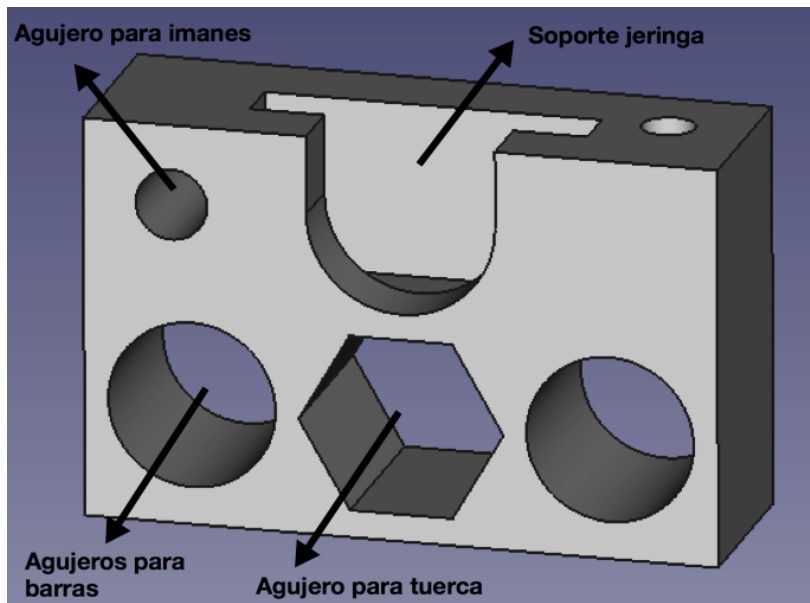
El modelado de las distintas piezas que conforman la bomba de inyección se realizó mediante diseño por ordenador con la ayuda del programa FreeCAD. En total, la bomba cuenta con cuatro piezas, y cada una de ellas se fabricó mediante impresión 3D a partir de termoplástico PLA. Además también se adquirió el resto de componentes mecánicos y electrónicos necesarios para el adecuado funcionamiento de la bomba.

En primer lugar se fabricó la pieza central de la bomba. Ésta está diseñada exclusivamente para dar soporte a todos los componentes, tanto electrónicos como mecánicos, que componen la bomba. Así, la pieza dispone de los agujeros necesarios a ambos extremos para encajar las dos barras metálicas y la varilla roscada, un soporte para el motor paso a paso, un soporte para apoyar el cuerpo de la jeringuilla, unas ranuras en ambos extremos para incluir los dos sensores de efecto Hall y una muesca alargada en el lateral para situar los cables (véase Figura 11A y Figura 11B).



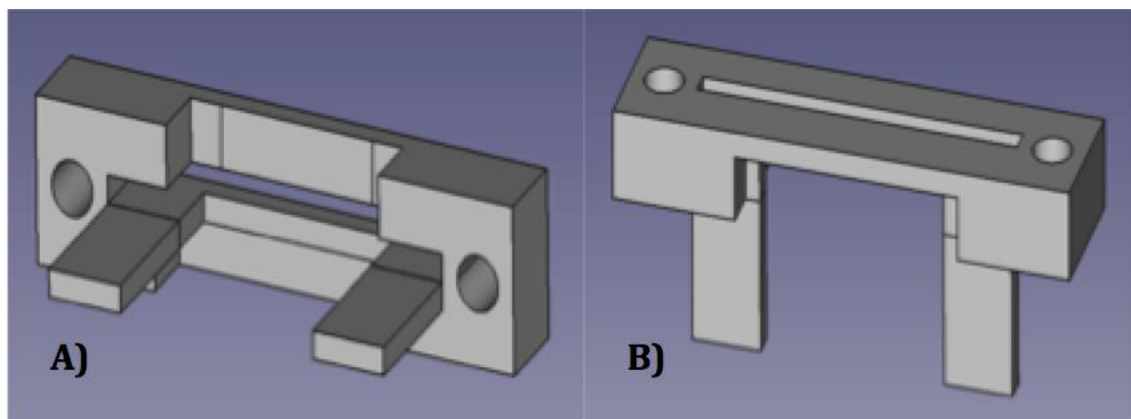
**Figura 11.** Modelo 3D de la pieza central de la bomba de inyección. Se muestra el perfil izquierdo (A) y perfil izquierdo (B) de la pieza.

Por otro lado se fabricó la pieza móvil de la bomba, la cual es la encargada de permitir el movimiento de la jeringuilla. Ésta se desplaza a lo largo de las barras y la varilla roscada empujando o retrayendo el émbolo de la jeringa. Como se observa en la Figura 12, la pieza cuenta con dos agujeros para introducir los rodamientos lineales a través de los cuales pasan las barras metálicas y un agujero con forma hexagonal donde va insertada la tuerca a través de la cual gira la varilla roscada movida por el motor, gracias a que se implementó un acoplamiento flexible entre la varilla roscada y el eje del motor. También dispone de un soporte para enganchar el émbolo de la jeringuilla y dos pequeños agujeros centrales para colocar los imanes de neodimio necesarios para el funcionamiento de los sensores de efecto Hall.



**Figura 12. Modelo 3D de la pieza móvil de la bomba de inyección. Se muestra la vista frontal de la pieza móvil.**

Para finalizar se fabricaron dos tapas, una que mantiene fijo el cuerpo de la jeringa en la pieza central (véase Figura 13A y 13B) y otra que mantiene fijo el émbolo de la jeringa a la pieza móvil (véase Figura 14A y 14B). Además, ambas van atornilladas a la pieza central para una mayor seguridad y precisión de inyección.



**Figura 13. Modelo 3D de la tapa de la bomba de inyección que ancla la jeringuilla a la pieza central de la bomba de inyección. Se muestra la vista plantar (A) y frontal (B) de la tapa.**

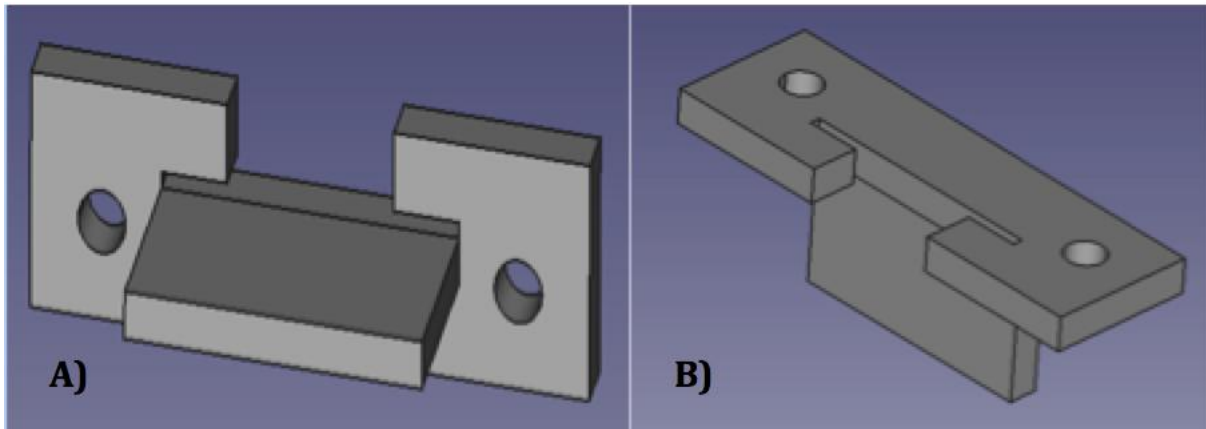


Figura 14. Modelo 3D de la tapa de la bomba de inyección que ancla la émbolo a la pieza móvil de la bomba de inyección. Se muestra la vista plantar (A) y frontal (B) de la.tapa.

Así, en la Figura 15 se puede observar el resultado final del modelo 3D de la bomba de inyección una vez ensambladas todas las piezas y en la Figura 15 una fotografía de la bomba de inyección real tras el montaje de las piezas y demás componentes electrónicos y mecánicos.

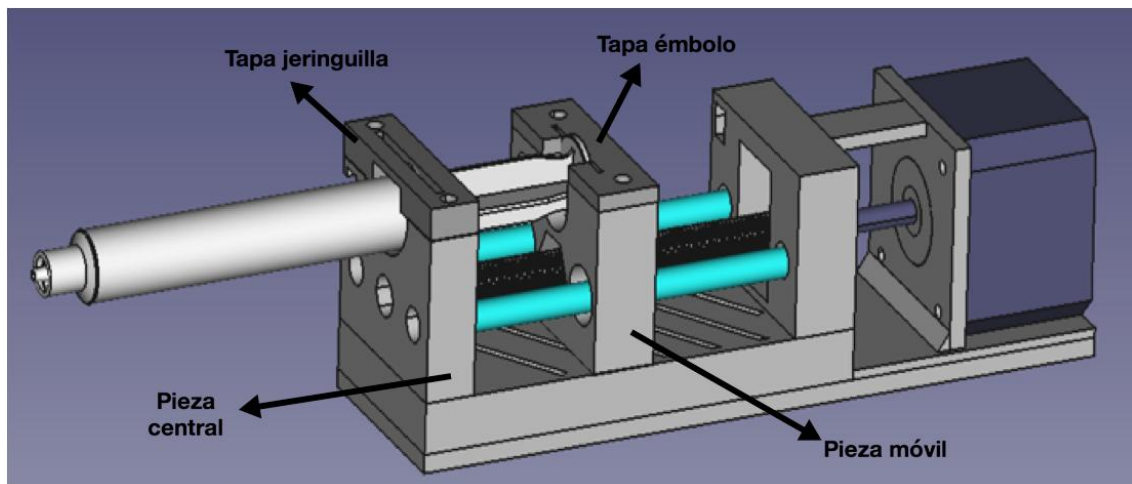
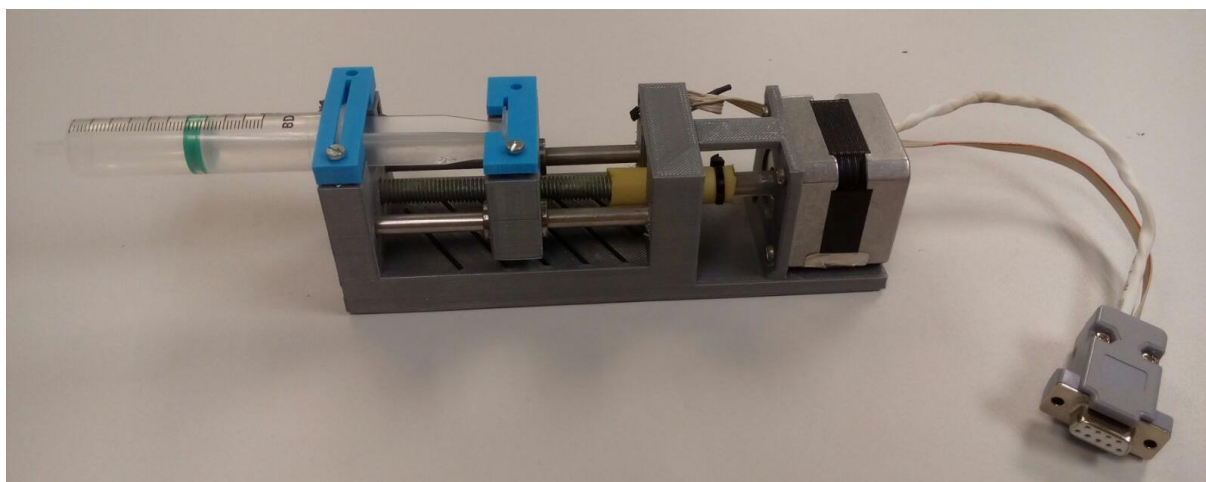


Figura 15. Resultado final del modelo 3D de la bomba de inyección.

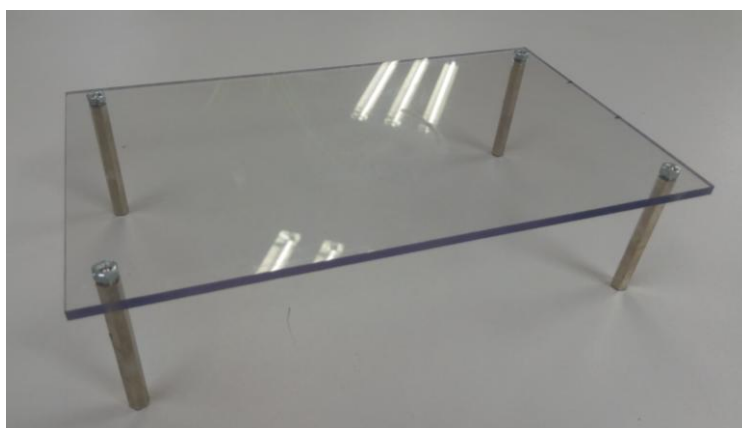


**Figura 16. Fotografía de la bomba de inyección.**

#### **4.1.2 Diseño soporte sensor RGB**

Dado que la función del sensor de color RGB es la de detectar el pH del medio de cultivo presente en la placa Petri a partir del color que exhibe el mismo, éste debe poder trabajar dentro del incubador y además requiere de algún soporte que lo mantenga cerca de la placa para poder iluminar adecuadamente y obtener la medida.

Por ello, en primer lugar se implementó un soporte que permite apoyar en él, a modo de mini-mesa, la placa Petri. Por una parte, este soporte debe ser de un material resistente a la temperatura del incubador y por otra parte, debe ser transparente para que la luz procedente del LED del sensor pueda atravesarlo y alcanzar la base de la placa Petri. Es por esto que para cumplir con las especificaciones requeridas, se utilizó una placa transparente de polimetacrilato a la que se le colocó un separador hexagonal en cada una de sus cuatro esquinas para obtener el soporte deseado (véase Figura 17).



**Figura 17. Fotografía del soporte para la placa Petri.**

En segundo lugar se desarrolló un soporte que permite sostener el sensor de color de manera levadiza dentro del incubador, mantenerlo cerca de la placa y a su vez fijo siempre en la misma



METODOLOGÍA

posición para asegurar que las medidas se realicen siempre en las mismas condiciones. Este soporte se diseñó, al igual que las piezas de la bomba de inyección, con la ayuda del modelador FreeCAD y posteriormente se fabricó mediante impresión 3D utilizando también un plástico resistente a la temperatura del incubador como es el PLA.

Como se muestra en la Figura 18 y la Figura 19, este soporte se basa en una especie de pinza. En su extremo inferior, presenta un hueco cuadrado para colocar el sensor de color y dentro del hueco un agujero por donde salen las conexiones del sensor. En su extremo superior, tiene una delimitación en forma circular para encajar la placa y que la luz del sensor incida siempre en el mismo sitio al realizar las medidas.

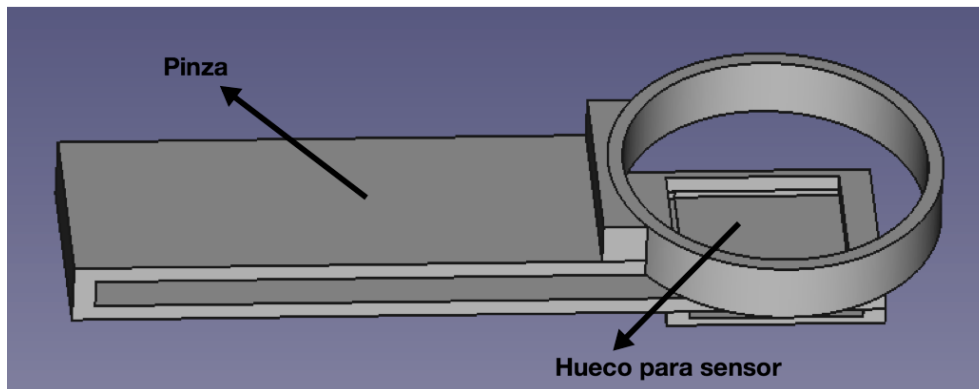


Figura 18. Diseño 3D del soporte para el sensor de color RGB.

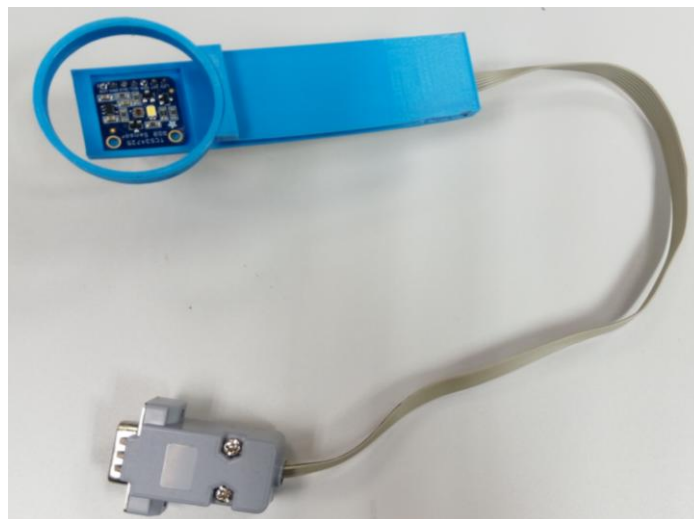


Figura 19. Fotografía del soporte para el sensor de color RGB.

De esta manera, la pinza se encaja en la lámina de polimetacrilato a través de uno de sus extremos como ilustra la Figura 20.

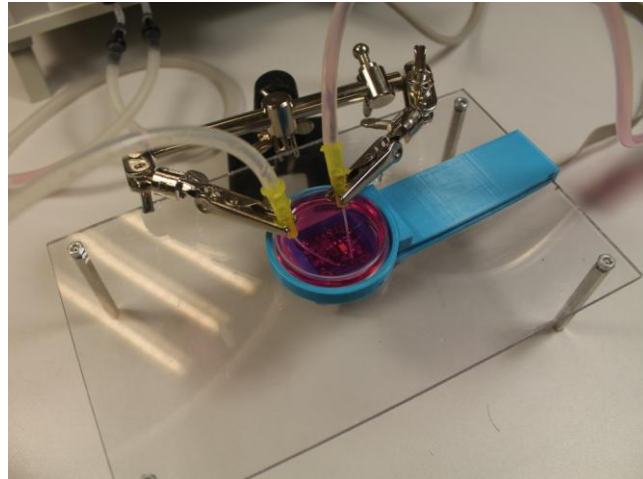


Figura 20. Fotografía del módulo de control del pH.

### 4.1.3 Diseño electrónico

Una vez se implementó la bomba de inyección y se colocó el sensor de color RGB en su correspondiente soporte, se realizó la soldadura y conexión de los distintos componentes electrónicos que conforman el sistema. Como muestra la Figura 21, la electrónica del sistema está formada por una combinación de elementos electrónicos que interactúan entre sí de forma coordinada con el fin de realizar el intercambio del medio de cultivo y con ello mantener las condiciones óptimas de cultivo, con un nivel de pH, nutrientes, etc. que aseguren la viabilidad celular.

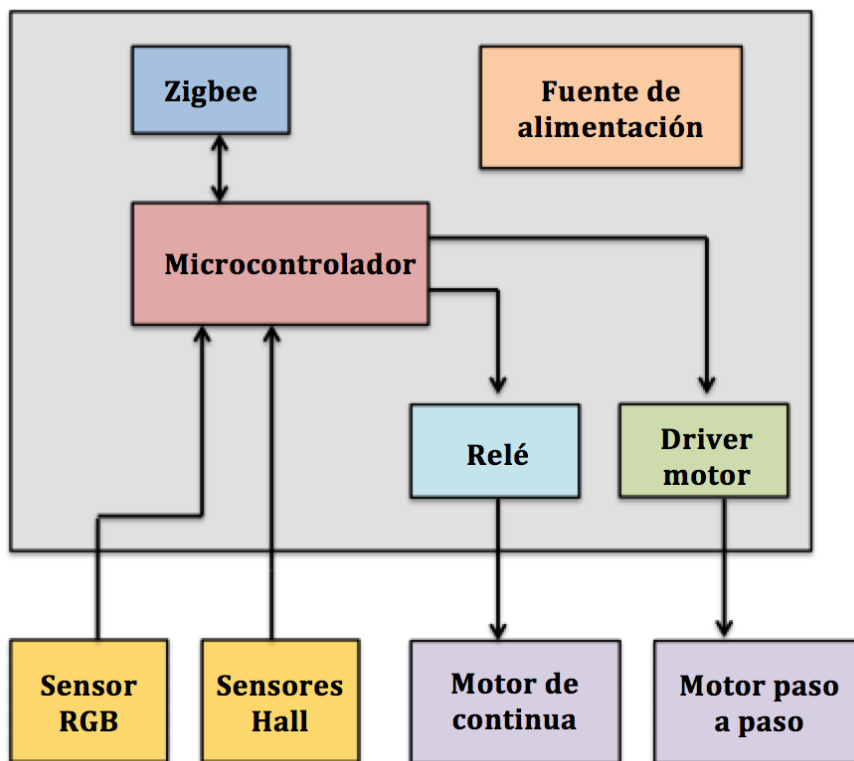


Figura 21. Diagrama de bloques del módulo electrónico del sistema. Se representan las diferentes entradas (sensores y Xbee) y salidas del microcontrolador (relé, driver motor y Xbee), (imagen propia).

## METODOLOGÍA

Por una parte, todo el sistema de control permanece alimentado por una fuente de alimentación que proporciona 12 V a partir de la red eléctrica de 220 V. Por ello, se incorporó un interruptor que permite abrir el circuito de conexión a la red cuando no se requiera su uso, así como un fusible de protección.

Por otra parte, el sistema cuenta con un microcontrolador. Éste es el encargado de recibir continuamente la lectura del sensor de color y en función de la misma, ordenar la activación de los actuadores: el motor DC que mueve la bomba peristáltica y el motor paso a paso que mueve la bomba de inyección. Además, el motor paso a paso se controla con un driver y el motor DC con un relé. También recibe la información procedente de los sensores de efecto Hall.

Por último, el sistema se comunica inalámbricamente con el ordenador gracias a la creación de una red entre dos Xbee, el XBee maestro conectado al puerto serie del PC y el XBee esclavo conectado al puerto serie del microcontrolador.

Todo el conjunto de componentes electrónicos se ensambló en una caja de plástico ABS especialmente diseñada para instrumentación de laboratorio (véase Figura 22) con el objetivo de asegurar una mayor movilidad e independencia del equipo, así como seguridad y robustez. Además se incorporó un conector especial para la alimentación de red y dos conectores DB9: uno macho-macho para conectar la bomba de inyección y otro hembra-hembra para conectar el sensor de color RGB, de manera que se eviten posibles confusiones de conexión.

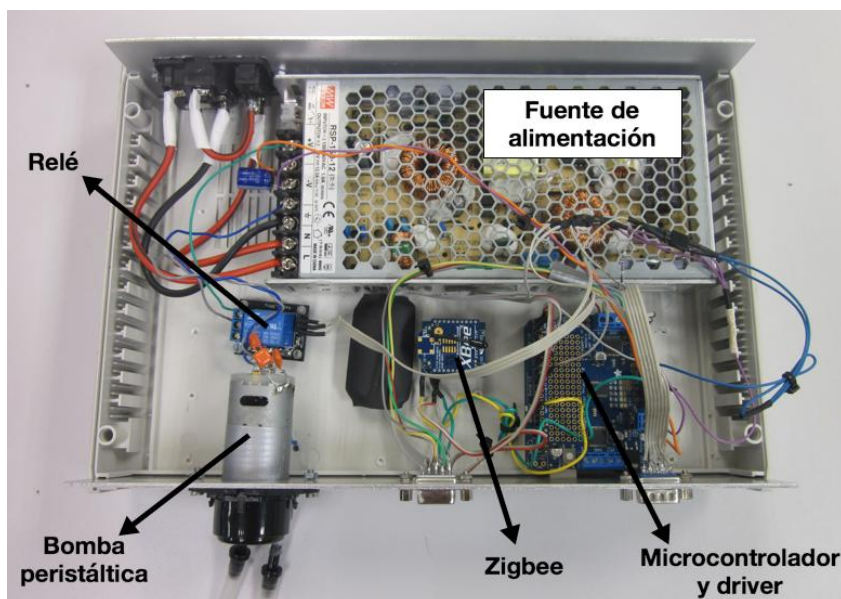


Figura 22. Fotografía del montaje de la circuitería electrónica en la caja de plástico ABS.

### 4.1.3.1 Microcontrolador

Como se ha comentado anteriormente, el sistema de control de pH cuenta con un microcontrolador que actúa como controlador y regulador de todo el procedimiento, es decir, que

METODOLOGÍA

recopila la información procedente de todos los sensores, da órdenes al driver y al relé cuando es necesario y se comunica inalámbricamente con el usuario.

Entre las diferentes opciones de microcontroladores que ofrece el mercado, se optó por utilizar un microcontrolador de la familia Arduino, y en concreto el microcontrolador Arduino Uno (véase Figura 23).

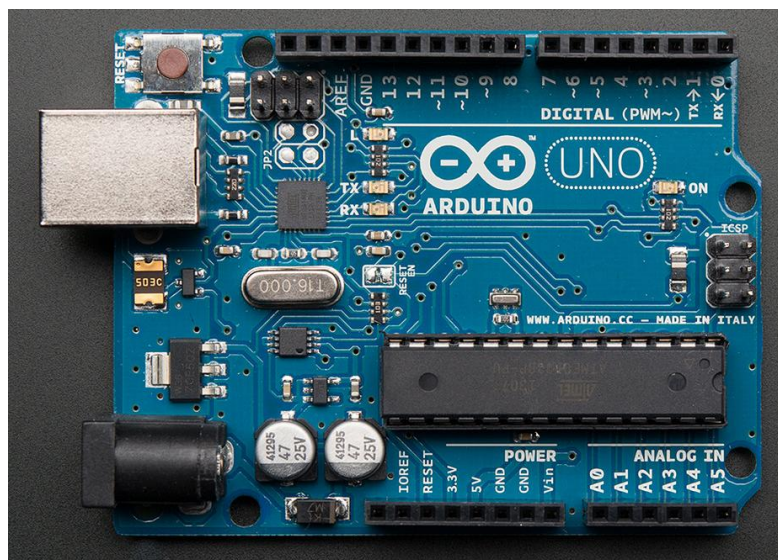


Figura 23. Arduino Uno.

La principal característica de Arduino Uno es que su unidad de procesamiento consiste en el microcontrolador ATmega328P. Además, Arduino Uno presenta otras especificaciones técnicas relevantes para el presente trabajo, las cuales aparecen resumidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones técnicas de la placa Arduino Uno.

Especificación	Valor
<b>Voltaje de operación</b>	5 V
<b>Voltaje de entrada recomendado</b>	7-12 V
<b>Voltaje de entrada límite</b>	6-20 V
<b>Pines digitales E/S</b>	14 (6 de ellos con salida PWM)
<b>Pines de entrada analógicos</b>	6
<b>Corriente suministrada a cada pin</b>	20 mA
<b>Corriente suministrada al pin 3.3 V</b>	50 mA
<b>Memoria Flash</b>	32 KB
<b>SRAM</b>	2 KB
<b>EEPROM</b>	1 KB
<b>Frecuencia de reloj</b>	16 MHz

## METODOLOGÍA

Arduino Uno puede alimentarse a través del USB (únicamente aporta 5V) o a través de alimentación externa (puede aportar entre 7-12V). Como alimentación externa se puede usar una batería conectada a los pines GND y Vin de la placa o bien un adaptador AC/DC conectado al jack de la placa. En el caso de utilizar alimentación externa, la placa dispone de un regulador que toma la tensión de entrada de entre 7-12V y genera una tensión de 5V para alimentar el microcontrolador. Además, la placa también dispone de un pin que proporciona 5V y sirve para alimentar al resto de elementos externos al Arduino Uno que necesiten ser alimentados a 5V.

Como parte del sistema de control de pH trabaja dentro del incubador, no es viable alimentar a Arduino a través del USB, por lo que se utilizó una fuente de alimentación externa conectada a los pines GND y Vin que alimenta continuamente a todo el sistema independientemente de si éste está conectado al cable de USB o no.

Por otra parte, Arduino Uno dispone de un total de 14 pines digitales que pueden actuar como entrada o como salida. Entre ellos, hay algunos que presentan funciones adicionales, siendo las más relevantes por haber hecho uso de ellas en el presente trabajo las siguientes:

- Pines 0 y 1. El pin 0 se utiliza para recibir (RX) y el pin 1 se utiliza para transmitir (TX) datos a través del puerto UART de comunicaciones serie.

De los 6 pines de entrada analógica, hay dos que poseen una función adicional, las cuales resultan esenciales en el presente trabajo:

- TWI (Two Wire Interface): pines A4 (SDA) y A5 (SCL). Permiten establecer una comunicación serie a través del bus I<sup>2</sup>C.

Por tanto, la razón por la que se utilizó Arduino Uno en el presente proyecto es porque sus especificaciones resultan suficientes para cubrir perfectamente y en su totalidad las necesidades exigidas por el mismo:

- Dispone de dos entradas analógicas (pin A4 o SDA y pin A5 o SCL) para la comunicación a través del bus I<sup>2</sup>C con el sensor de color RGB y el driver motor.
- Dispone de cuatro salidas digitales para el control de la intensidad del LED del sensor de color, los sensores de efecto Hall y el relé.
- Posee un puerto UART de comunicaciones serial para comunicarse con el PC a través de un XBee.
- El microcontrolador empleado dispone de capacidad de procesamiento suficiente para llevar a cabo las tareas.
- Permite incorporar Shields de forma sencilla, lo que resultó útil en el presente trabajo para incorporar la Shield que controla el motor paso a paso.

Además, Arduino Uno es capaz de cumplir todos estos requisitos pero de manera más económica que otros modelos de Arduino, como puede ser el Arduino Mega.



Por último, el microcontrolador recibe las siguientes órdenes por parte del usuario a través del PC:

- Selección del modo de funcionamiento (manual o automático).
- Activación de las bombas para la extracción y posterior inyección de medio de cultivo.
- Configuración de la cantidad de volumen a inyectar y sentido de funcionamiento de la bomba.
- Detención de las bombas.
- Reseteo de la bomba de inyección a su posición inicial.
- Medida del pH del medio.
- Calibración del sensor de pH.
- Selección del nivel de pH al cual se desea retirar el medio.

Así mismo, el microcontrolador envía diferentes tramas al PC que contienen la lectura de pH a partir de los niveles de RGB medidos por el sensor, además de información adicional sobre el estado del sistema (nivel de volumen restante, posición de la jeringa, etc.).

#### 4.1.3.2 Driver Stepper Motor

Para el control del motor paso a paso modelo Nema 17, el cual es el encargado de mover la jeringa de la bomba de inyección, se utilizó el MotorShield v2 de Adafruit. El lugar de conexión del motor aparece marcado en rojo en la Figura 24.

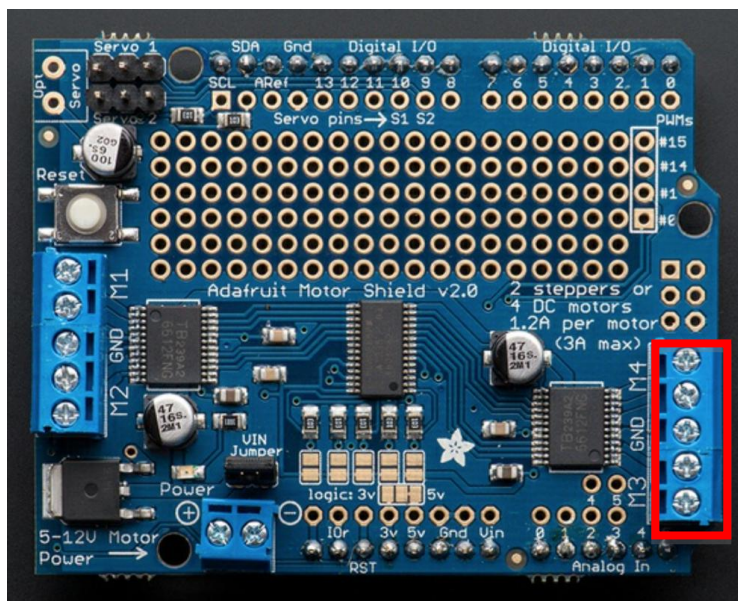


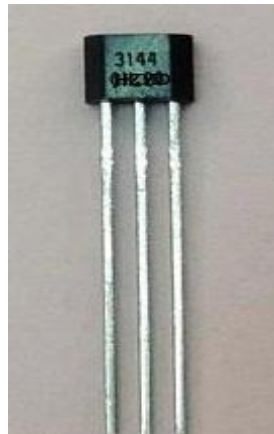
Figura 24. MotorShield v2 (Adafruit).

Esta Shield permite controlar en total 4 motores DC ó 2 motores paso a paso, o bien un motor paso a paso y hasta 2 motores DC. Además, presenta la ventaja con respecto a la versión anterior de que en lugar de un chip L293D, emplea un MOSFET TB6612 con una capacidad de 1.2 A de corriente por canal que permite mover motores de entre 4.5 V a 13.5 V de continua. También incluye un chip generador de PWM propio, característica que permite no hacer uso de los pines PWM de Arduino. Este chip maneja todos los motores y controla su velocidad a través del bus I<sup>2</sup>C. Por tanto, todo el conjunto se controla únicamente a través de los pines 4 (SDA) y 5 (SCL) de Arduino.

#### 4.1.3.3 Sensores de efecto Hall

El mecanismo de la bomba de inyección empuja el émbolo de la jeringa en un sentido y en otro gracias al movimiento de la pieza móvil a través de las barras metálicas y el giro de la varilla roscada proporcionado por el motor paso a paso. Sin embargo, este recorrido debe detenerse al llegar a cada uno de los extremos de la pieza central, para evitar que la varilla continúe girando sin poder avanzar y el motor se dañe.

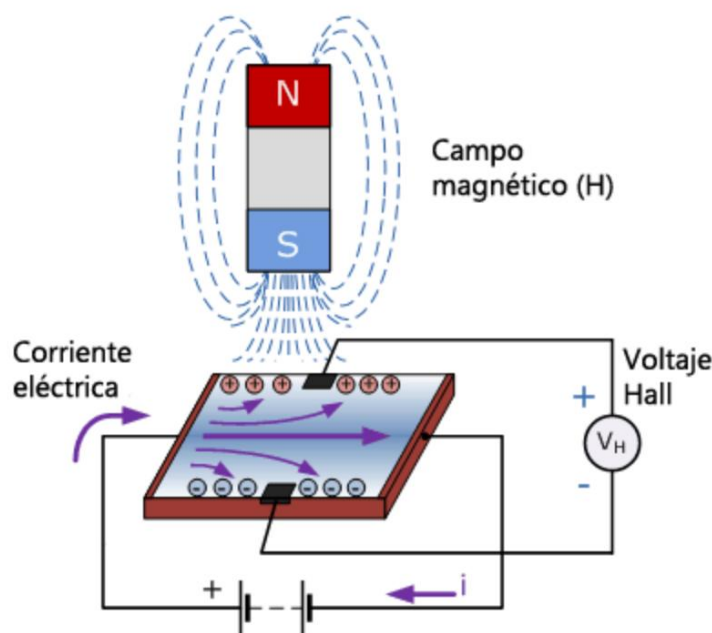
Es por este motivo que se colocó un sensor magnético, en concreto un sensor de efecto Hall A3144 como el de la Figura 25, en cada uno de los extremos de la pieza central para detectar la posición de la pieza móvil en todo momento y poder detener el motor cuando ésta alcance cualquiera de los dos extremos. Además, se colocaron varios imanes de neodimio en la pieza móvil para generar el deseado efecto Hall.



**Figura 25. Sensor de efecto Hall A3144.**

Los sensores de efecto Hall están formados por una pieza rectangular de material semiconductor (tipo p) como por ejemplo arsénico de galio (GaAs), antimonio de indio (InSb) o arsénico de indio (InAs), a través de la cual circula corriente. Así, cuando el sensor entra en contacto con un campo magnético, el flujo magnético ejerce una fuerza en el material (fuerza de Lorentz) que hace que los portadores de carga se desplacen a ambos lados de la placa de semiconductor (véase Figura 26). Este movimiento de cargas genera una diferencia de potencial (potencial de Hall,  $V_H$ ) entre ambos lados de la placa de semiconductor.

## METODOLOGÍA



**Figura 26. Principio de funcionamiento del efecto Hall. Se observa como la presencia de un campo magnético genera una distribución de las cargas y la aparición de un potencial.**

Luego, este potencial es directamente proporcional a la magnitud del campo magnético y puede ser muy pequeño (del orden de mV), por lo que la mayoría de sensores comerciales incorporan amplificadores, circuitos de conmutación lógica y reguladores de voltaje para mejorar la sensibilidad, histéresis y señal de salida del sensor.

Existen sensores de efecto Hall de salida analógica o digital. Los de salida analógica proporcionan una señal de voltaje continua que aumenta conforme el campo magnético es más intenso y disminuye conforme el campo magnético es más débil. Los de salida digital disponen de un trigger de manera que cuando el flujo magnético supera un determinado valor umbral de salida, el sensor pasa de un estado “OFF” a un estado “ON”. Luego la salida de estos sensores únicamente cuenta con dos estados, “ON” y “OFF”, y son este tipo de sensores los que se emplearon en el presente proyecto. Además, los sensores digitales pueden ser unipolares (switch) o bipolares (latch). En el caso de los bipolares, el estado “ON” se consigue con un campo magnético positivo (polaridad sur) y el estado “OFF” con un campo magnético negativo (polaridad norte). En el caso de los unipolares, estos sensores únicamente necesitan un campo magnético con una sola polaridad: el estado “ON” se alcanza cuando el campo magnético aumenta hasta superar el umbral de activación ( $B_{OP}$ ) y el estado “OFF” se alcanza cuando el campo magnético disminuye por debajo del umbral de inactivación ( $B_{RP}$ ). Éstos últimos son el tipo de sensores Hall que se emplearon en el presente proyecto.

La Figura 27 muestra el esquema eléctrico del sensor de efecto Hall A3144 y en el Anexo I aparece detallada la conexión de ambos sensores a la placa de Arduino Uno. Éste se alimentó a 5 V y se conectó su salida a un pin digital de Arduino.



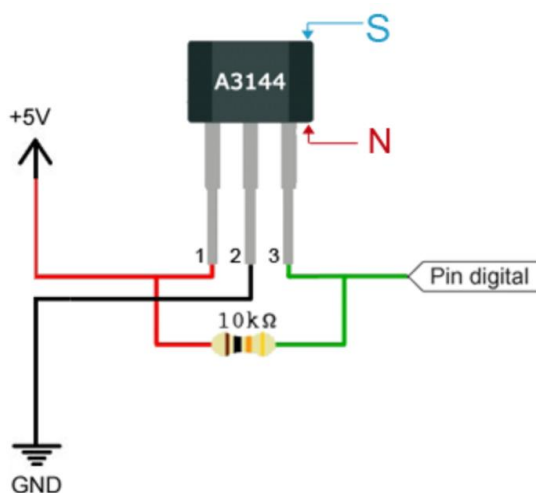


Figura 27. Esquema eléctrico del sensor de efecto Hall A3144.

Cabe destacar que se emplearon sensores magnéticos en lugar de sensores mecánicos (un final de carrera por ejemplo) porque además de ser más económicos, presentan claras ventajas frente a éstos: son de tamaño mucho más reducido, son más fiables y robustos, evitan el rebote eléctrico y pueden trabajar bajo condiciones extremas (pues son inmunes a las vibraciones, polvo o agua) debido a que toda su electrónica permanece sellada.

#### 4.1.3.4 Sensor de color RGB

Entre los requisitos que debe cumplir la técnica empleada para la medición del pH del medio de cultivo se encuentra el hecho de que ésta debe tener un tamaño reducido para permitir realizar la medida dentro del incubador y a su vez que la medida pueda realizarse de manera automática. Es por esto que técnicas ya implantadas y comercializadas como es el electrodo de pH no resultan adecuadas para realizar la medida, ya que posee un gran tamaño (incompatible con el incubador), necesita estar inmerso en el medio de cultivo para obtener la medida y requiere de una manipulación manual. El resto de técnicas más innovadoras (sensores ISFET, fibra óptica, etc.) se adaptan a las necesidades de tamaño pero tienen un coste económico excesivo para las necesidades del proyecto.

Por lo que finalmente, para la medición del pH del medio de cultivo se optó por emplear una técnica basada en métodos ópticos. En concreto se utilizó un sensor óptico, el cual no mide de forma directa el pH, sino que lo que detecta es la intensidad de las componentes de color RGB del medio de cultivo generada tras iluminar la muestra con luz LED blanca. De esta manera, en función de la misma, a partir de unas curvas de calibración, el sistema realiza una estimación del pH. El sensor que se empleó fue un TCS34725, de la marca Adafruit (véase Figura 28), cuyas conexiones a Arduino Uno aparecen detalladas en el Anexo I.

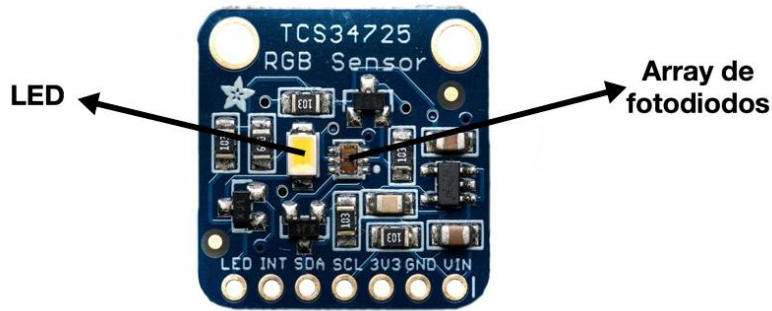


Figura 28. Sensor de color TCS34725.

Como se puede observar en la Figura 29, este sensor incorpora un array 3x4 de fotodiodos, el cual está formado por fotodiodos con filtro de color rojo, fotodiodos con filtro de color verde, fotodiodos con filtro de color azul y fotodiodos sin filtro para extraer las tres componentes RGB. Además, estos fotodiodos disponen de un filtro que bloquea la componente espectral infrarroja (IR), lo que permite una medida mucho más precisa de la intensidad de color. Por otra parte, el sensor cuenta con cuatro convertidores analógico-digital (ADC) que convierten simultáneamente la intensidad (ya amplificada) recogida en el fotodiodo en un número digital de 16 bits. Por último, para asegurar la integridad de los datos obtenidos, éstos son transferidos a un registro de datos y la comunicación con el microcontrolador se realiza a través del bus serie I<sup>2</sup>C (pines 4 ó SDA y 5 ó SCL de Arduino Uno). También dispone de un pin para generar interrupciones (pin INT) y un pin que permite regular la intensidad del LED (pin LED).

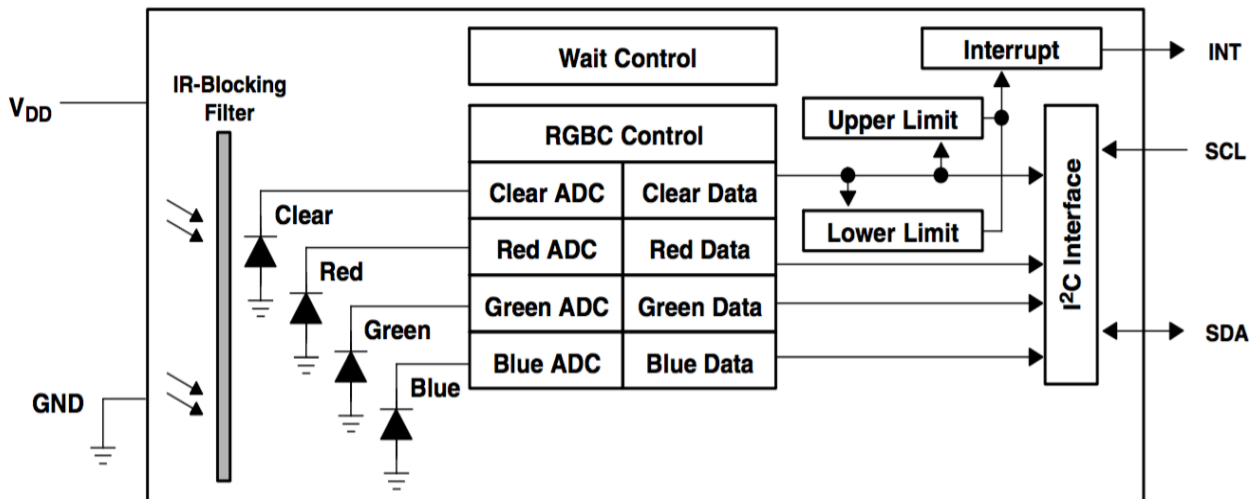


Figura 29. Diagrama de bloques funcional del sensor de color TCS34725.

#### 4.1.3.5 Bomba peristáltica

Para extraer el medio de cultivo en malas condiciones de la placa Petri y posteriormente depositarlo en un contenedor de residuos, se utilizó una bomba peristáltica lo suficientemente potente para ejercer dicha tarea. Esta bomba cuenta con un tubo flexible de plástico (una parte de entrada y

otra parte de salida) y un motor que hace girar unos rodillos, los cuales van comprimiendo progresivamente el tubo en sentido rotatorio y empujando el líquido a través de él sin entrar en contacto en ningún momento con partes mecánicas de la bomba, generando un flujo pulsátil.

La bomba peristáltica que se empleó (véase Figura 30) posee un motor de 12 V de continua y 5 W de potencia.



Figura 30. Bomba peristáltica 12V.

#### 4.1.3.6 Relé

Para el control de la bomba peristáltica se empleó el relé de 5V de 1 canal que se muestra en la Figura 31, basado en un interruptor que permite conmutar grandes picos de tensión o intensidad. Se utilizó con el objetivo de aislar el circuito de potencia del de control puesto que el arranque de la bomba a partir del driver ocasionaba problemas de ruido. Su conexión a Arduino Uno aparece detallada en el Anexo I.



Figura 31. Relé 5V de 1 canal.

#### 4.1.3.7 Comunicación inalámbrica

Por último, para establecer la comunicación entre el sistema de control y el PC/usuario se implementó una red de comunicación inalámbrica con el objetivo de eliminar cableado molesto en el laboratorio, puesto que el módulo de control de pH trabaja dentro del incubador y no es viable una comunicación con el PC a través del puerto USB. Ésta se basa en el protocolo ZigBee, el cual dispone de ciertas ventajas con respecto a otras redes inalámbricas como Bluetooth: es más sencillo de utilizar, más económico y presenta un consumo eléctrico menor. Sin embargo, su velocidad de transmisión es mucho menor que otras redes, pero suficiente para las necesidades del presente proyecto.

## METODOLOGÍA

El modelo de ZigBee utilizado fue el 4214A (véase Figura 32). Para crear la red de comunicación de este sistema se necesitaron dos módulos XBee, uno maestro y otro esclavo. Cada XBee tuvo que ser previamente programado con una configuración diferente para que realizase su papel dentro de la red de comunicación. Dicha programación puede realizarse a través de la consola del puerto serie utilizando comandos AT, o bien a través del programa llamado X-CTU que permite configurar los XBee de forma sencilla, razón por la cual en el presente trabajo se empleó esta última opción.



Figura 32. Módulo Zigbee.

Una vez programados, el XBee maestro se mantiene conectado al PC a través de un cable USB creando un puerto serie virtual entre el PC y el XBee. Al mismo tiempo, el XBee aprendiz establece una conexión tipo UART a través de los pines 0 (Rx) y 1 (Tx) con el microcontrolador, la cual aparece detallada en el Anexo I.

### 4.1.3.8 Sistema completo

Finalmente, el resultado del equipo obtenido tras el montaje de los distintos módulos es el que se muestra en la Figura 33.

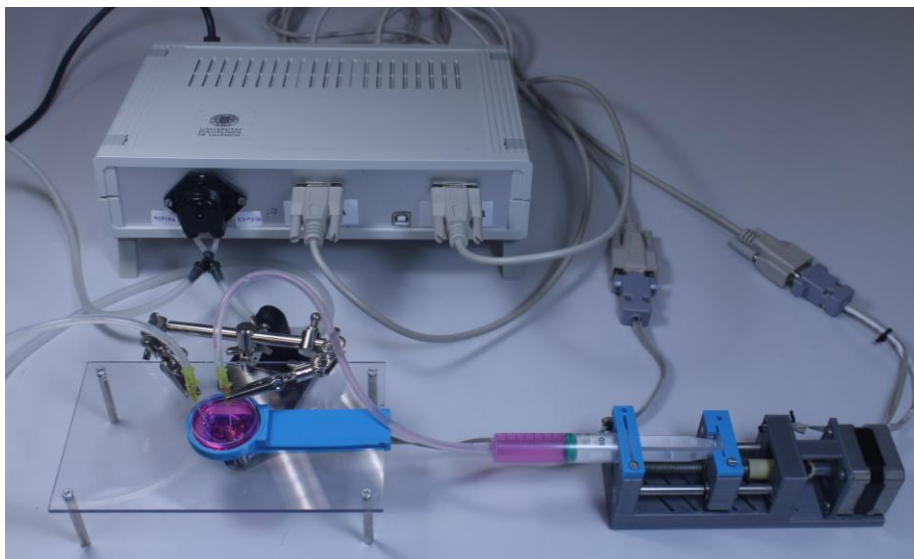
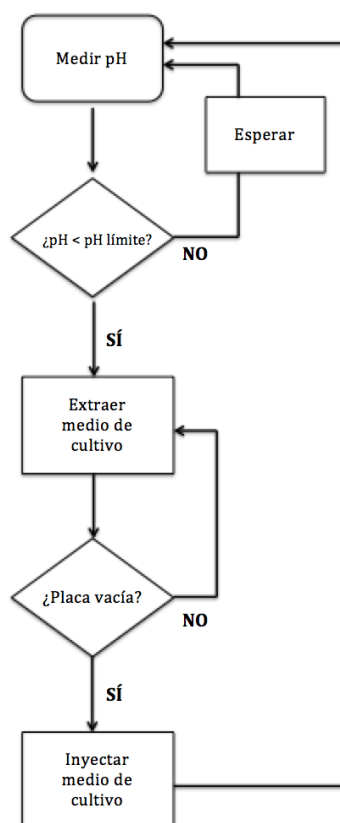


Figura 33. Fotografía del biorreactor desarrollado. Se muestra la bomba de inyección y la bomba peristáltica, el módulo de monitorización de pH y la electrónica ensamblada en la caja de plástico ABS.

## 4.2 Control electrónico del biorreactor

Una vez realizadas las conexiones de los distintos elementos al microcontrolador, se procedió a realizar la programación del mismo (véase Anexo II) con el objetivo de hacer funcionar por un lado cada uno de los módulos del sistema de manera independiente y por otro lado, de comunicar los diferentes componentes electrónicos entre sí para que dichos módulos puedan trabajar de forma coordinada y sinérgica.

La Figura 34 muestra el flujo de trabajo general del sistema. El código se programó para que el sistema pueda trabajar tanto de manera manual como de manera automática, según las preferencias del usuario.



**Figura 34. Flujograma general del sistema. El biorreactor va tomando lecturas del pH del medio y cuando éste es menor que un determinado pH límite (el óptimo de cultivo), el sistema de intercambio de medio se pone a funcionar retirando el medio con la bomba peristáltica e introduciendo el nuevo medio con la bomba de inyección. Una vez realizado el cambio el ciclo vuelve a repetirse. (imagen propia)**

### 4.2.1 Modo de funcionamiento manual

Cuando el sistema trabaja en modo manual, el usuario es el encargado de obtener cada cierto período de tiempo que considere oportuno las medidas de pH enviando de forma manual órdenes al microcontrolador, con el objetivo de ir monitorizando el estado del medio y decidir si debe enviar la orden de retirada de medio e incorporación de uno nuevo.

#### **4.2.1.1 Control bomba de inyección**

El microcontrolador envía tres órdenes al driver motor cada vez que recibe por el puerto serie la trama asociada a cada una de ellas. Por una parte, a través de las funciones inicializarMotor() y moverMotor() (definidas en el bloque “Motor” del código presente en el Anexo II), el microcontrolador inicializa el motor paso a paso que mueve el émbolo de la jeringa de la bomba de inyección indicando la cantidad de pasos y en qué sentido debe realizarlos para introducir la cantidad de volumen deseada. Por otra parte, por medio de la función pararMotor() (definida en el bloque “Motor” del código presente en el Anexo II), el microcontrolador detiene el motor y la jeringa deja de inyectar volumen. Finalmente, con la función resetearMotor() (definida en el bloque “Motor” del código presente en el Anexo II), el microcontrolador ordena al motor que se mueva en sentido inverso la cantidad de pasos necesarios para llevar la pieza móvil a la posición inicial. Esta última se ejecuta en el caso de que el líquido de la jeringa se haya agotado porque el émbolo ha llegado a su tope y ésta tiene que ser rellenada y colocada de nuevo en la bomba.

Además, el microcontrolador recibe continuamente el estado de los dos sensores de efecto Hall. Cuando alguno de los dos se encuentra en estado bajo, éste ordena al motor que se detenga, para evitar que éste se dañe al seguir girando una vez la pieza móvil que empuja al émbolo ha llegado a su tope. Por el contrario, siempre que se encuentren en estado alto, el microcontrolador permite que funcione el motor y el émbolo se mueva.

#### **4.2.1.2 Control sensor de color RGB**

El LED del sensor de color RGB se mantiene por defecto apagado (para evitar posibles daños en las células) y únicamente se enciende cuando el microcontrolador recibe por el puerto serie la trama asociada a la lectura de pH del medio. Así, el sensor realiza la medida a través de la función leer\_rgb() (definida en el bloque “Sensor\_RGB” del código presente en el Anexo II).

Por otra parte, el sensor de color RGB también proporciona una lectura del color que presenta el medio. Ésta se realiza a través de la función color() (definida en el bloque “Color” del código presente en el Anexo II) cada vez que el microcontrolador recibe por el puerto serie la trama asociada a dicha función. Esta función realiza una normalización a la componente RGB mayor, convirtiendo los valores obtenidos para cada componente de color a un valor comprendido entre 0 y 1 (donde 0 se corresponde con la mínima intensidad de dicha componente y 1 la máxima).

Además, el sensor se calibra a través de la función calibración() (definida en el bloque “Sensor\_RGB” del código presente en el Anexo II) cuando el microcontrolador recibe por el puerto serie la trama asociada a dicha función. Los valores de calibración permanecen guardados por defecto en la EEPROM del microcontrolador.

#### **4.2.1.3 Control bomba peristáltica**

El microcontrolador envía dos órdenes a la bomba peristáltica cada vez que recibe por el puerto serie la trama asociada a cada una de ellas. Por una parte, el microcontrolador a través de la función bombaMan() (definida en el bloque “Peristáltica” del código presente en el Anexo II), pone en estado alto la salida del relé haciendo que se active el motor de continua que mueve la bomba peristáltica. Por el contrario, a través de la función stopBomba() (definida en el bloque “Peristáltica”

del código presente en el Anexo II), el microcontrolador pone en estado bajo la salida del relé haciendo que se detenga el motor de continua y que la bomba deje de extraer medio.

#### 4.2.2 Modo de funcionamiento automático

Con el objetivo de que las distintas funciones anteriormente definidas se ejecuten de forma automática (sin la intervención del usuario) se programaron una serie de temporizaciones (definidas en el bloque “Temporizaciones” del código presente en el Anexo II).

De esta manera, cuando transcurre un tiempo determinado, el microcontrolador ejecuta la función `temporizacion()`, la cual llama a la función `leer_rgb()`, que toma una medida del pH. Tras un tiempo en el que se han tomado una serie de medidas de pH, el microcontrolador ejecuta la función `temporizacion3()`, la cuál compara la media de los pH medidos con un pH límite (por debajo del cual se debe cambiar el medio). Si el pH está por encima, se sigue ejecutando la función `temporizacion()` una vez pasado el tiempo correspondiente, pero por el contrario, si el pH está por debajo, el microcontrolador ejecuta la función `bomba()` (definida en el bloque “Peristáltica” del código presente en el Anexo II) que activa la bomba peristáltica durante un tiempo definido por la `temporizacion2()` para retirar el medio de cultivo. Transcurrido este tiempo, se ejecuta la función `inicializarMotor()` que activa la bomba de inyección para administrar el nuevo medio a continuación.

Por otra parte, cada cierto tiempo definido por la `temporizacion4()`, se ejecuta la función `enviarDatos()` (definida en el bloque “Comunicación” del código presente en el Anexo II) y el microcontrolador envía al PC a través del puerto serie de comunicaciones los siguientes datos para que se muestren en la interfaz gráfica de usuario: nivel de pH medido, volumen restante en la jeringa, posición de la bomba y valor de los componentes RGB de color del medio.

#### 4.2.3 Interfaz gráfica de usuario

Una vez programado el microcontrolador del sistema, para garantizar la usabilidad del equipo se diseñó y programó una interfaz gráfica de usuario, un GUIDE en MATLAB®, con el objetivo de que el usuario pueda, a través del PC, monitorizar las diferentes magnitudes (pH, volumen, etc.) y enviar las órdenes de funcionamiento necesarias al sistema de la manera más sencilla e intuitiva posible.

En la Figura 35 se muestra la interfaz gráfica de usuario en una situación inicial de partida. Como se puede observar, está dividida en siete paneles o secciones: la sección *Serial Configuration* para configurar la comunicación, la sección *Operating Mode* para seleccionar el modo de funcionamiento del sistema, la sección *Automatic Control* para establecer los parámetros requeridos en el modo automático, la sección *Sensor Control Panel* para configurar el sensor de color RGB, la sección *Pump 2 Control Panel* para controlar la bomba peristáltica, la sección *Syringe Pump Control Panel* para controlar la bomba de inyección y la sección *pH Control Panel* para la monitorización del pH.



METODOLOGÍA

Además, esta interfaz dispone de un panel de notificaciones en el que aparecen en rojo los diferentes avisos importantes por parte del sistema y un panel que permite mostrar el color del medio de cultivo, para una monitorización del pH más visual.

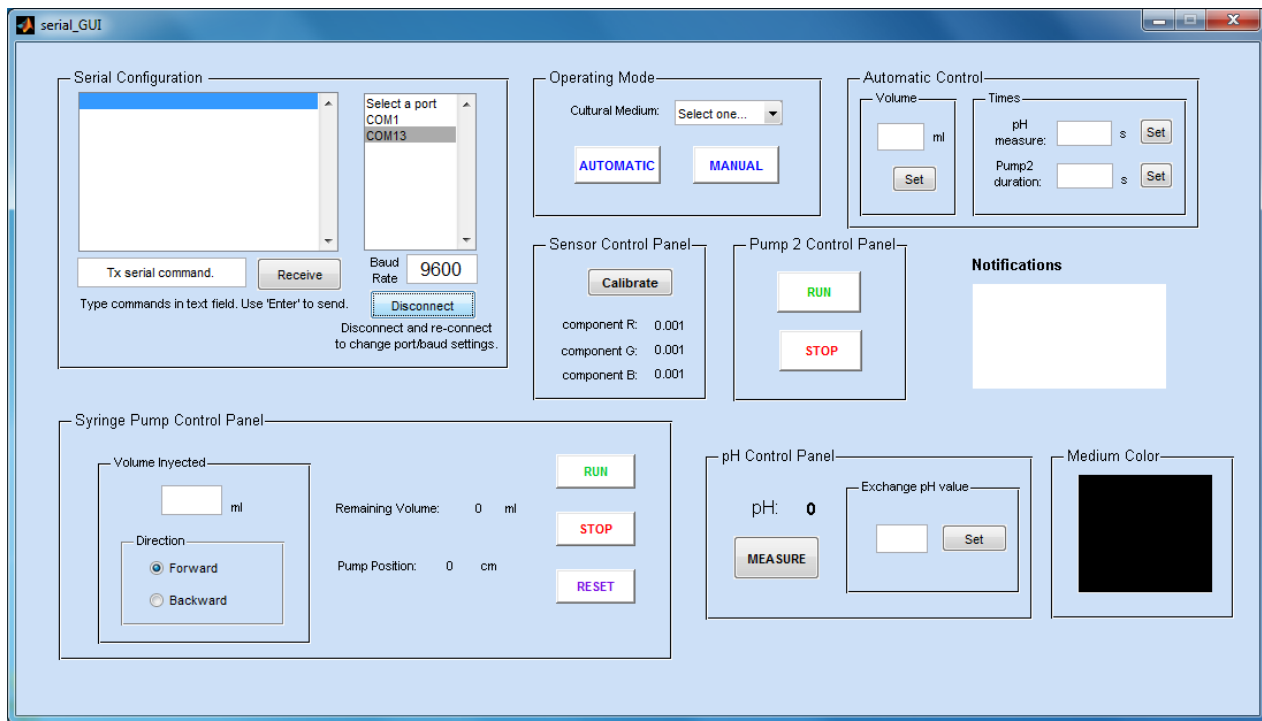


Figura 35. Interfaz gráfica de usuario del sistema. En esta pueden observarse los diferentes paneles que sirven para controlar el biorreactor. Aparece también la pantalla de notificaciones y de visualización del color del medio. Además aparecen con letras de colores llamativos los botones más importantes.

En primer lugar, la sección *Serial Configuration* permite seleccionar el puerto serie (de entre una lista que contiene todos los puertos abiertos) correspondiente al del Xbee maestro conectado al PC con el objetivo de establecer la comunicación con el microcontrolador del sistema. Por defecto se emplea una velocidad de comunicación de 9600 baudios, pero ésta es modificable. Por tanto, el primer paso a realizar es seleccionar el puerto y pulsar el botón “Connect” para habilitar la comunicación (véase Figura 36).

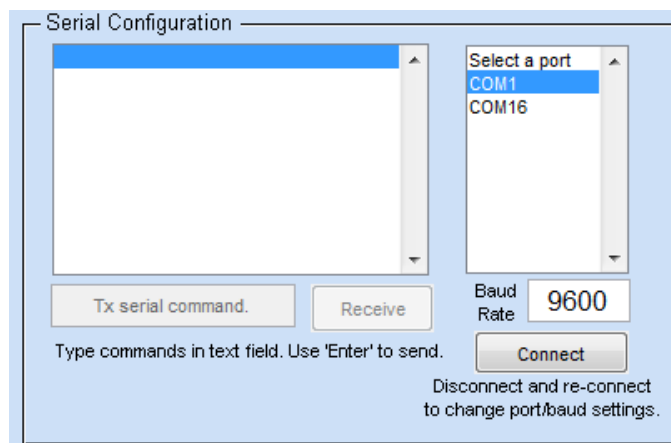


Figura 36. Sección *Serial Configuration* de la interfaz de usuario.



Por defecto el modo de funcionamiento del sistema es manual, pero éste puede modificarse siempre que se desee en el panel *Operating Mode* (véase Figura 37). Esta sección permite seleccionar un modo de funcionamiento automático o bien, en el caso de ya estar trabajando el sistema en modo automático, volver al modo de funcionamiento manual. Además, esta sección dispone de una pestaña desplegable que permite seleccionar el tipo de medio de cultivo del cual se está midiendo el pH (pues en función de uno u otro se tiene una curva de calibración de pH distinta).

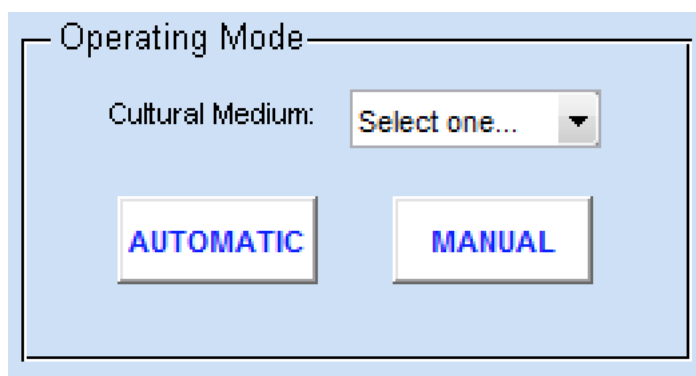


Figura 37. Sección *Operating Mode* de la interfaz de usuario.

Así, en el caso de desear un modo de funcionamiento automático del sistema, previamente debe introducirse en el panel *Automatic Control* los parámetros necesarios. Como se puede observar en la Figura 38, se debe establecer la cantidad de volumen (en ml) de medio de cultivo que se desea inyectar una vez vaciado el medio en malas condiciones, y las temporizaciones, es decir, cada cuánto tiempo (en segundos) se quiere tomar una medida del pH y cuánto tiempo (en segundos) se desea que la bomba peristáltica esté en marcha para extraer medio.

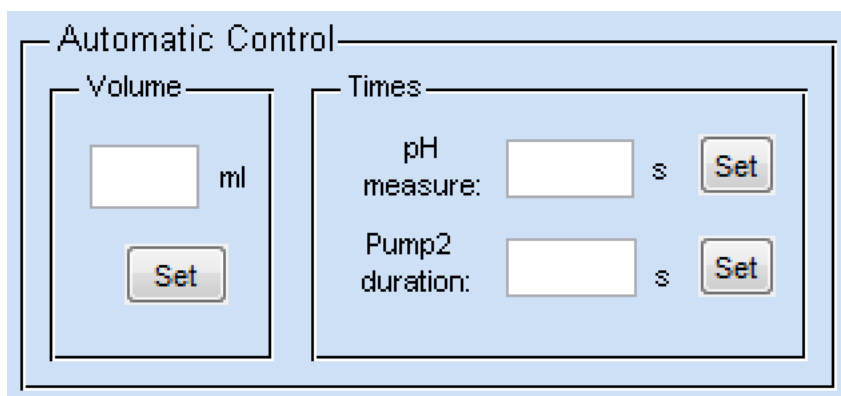


Figura 38. Sección *Automatic Control* de la interfaz de usuario.

Por otra parte, en la sección *Sensor Control Panel* se muestra por pantalla las componentes RGB del medio de cultivo (valores entre 0 y 1) del cual se monitoriza el pH con el sensor de color. Además, cuenta con un botón que permite realizar en todo momento la calibración del sensor de color RGB (véase Figura 39).

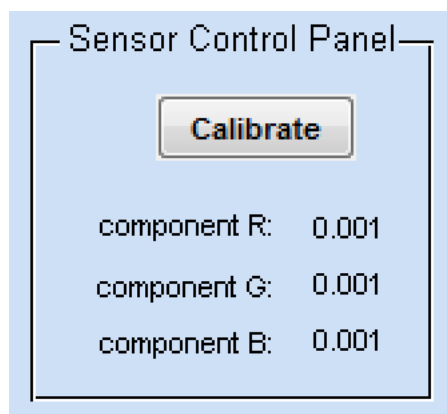


Figura 39. Sección *Sensor Control Panel* de la interfaz de usuario.

La sección *Pump 2 Control Panel* sirve para controlar la bomba peristáltica cuando el sistema está trabajando en modo manual. Esta bomba no requiere de la especificación de ningún parámetro, simplemente cuando el usuario desee extraer el medio debe activar la bomba pulsando el botón RUN y cuando haya extraído todo el medio debe detenerla pulsando el botón STOP (véase Figura 40). En el caso de que el sistema trabaje en modo automático, únicamente se debe especificar el tiempo que se desea que esté funcionando para retirar todo el medio en el panel *Automatic Control*.

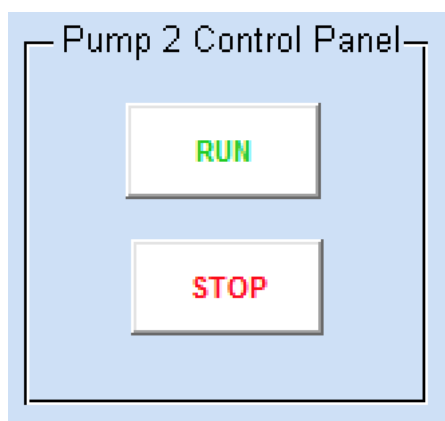


Figura 40. Sección *Pump2 Control Panel* de la interfaz de usuario.

Por otro lado, para controlar la bomba de inyección cuando el sistema trabaja en modo manual se utiliza la sección *Syringe Pump Control Panel*. Como se muestra en la Figura 41, para el control de la bomba es necesario indicar el volumen de medio que se desea inyectar. Por defecto el sentido de la bomba, como es lógico, está fijado hacia delante (Forward) empujando el émbolo pero también se programó la opción de que pudiese funcionar en sentido contrario (Backward). Para activar la bomba es necesario pulsar el botón RUN y para detenerla el botón STOP. Este panel cuenta con un tercer botón, RESET, que sirve para desplazar la pieza móvil a su posición inicial cuando el líquido de la jeringa se haya agotado porque el émbolo ha llegado al final, con el objetivo de que ésta pueda ser rellenada con medio y colocada de nuevo en la bomba. Por último, este panel también muestra la cantidad de volumen (en ml) que va quedando en la jeringa conforme ésta se va vaciando, así como su posición (en cm).

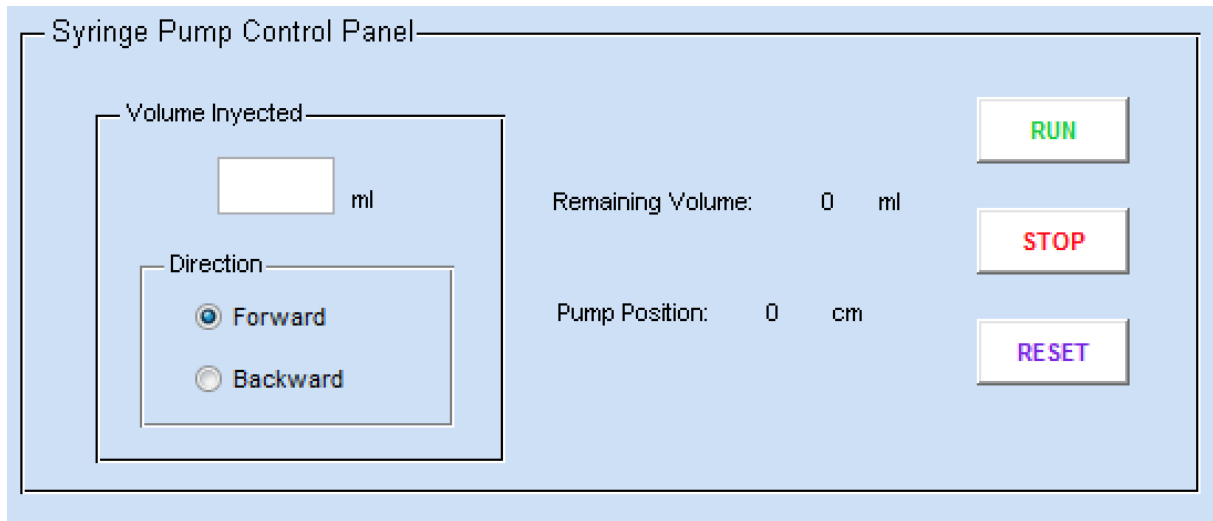


Figura 41. Sección *Syringe Pump Control Panel* de la interfaz de usuario.

Así, la Figura 42 muestra un ejemplo de la interfaz gráfica cuando se inyectan 2 ml de medio de cultivo (partiendo de la jeringa completamente llena, con 10 ml). Como se puede observar, el panel muestra que la cantidad de volumen restante en la jeringa es de 8 ml y el panel de notificaciones avisa de que la bomba está inyectando volumen en ese momento. Además, como información adicional el panel muestra la posición del émbolo de la jeringa en cm (sabiendo que la posición inicial es 0 cm y la posición máxima alrededor de 5 cm).

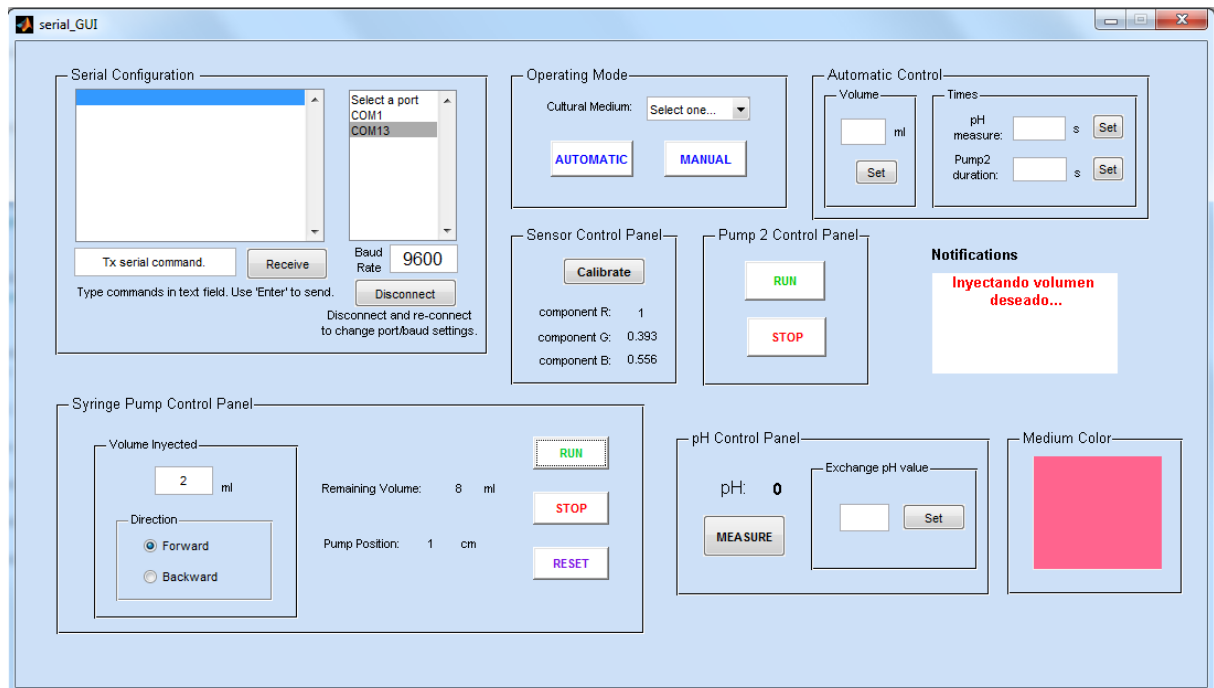


Figura 42. Ilustración de la interfaz gráfica en una situación de inyección de volumen.

METODOLOGÍA

Además, otro ejemplo de cómo queda la interfaz gráfica cuando el líquido de la jeringuilla se agota y la bomba debe resetearse para colocar la jeringuilla nuevamente rellena, aparece ilustrado en la Figura 43. En ésta puede observarse que el volumen restante en ese momento en la jeringa es de 0 ml y la posición del émbolo la máxima permitida, en este caso 5.13 cm. Por otra parte, el panel de notificaciones advierte que la jeringa debe rellenarse.

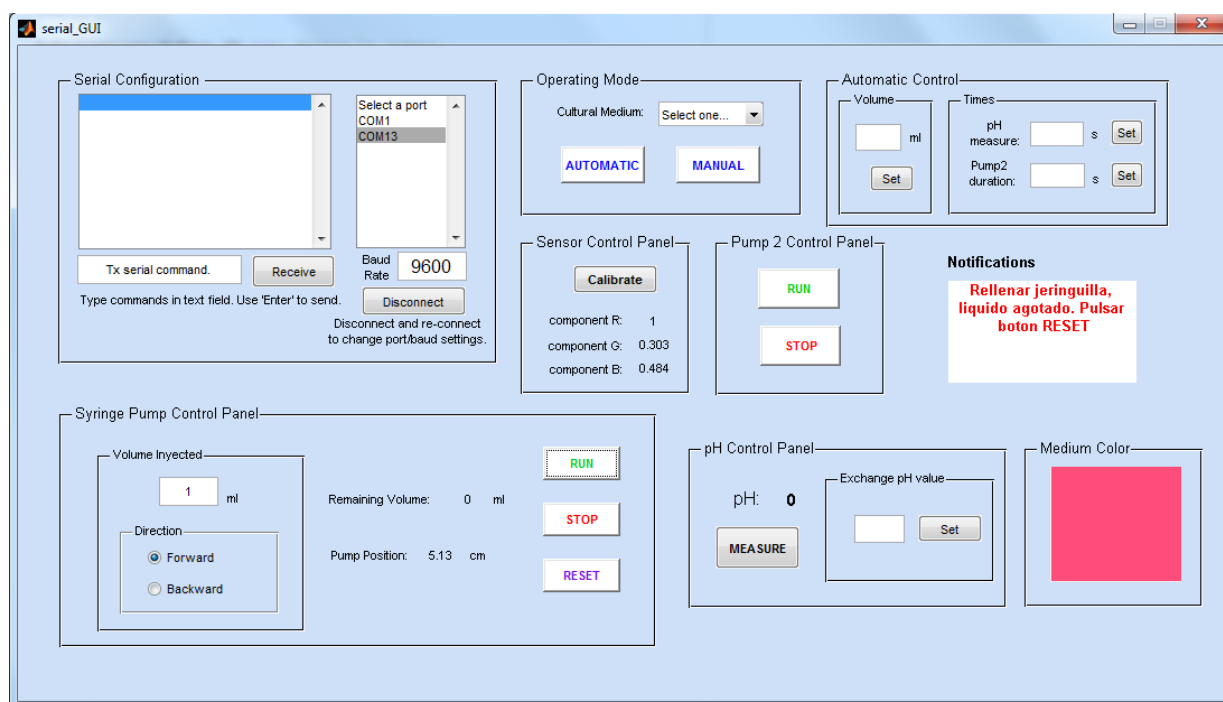


Figura 43. Ilustración de la interfaz gráfica en una situación en la que el líquido se ha agotado y ésta debe rellenarse.

Asimismo, la Figura 44 muestra lo que aparece en la interfaz gráfica una vez que la bomba ha sido reseteada y llevada a su posición inicial. Como se puede observar el líquido restante es de 10 ml (completamente llena) y la posición de 0 cm. Además, el panel de notificaciones avisa de que la bomba está lista para usarse.

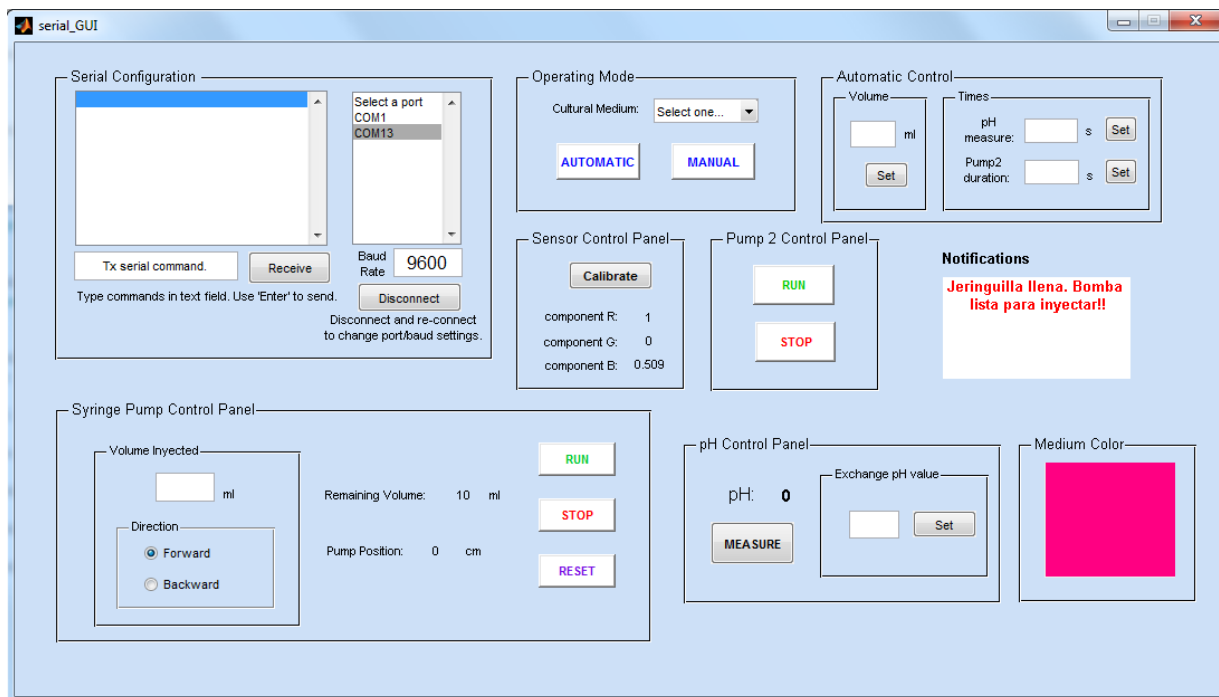


Figura 44. Ilustración de la interfaz gráfica en una situación en la que la bomba se ha reseteado y está lista para ser usada.

Finalmente, la sección *pH Control Panel* permite monitorizar continuamente el pH del medio de cultivo presente en la placa en ambos modos de funcionamiento. Además, en el caso de que el sistema trabaje en modo automático, es necesario indicar a partir de qué nivel de pH (pH límite) la bomba peristáltica debe ponerse en funcionamiento para extraer el medio y posteriormente la de inyección para administrar el nuevo medio. Por el contrario, en el caso de que el sistema trabaje en modo manual, para medir el pH es necesario pulsar el botón MEASURE (véase Figura 45).

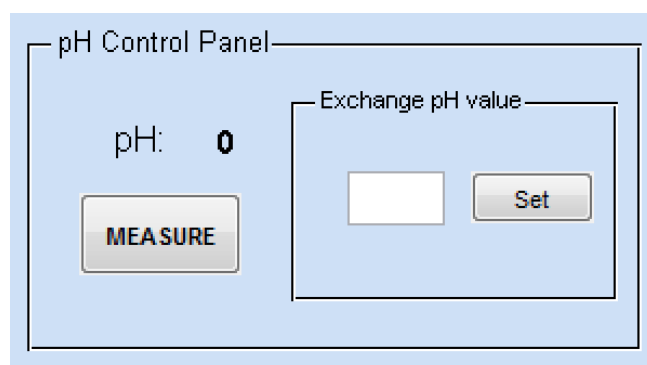


Figura 45. Sección *pH Control Panel* de la interfaz de usuario.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Curva de calibración de volumen

Una vez terminado el montaje y la programación de la bomba de inyección, se realizó una calibración de la misma con el objetivo de determinar el volumen entregado por la misma.

Para ello, en primer lugar se contó el número de pasos que realizaba el motor paso a paso para conseguir que la pieza móvil empujase el émbolo desde su posición de llenado inicial de 10 ml (máximo volumen admitido por la jeringuilla) hasta su posición de vaciado completo. Una vez conocido el número de pasos totales posibles que podía ejercer el motor (en este caso alrededor de unos 8220), se obtuvo el volumen proporcionado por la bomba para ocho valores de pasos distintos dentro de este rango. Así, cada volumen obtenido se pesó en una microbalanza para medir con la máxima precisión posible a cuántos gramos equivalían dichos volúmenes. De esta forma, y teniendo en cuenta que 1 g equivale a 1 ml, se obtuvo la Tabla 4 presente en el Anexo III.

A continuación, la Figura 46 muestra el ajuste lineal calculado con los datos de volumen y pasos obtenidos.

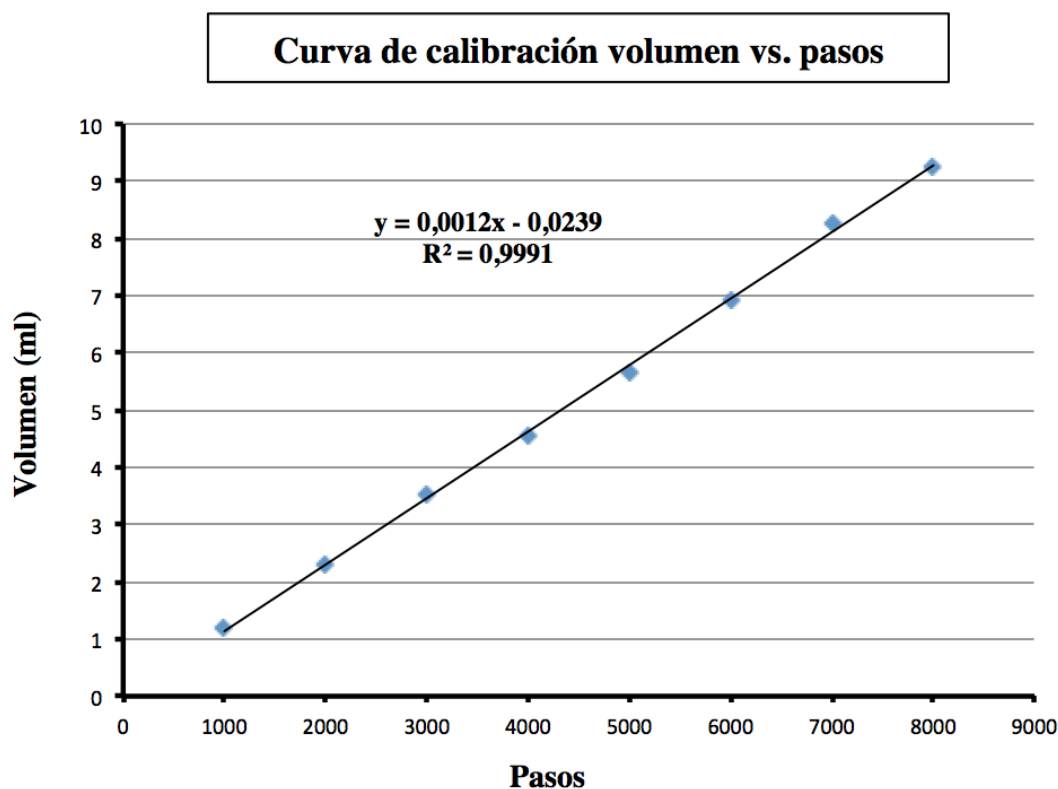


Figura 46. Curva de calibración de volumen de la bomba de inyección. En el eje X se representa el número de pasos del motor paso a paso y en el eje Y el volumen en ml. Se observa una  $R^2$  prácticamente igual a 1, muestra de que la curva ajusta muy bien a los datos.

## RESULTADOS

De esta manera, la ecuación de la recta obtenida permitió conocer cuántos pasos debía moverse el motor para proporcionar el volumen deseado por el usuario. Por tanto, cada vez que el microcontrolador recibe una trama que indique un nuevo valor de volumen a inyectar, éste calcula el número de pasos necesarios para ello a partir de la ecuación 1.

$$\text{Pasos} = \frac{\text{Volumen} + 0.0239}{0.0012} \quad (1)$$

## 5.2 Curva de calibración de pH

Como se ha comentado en el Capítulo 4 de Metodología, el sensor de color no detecta directamente el nivel de pH, sino las componentes de color RGB del medio de cultivo expresadas en un número entero decimal contenido en 16 bits. Por tanto, en el presente proyecto se llevó a cabo una estimación del pH a partir de los valores RGB obtenidos con el sensor.

Para ello, en primer lugar se cubrieron todas las zonas de la lámina de metacrilato con cinta aislante excepto la zona donde va encajada la placa Petri, la cual se cubrió con una pequeña caja blanca (para que no influyese el color) con el fin de que entrase la menor luz ambiental posible y así reducir al máximo las interferencias causadas por ésta. De igual manera, todo el sistema de medida se cubrió con una segunda caja para aislar aún más la zona. Luego todas las medidas se realizaron bajo estas mismas condiciones.

En segundo lugar, se prepararon cinco pocillos con medio de cultivo DMEM, cada uno de los cuales con un pH, y por tanto color exhibido por el indicador rojo fenol, distinto (véase Figura 47). Esto se realizó a partir de un único bote de DMEM, al cual se le fue añadiendo NaOH diluido para alcalinizarlo o HCl para acidificarlo, con el objetivo de alcanzar de manera “artificial” el nivel de pH deseado, el cual se fue comprobando con un pHímetro. De esta forma se consiguió disponer de cinco muestras con pH diferentes (pH=6, pH=6.5, pH=7, pH=7.5 y pH=8) dentro del rango donde interesaba monitorizar el pH.

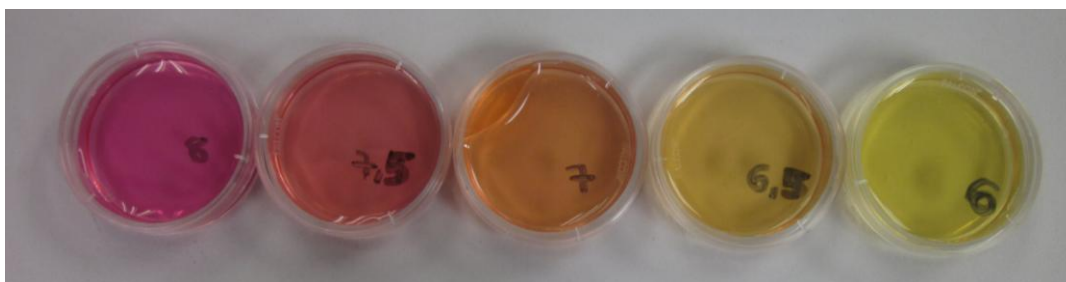


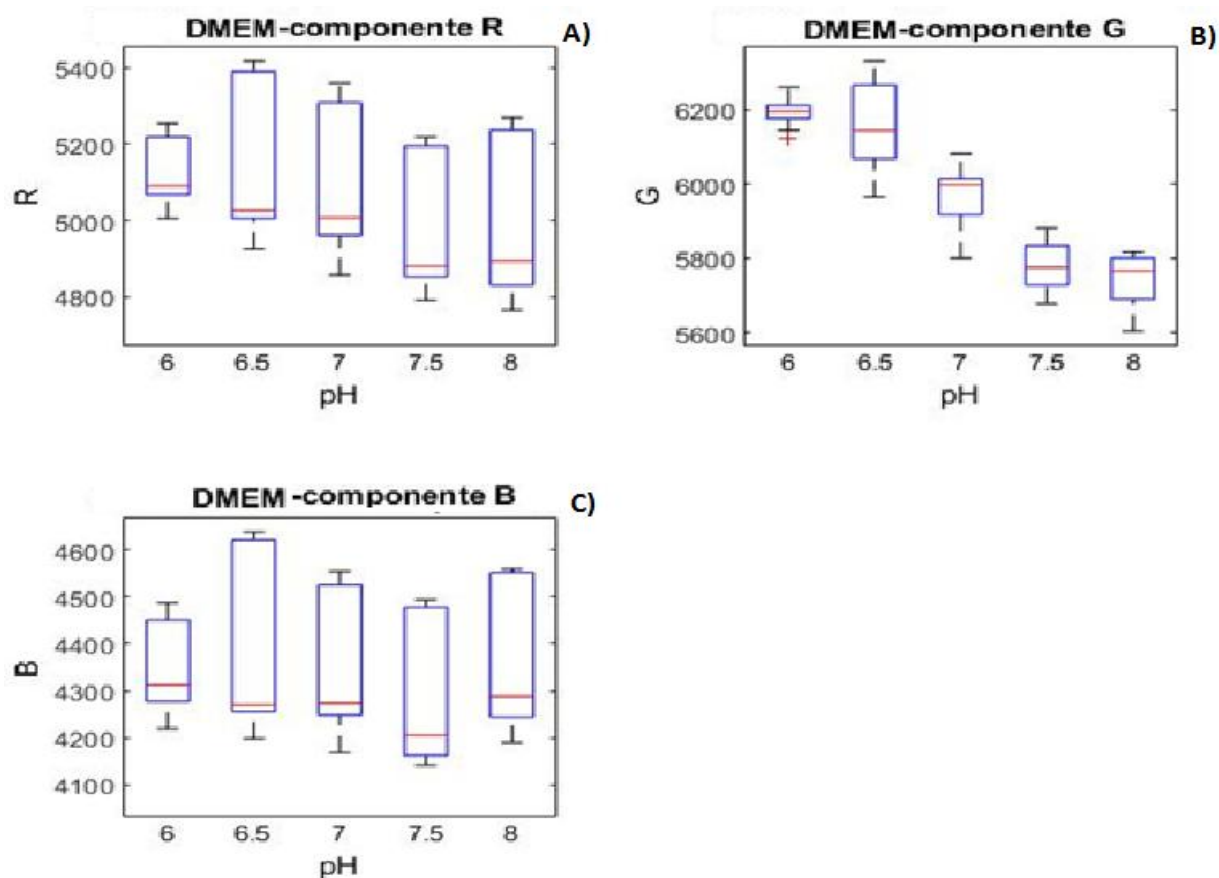
Figura 47. Cambio de color que exhibe el indicador rojo fenol para los distintos pH. Este presenta color fucsia para pH=8, color rojo para pH=7.5, color naranja para pH=7, color anaranjado para pH=6.5 y color amarillo para pH=6.



## RESULTADOS

A continuación, se tomaron 4 medidas cada 10 minutos para cada uno de los pocillos. Todo el procedimiento anteriormente descrito se repitió durante otros dos días, con el fin de contemplar la posible variabilidad introducida en las medidas por los cambios de luz o de paso del tiempo. Finalmente, se obtuvieron un total de 12 medidas RGB para cada pocillo.

Una vez realizadas todas las medidas, para obtener una distribución del conjunto de datos para los distintos pH y comprobar si existía algún valor atípico, se representó un Boxplot múltiple, como se puede observar en la Figura 48.



**Figura 48.** Boxplot múltiple de los valores obtenidos para las componentes RGB del medio DMEM. Se muestra la distribución de las componentes R para los diferentes niveles de pH (A), la distribución de las componentes G para los diferentes niveles de pH (B), la distribución de las componentes B para los diferentes niveles de pH (C).

A la vista de las gráficas obtenidas, se dedujo que tomar como referencia las componentes roja (R) o azul (B) para realizar una estimación del pH del medio no era una técnica adecuada puesto que éstas no seguían un patrón de evolución claro a lo largo de los diferentes pH y además se apreciaba una gran variabilidad en los datos (el 50% de los datos se encontraban ampliamente distribuidos en todos los casos). Sin embargo, en los datos obtenidos de la componente verde (G) sí que se observó una tendencia bastante clara de evolución, representada por un aumento en la componente G conforme

RESULTADOS

el nivel de pH disminuía y una disminución en la componente G conforme el nivel de pH aumentaba, así como una baja variabilidad en los datos obtenidos para cada pH.

Por tanto, para realizar la estimación del pH del medio se decidió basarse en la componente G del color del medio proporcionada por el sensor. Así, como se muestra en la Figura 49, se realizó un ajuste lineal de los datos obtenidos con el objetivo de obtener una relación entre la componente G medida y el pH del medio.

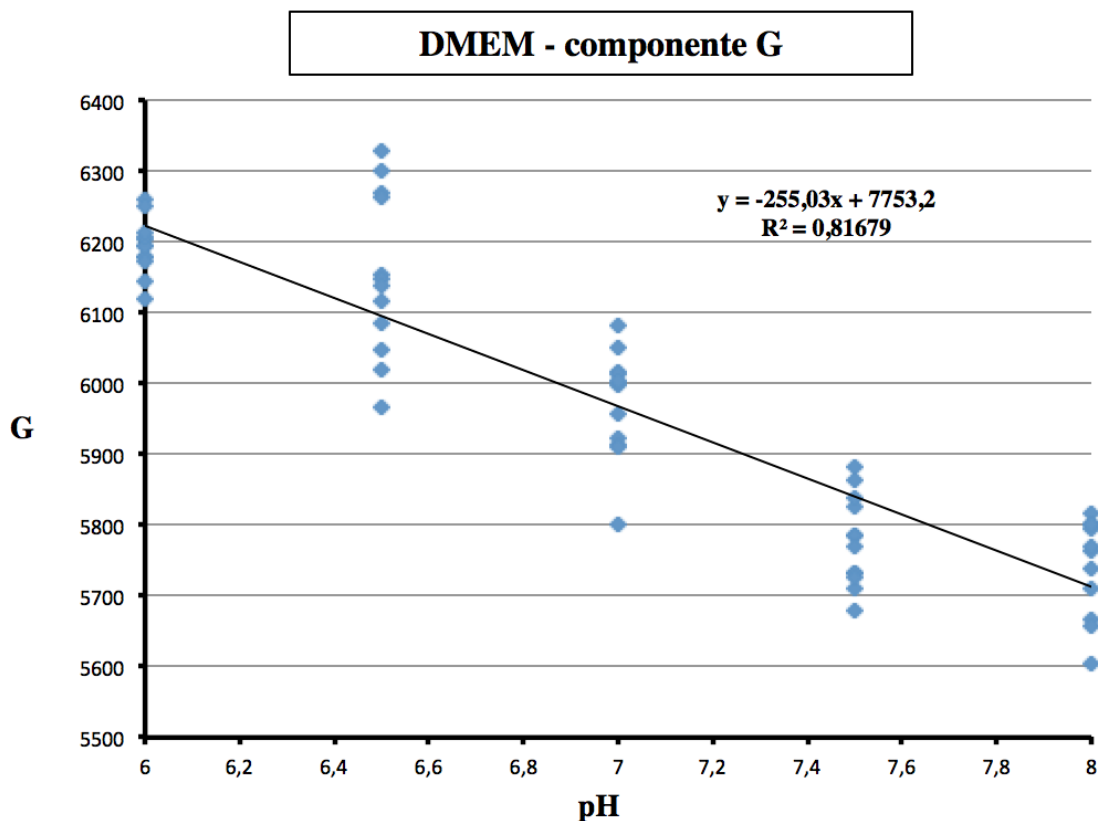


Figura 49. Curva de calibración del pH en función de la componente G del color exhibido por el medio DMEM. En el eje X se representa el nivel de pH dentro del rango 6-8 y en el eje Y se representa la componente verde (G) del medio. Se observa una R<sup>2</sup> muy cercana a 1, muestra de que se trata de un buen ajuste.

De esta manera, a partir del valor de la componente G que proporciona el sensor al realizar una medida sobre el medio de cultivo con un color determinado, el programa calcula el valor de pH del medio aplicando la ecuación 2 dada por el ajuste lineal calculado de la siguiente manera:

$$pH = \frac{G - 7753.2}{-255.03} \quad (2)$$

### 5.3 Estudio comparativo con sistema de medida de pH estándar

Para la validación y evaluación de la calidad y exactitud del módulo de medida de pH desarrollado en el presente proyecto se realizó un análisis del error obtenido tras realizar 8 medidas del pH con el sistema objeto de estudio (pH experimental) sobre cinco pocillos con pH (pH=6, pH=6.5, pH=7, pH=7.5, pH=8), y por tanto colores distintos, con respecto a las medidas obtenidas sobre los mismos pocillos con un sistema estándar de medida, un pHímetro (pH referencia). Las medidas que se obtuvieron para los diferentes pH y el error absoluto de cada medida se muestran en la Tabla 5 del Anexo III. Asimismo, la Tabla 6 del Anexo III muestra el error absoluto medio en valor absoluto y la desviación típica de las medidas que se obtuvieron para cada nivel de pH.

En primer lugar, con el fin de poner de manifiesto la frecuencia de dicho error absoluto y observar si los datos obtenidos procedían de una distribución normal (media igual a 0) se representó el histograma de la Figura 50. A la vista del mismo se demostró que los datos no seguían una distribución normal sino que la media de los mismos se encontraba ligeramente desplazada hacia valores negativos con una frecuencia predominante de entorno a -0.2.

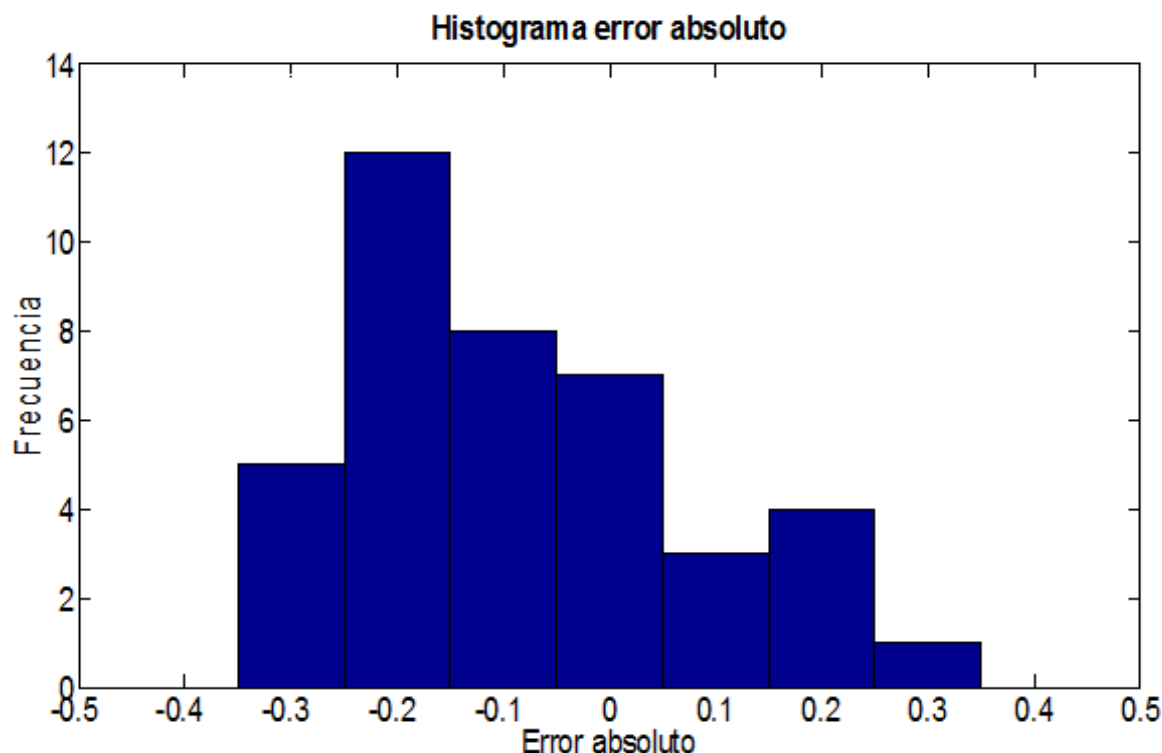


Figura 50. Histograma de los errores absolutos para cada medida. En el eje X se representa el error absoluto obtenido para las distintas medidas y en el eje Y la frecuencia con que se comete.

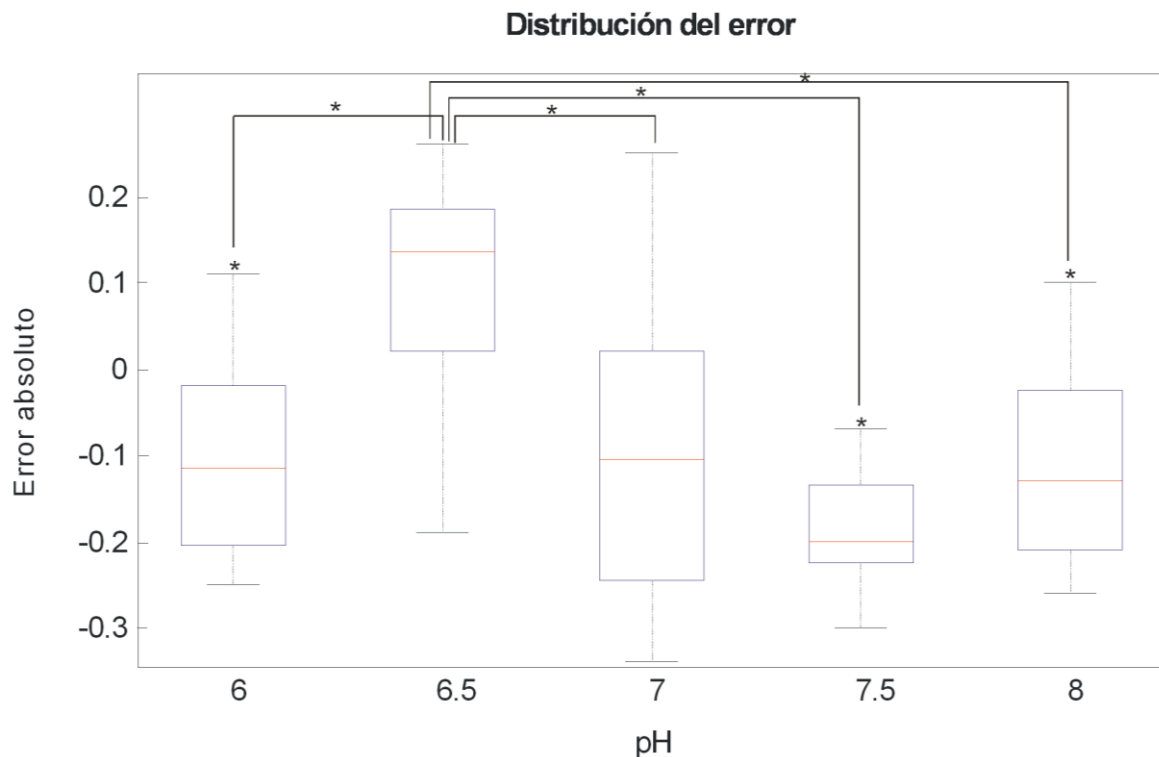
Por otra parte, como se puede observar en el boxplot múltiple representado en la Figura 51, donde se obtuvo una menor disparidad en las medidas de pH y por tanto una menor variabilidad en el error fue para el caso de pH=7.5. Por el contrario, donde se obtuvo una mayor disparidad en las medidas y por tanto una mayor variabilidad en el error fue para el caso de pH=7. Sin embargo, en el primer caso, los errores estuvieron concentrados todos en valores mayores y en el segundo caso

## RESULTADOS

existían más errores cercanos a 0. Además, este gráfico evidenció que existían diferencias en el error obtenido para los distintos grupos de pH. Así, el error obtenido fue mayoritariamente negativo para todos los niveles de pH (el sistema proporcionaba un valor de pH ligeramente superior al real) excepto para pH=6.5, donde el error obtenido fue mayoritariamente positivo (el sistema proporcionaba un valor de pH ligeramente inferior al real).

Para demostrar si estas diferencias podían considerarse estadísticamente significativas se realizó una prueba t de Student no pareada. Este test parte de la hipótesis (hipótesis nula) de que el error de las dos poblaciones comparadas es el mismo (misma media), frente a la alternativa de que no lo es. De esta manera, se demostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las distintas poblaciones de pH. Por el contrario, la población de pH=6.5 fue la única que sí presentó diferencias estadísticamente significativas con el resto de poblaciones ( $p\text{-value} < 0.05$ ).

Además, con el objetivo de evaluar la exactitud del sistema bajo estudio con respecto a la de un sistema estándar de medida, para demostrar si el error proporcionado por el sistema era significativamente distinto de 0 se realizó una prueba t de Student pareada. Este test no precisa que los datos provengan de poblaciones normales y parte de la hipótesis de que el error es igual a 0 (hipótesis nula), frente a la alternativa de que el error es distinto de 0. De esta manera, para pH=6, pH=7.5 y pH=8 se demostró que el error era significativamente distinto de 0 (para todos los casos  $p\text{-value} < 0.05$ ). Sin embargo, para pH=6.5 y pH=7 se demostró que el error no era significativamente distinto de 0 ( $p\text{-value}_{6.5} = 0.1039 > 0.05$  y  $p\text{-value}_7 = 0.2089 > 0.05$ ). Por tanto, se pudo deducir que para estos dos últimos casos, las medidas que toma el sistema estudio son significativamente similares a las que toma un sistema de medida estándar.



**Figura 51. Boxplot múltiple de los errores absolutos de cada medida para los diferentes pH. En el eje X se representa el nivel de pH dentro del rango de 6-8 y en el eje Y se representa el error absoluto obtenido para las diferentes medidas. Además, aparecen indicadas las significancias estadísticas (\*  $p\text{-value} < 0.05$ )**

## RESULTADOS

En segundo lugar, para comprobar si el error absoluto medio cometido era más o menos similar en todos los casos, como se observa en la Figura 52, se representó un diagrama de barras con los errores absolutos medios en valor absoluto para cada nivel de pH, así como sus correspondientes desviaciones típicas. Este gráfico evidenció que el error absoluto medio cometido en todos los casos era más o menos el mismo, siendo ligeramente superior para pH=7 y pH=7.5, obteniéndose una media de los mismos de 0.1525 y una desviación típica media de  $\pm 0.0914$ .

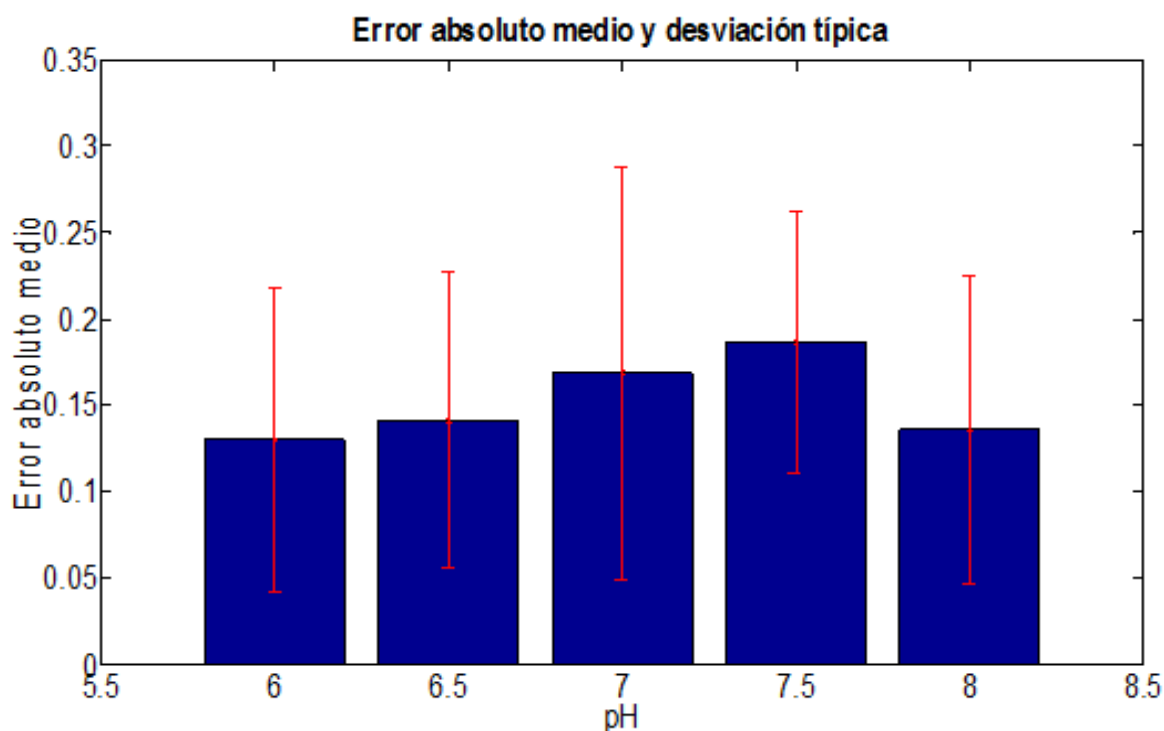


Figura 52. Diagrama de barras del error absoluto medio para cada nivel de pH y sus respectivas desviaciones típicas (en rojo). En el eje X se representa el nivel de pH dentro del rango de 6-8 y en el eje Y se representa el error absoluto medio (en valor absoluto).

Este análisis permitió concluir que aunque en primera instancia se pensó, a la vista de la distribución de los datos de la componente G, que un ajuste lineal era la mejor opción para realizar una estimación del pH, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que para pH=6.5 la curva de calibración calculada no se ajustaba adecuadamente, presentando errores significativamente diferentes con respecto al resto de medidas de pH. Por tanto, en el caso de requerir de un sistema de medida de pH más exacto, la curva debería recalibrarse ajustando los datos de otra manera distinta a la lineal.

Con todo, el error proporcionado por el sistema de medida de pH objeto de estudio resulta más que satisfactorio teniendo en cuenta las necesidades del presente proyecto (pues cabe recordar que el objetivo no es desarrollar un sistema que calcule perfectamente el nivel de pH) asegurando que el error cometido por el mismo se encontrará dentro del estrecho intervalo de confianza  $0.1525 \pm 0.0914$ .



## 6. DISCUSIÓN

En el presente proyecto se consiguió implementar un prototipo de biorreactor que intercambiara automáticamente el medio de un cultivo de células con el fin de mantener las condiciones de cultivo óptimas para la supervivencia de las mismas, en este caso indicado especialmente para experimentación con células cardíacas en aplicaciones de Ingeniería Tisular.

Además, se logró disponer de un sistema de administración de medio muy preciso gracias a la curva de calibración de volumen calculada. Por lo que este sistema es capaz de suministrar una cantidad mínima de volumen de 1  $\mu$ l. Por otra parte, el módulo de monitorización de pH desarrollado resultó aportar una medida del pH bastante aproximada a la realidad y repetible en la mayoría de casos a partir del color del medio de cultivo, presentando un error de medida asumible dentro de las necesidades del presente proyecto.

La importancia del presente proyecto radica en el hecho de que se trata del primer biorreactor destinado al intercambio del medio de cultivo de manera automática que toma como indicador de que el medio se encuentra en malas condiciones el nivel de pH del mismo, pues hasta el momento este proceso se ha realizado manualmente por el personal de laboratorio cuando se ha detectado de manera visual que el color del medio pasaba a ser amarillento. Así, este nuevo sistema permite mejorar la eficacia del procedimiento mediante la acción coordinada de un módulo de medida de pH y un módulo de intercambio de medio. Además, éste permite reducir el número de errores cometidos en el proceso relacionados con la cantidad de volumen a suministrar al utilizar un sistema completamente informatizado y automatizado, eliminando con ello el factor humano. También, resulta útil para reducir el tiempo y atención que el personal de laboratorio dedica al proceso de intercambio de medio, permitiendo que éste pueda centrarse en otras tareas más importantes.

En cuanto a sus implicaciones clínicas, este biorreactor constituirá una pieza fundamental en el crecimiento, maduración y proliferación de los cardiomiocitos cultivados, asegurando en todo momento su supervivencia y viabilidad para ser adecuadamente utilizados en terapias celulares de regeneración del tejido miocárdico (inyección de cardiomiocitos artificiales con potencial cardiorregenerativo, creación de parches artificiales de miocardio, etc) en corazones infartados, en primera instancia de modelos y animales de experimentación, y en un futuro, de pacientes reales.

Sin embargo, el equipo desarrollado también presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, la falta de un montaje robusto que permita mantener sujetos los tubos de plástico junto con las agujas de retirada y suministro de medio al pocillo.

En segundo lugar, limitaciones relacionadas sobre todo con la monitorización del pH. Por una parte, al estar basada la medida de esta magnitud en una técnica óptica, la cual a su vez es extremadamente sensible, los cambios producidos en la luz ambiental influyen de forma significativa en la medida obtenida, produciendo interferencias. Es por este motivo que el sistema es capaz de realizar una correcta lectura del nivel de pH cuando la medida se toma bajo las mismas condiciones de luminosidad en las que se ajustó la curva de calibración (aislando lo máximo posible al sistema de la luz ambiental). Pero por el contrario, cuando estas condiciones cambian, la medida no coincide con la esperada.

## DISCUSIÓN

Por otra parte, también se comprobó que la forma en la que incide la luz ambiental proveniente del exterior influye en la medida, pues al cambiar la posición del sensor (el fotodetector en concreto) la medida RGB es distinta. Por tanto, cuando la medida se toma en la posición en la que se encontraba el sensor cuando se ajustó la curva de calibración, el sistema devuelve una medida correcta del pH. Sin embargo, cuando se varía la posición del mismo y la luz exterior incide de forma distinta, la medida del pH leída no es aproximada.

Para sortear los problemas ocasionados por interferencias de la luz ambiental comentados anteriormente, se plantea como posible solución diseñar una fuente de luz fija, uniformemente distribuida e independiente del sensor en la parte superior del pocillo, de manera que la luz atraviese la placa transparente e incidiese directamente en el fotodetector. Así el sensor detectaría con mayor intensidad la luz proveniente de la fuente de luz blanca, haciendo la ambiental prácticamente despreciable.

### 6.1 Líneas futuras

En cuanto a trabajo futuro, se pueden incorporar una serie de mejoras al biorreactor desarrollado en el presente proyecto. Una de ellas consistiría en ampliar la gama de medios de cultivo cuyo pH puede ser estimado por el sistema de medida, puesto que el sistema actual está pensado únicamente para monitorizar el pH de medio DMEM. Por ejemplo, uno de los medios más utilizados en experimentación en cardiología es el medio Claycomb, por lo que se podría actualizar el sistema calculando e incorporando al sistema la curva de calibración correspondiente a este medio, de la misma manera que se procedió para obtener la del medio DMEM, descrita en el Capítulo 5 de Resultados.

Otra futura línea de actualización del equipo sería ampliar el sistema de intercambio de medio, en concreto replicar la bomba de inyección desarrollada en el presente proyecto y aumentar el número de bombas peristálticas, con el objetivo de construir un array de bombas (tanto de inyección como de retirada de medio) que permitan la renovación del medio de varios pocillos simultáneamente, ahorrando de esta forma una gran cantidad de tiempo de experimentación a los investigadores. También este array permitiría introducir de manera automática y secuencial los distintos medios (ricos en unos factores de crecimiento específicos u otros para la diferenciación de las células en cardiomiocitos) que se deben administrar a las células del cultivo cada cierto período de tiempo para que éstas puedan formar tejido cardíaco.

También se debería trabajar en el desarrollo de un sistema que permitiese mantener refrigerado el medio de cultivo en todo momento durante el experimento.

Por último, debería realizarse una comprobación de que el biorreactor desarrollado reproduce adecuadamente las condiciones para las que fue diseñado en un ambiente real de laboratorio de investigación, dentro del incubador y con la presencia de células en la placa Petri.



## 7. CONCLUSIONES

En el presente proyecto se ha desarrollado un biorreactor cuyo objetivo es mantener bajo control las condiciones óptimas de cultivo haciendo uso de un sistema automático de intercambio del medio, y especialmente dirigido a cultivos de células cardiomiogénicas para aplicaciones de Ingeniería Tisular Cardíaca.

Para ello se ha diseñado y fabricado mediante impresión 3D un sistema que realice la función de cambiar el medio, basado en la interacción de una bomba peristáltica para la retirada del medio y otra de inyección para la administración del medio. También se ha incorporado un módulo de monitorización continua del pH basado en una tecnología innovadora, un sensor óptico capaz de obtener el pH a partir de las componentes de color RGB del medio de cultivo, con el propósito de disponer de un indicador que asegure con mayor certeza que el medio debe renovarse porque se encuentra en malas condiciones. Además, se ha programado el microcontrolador del sistema con el objetivo de que éste pueda trabajar tanto de manera manual como automática, se ha incorporado una red basada en el protocolo Zigbee para establecer una comunicación inalámbrica con el PC y con ello eliminar cableado sobrante en el laboratorio y finalmente se ha programado una interfaz gráfica de usuario para optimizar la usabilidad del sistema y hacer más intuitivo el proceso de monitorización y control del sistema.

Una vez implementado y programado el biorreactor, para ambos módulos se han calculado las curvas de calibración correspondientes bajo condiciones controladas y se ha comprobado el correcto funcionamiento del sistema en conjunto bajo dichas condiciones, proporcionando los resultados esperados en el presente proyecto. Se ha logrado finalmente disponer de un equipo con características muy satisfactorias: una elevada precisión de administración de volumen (del orden de 1  $\mu$ l) y un error de medida de pH dentro del intervalo de confianza  $0.1525 \pm 0.0914$ , error que resulta más que asumible teniendo en cuenta las necesidades y objetivo del sistema.

Por último, el biorreactor desarrollado se ha instalado en el laboratorio de investigación biomédica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, donde está siendo utilizado en experimentos de Ingeniería Tisular Cardíaca. El uso de este equipo garantiza un mayor control de las condiciones de cultivo, y por consiguiente de la supervivencia celular, al mejorar la eficacia del proceso de intercambio de medio.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barile L, Chimenti I, Gaetani R, et al. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007; 4:9–14.
2. Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, et al. Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann Biomed Eng.* 2003; 31:1017-30.
3. Bashir R. Micromechanical cantilever as an ultrasensitive pH microsensor. *Appl Phys Lett.* 2002;81:3091–3.
4. Bilodeau K, Mantovani D. Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Eng.* 2006;12:2367-83.
5. Bursac N, Loo Y, Tung L, et al. Novel anisotropic engineered cardiac tissues: Studies of electrical propagation. *Bioch Biophys Res Comm.* 2007;361:847-853.
6. Butler M. *Animal cell culture and technology.* Ed: BIOS Scientific Publishers, 2004.
7. Canver CC, Chanda J. Heart transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2001; 72:658 – 660.
8. Carrier RL, Rupnick M, Langer R, et al. Effects of oxygen on engineered cardiac muscle. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 78:617- 625.
9. Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2007; 100:263.
10. Catapano G. Mass transfer limitations to the performance of membrane bioartificial liver support devices. *Int J Artif Organs.* 1996; 19:18-35
11. Cemal H, Kadriye E, Berrin Y, Engin C. Optical pH sensor based on spectral response of newly synthesized Schiff bases. *Dyes Pigm.* 2004;62:35–44.
12. Costello J, Nyatanga B, Mula C, Hull J. Benefits and drawbacks of syringe driver in palliative care. *International Journal of Palliative Nursing.* 2008; 14 :139-144.
13. Cui Y, Wei Q, Park H, Lieber C. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science.* 2001;293:1289–92.
14. Dai W, Hale SL, Martin BJ, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation.* 2005; 112: 214–23.
15. Darfler F. A protein-free medium for the growth of hybridomas and other cells of the immune system. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990;26:769-78.
16. Dawson E, Mapili G, Erickson K, et al. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:215-28.
17. Domenech M, Polo L, Ramirez-Vick J, Freytes DO. Tissue Engineering Strategies for Myocardial Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016; 937:775-5044.
18. Freed LE, Guilak F, Guo XE, et al. Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. *Tissue Eng.* 2006;12:3285-305.
19. Freshney RI. *Animal cell culture: a practical approach.* Ed: IRL PRESS. 1986.
20. Finosh GT, Jayabalan M. Regenerative therapy and tissue engineering for the treatment of end-stage cardiac failure. *Biomatter.* 2012; 2:14-1.
21. Fisher MB, Mauck RL. Tissue Engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19:13-1.
22. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007; 100:1249-60.
23. Hall JE, Guyton AC. *Tratado de fisiología médica.* Ed: Elsevier Saunders. 2011;12:252-249.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

24. Houtgraaf, JH, den Dekker WK, van Dalen BM, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59:540-539.
25. Huang GF, Guo MK. Resting dental plaque pH values after repeated measurements at different sites in the oral cavity. *Proc Natl Sci Counc (ROC) B.* 2000;24:187-92.
26. Irving MJ, Irving RJ, Sutherland S, Graseby MS16A and MS26 syringe drivers: reported effectiveness of an online learning programme. *Inter J of Palliat Nurs.* 2007;13:62-56.
27. Kelly JF. *3D Printing: Build your own 3D printer and print your own 3D objects.* Ed. Pearson Education, Inc. 2013. pp: 16-3.
28. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7:430-6.
29. Kofidis T, Lenz A, Boublik J, et al. Pulsatile perfusion and cardiomyocyte viability in a solid three-dimensional matrix. *Biomaterials.* 2003; 24:5014-5009.
30. Laria A, Lurati AM, Re KA, et al. User preference for a portable syringe pump for iloprost infusion. *Dove Press Jour.* 2015;6 :144-139.
31. Larsen GY, Parker HB, Cash J, et al. Standard drug concentrations and smart-pump technology reduce continuous-medication-infusion errors in pediatric patients. *Pediatrics.* 2005;116:21-5.
32. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA, et al. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tiss Eng Part B: Rev.* 2008;14:86-61.
33. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al. Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation.* 2000; 102: 61-56.
34. Li CL, Huang BR, Chattopadhyay S, et al. Amorphous boron carbon nitride as a pH sensor. *Appl Phys Lett.* 2004;84:2676-8.
35. Lipson H, Kurman M. *Fabricated: The new world of 3D printing.* Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2013. pp: 20-8.
36. Lu WN, Lü SH, Wang HB, et al. Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15: 1437-47.
37. Mariani E, Mariani AR, Monaco MC, et al. Commercial serum-free media: hybridoma growth and monoclonal antibody production. *J Immunol Methods.* 1991;145:175-83.
38. Martin I, Smith T, Wendt D. Bioreactor-base roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products. *Trends Biotechnol.* 2009; 27:502-495.
39. Martínez-Ramos C, Rodríguez-Pérez E, Garnes MP, et al. Design and assembly procedures for large-sized biohybrid scaffolds as patches for myocardial infarct. 2014;20:817-27.
40. Masters JR, Stacey GN. Changing medium and passaging cell lines. *Nature Protocol.* 2007;2:2276-84
41. Mertsching H, Hansmann J. Bioreactor technology in cardiovascular tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009;112:29-37.
42. Mireles J, Espalin D, Roberson D, et al. Fused deposition modeling of metals. 2012; 837-836.
43. Mukoreka J, Sisay I. Safe practice in syringe pump management. *Nursing Times.* 2015;14:19-21.
44. Müller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34:107-16.
45. Murry CE, Field LJ, Menasché P. Cell- based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation.* 2005; 15; 112: 3174-83.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

46. Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008;118:506-498.
47. Nugent HM, Edelman ER. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ Res*. 2003;92:1078-1068.
48. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*. 2007; 21:1345-21.
49. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008; 14 :213–21.
50. Pascual-Gil S, Garbayo E, Díaz-Herráez P, et al. Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials. *J Control Release*. 2015; 203:28-23.
51. Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008; 453: 329-322.
52. Perlman D. Use of antibiotics in cell culture media. *Methods Enzymol*. 1979;58:110-6.
53. Pok S, Jacot JG. Biomaterials advances in patches for congenital heart defect repair. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011; 4:654-646.
54. Radisic M, Park H, Shing H, et al. From the cover: functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *PNAS*. 2004; 101:18129-32.
55. Ratcliffe A, Niklason LE. Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;961:210-5.
56. Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, et al. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol*. 2000;149:731–40
57. Rizzino A, Rizzino H, Sato G. Defined media and the determination of nutritional and hormonal requirements of mammalian cells in culture. *Nutrit Rev*. 1979; 37:378-369
58. Ruan C, Zeng K, Grimes CA. A mass-sensitive pH sensor based on a stimuli–responsive polymer. *Anal Chim Acta*. 2003;497:123–31.
59. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res*. 2002; 90:e40.
60. Smits AM, van Vliet P, Metz CH, et al. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nat Protoc*. 2009; 4:232–43.
61. Stoll T, Muhlethaler K, von Stockar U, Marison IW. Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production. *J Biotechnol*. 1996;45:111-23.
62. Pilipovic A, Surma R, Sercer M. Designing and production of polymer product with fused deposition modeling-Case Study. *CIM2015*. 2015;2-1.
63. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131:861–72.
64. Tandon N, Marsano A, Vunjak-Novakovic G, et al. Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation. *Lab Chip*. 2010;10:700-692.
65. Tawfik A et al. Portable system of programable syringe pump with potentiometer for determination of promethazine in pharmaceutical applications. *Saud Pharmac Jour*. 2012;20;160-155.
66. Virag JA, Rolle ML, Reece J, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. *Am J Pathol.* 2007; 171:1431–40.
67. Vukasinovic J, Cullen DK, LaPlaca MC, Glezer A. A microperfused incubator for tissue mimetic 3D cultures. *Biomed Microdevices.* 2009;11:1155-65.
  68. Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Radisic M, et al. Challenges in cardiac tissue engineering. 2010; 16:169-87.
  69. Vunjak-Novakovic G, Scadden DT. Biomimetic platforms for human stem cell research. *Cell Stem Cell.* 2011; 8:252-261.
  70. Wendt D, Riboldi SA, Cioffi M, Martin I. Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing. *Adv Matter.* 2009;21:3352-67.
  71. Xu J, Sun X, Liu B, Xu F. Poly-m-phenylenediamine modified electrode as a pH sensor. *Anal Sci.* 2001;17:1363–5.
  72. Yao S, Wang M, Madou M. A pH electrode based on melt-oxidized iridium oxide. *J Electrochem Soc.* 2001;148:36-29.
  73. Ye KY, Black LD. Strategies for tissue engineering cardiac constructs to affect functional repair following myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011; 4: 575-91.
  74. Zimmermann WH, Cesnjevar R. Cardiac tissue engineering: implications for pediatric heart surgery. *Pediatr Cardiol.* 2009; 30:716–23.
  75. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, et al. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med.* 2006;12:452–8.

## ANEXO I. ESQUEMAS ELÉCTRICOS

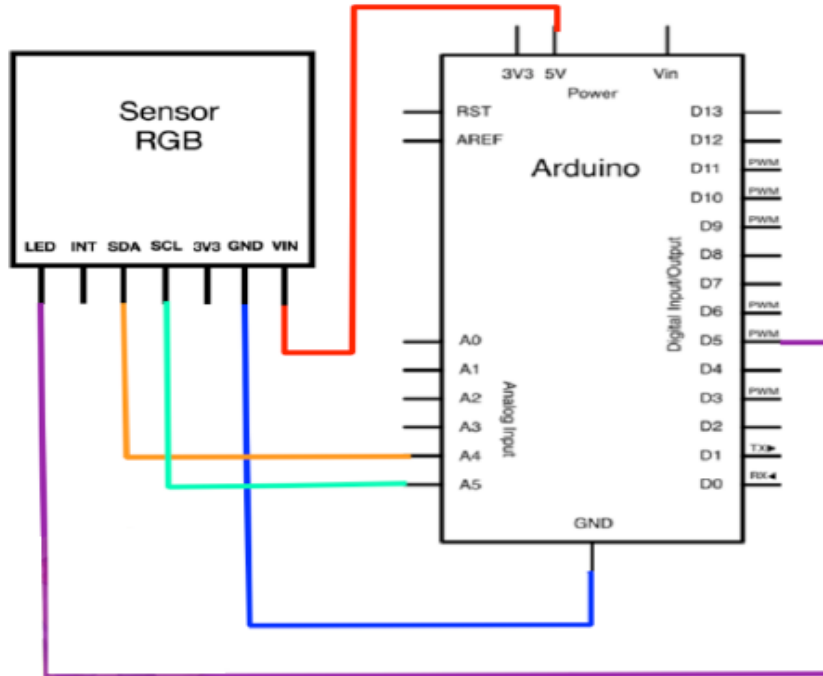


Figura 53. Conexión del sensor de color RGB a Arduino Uno. Éste permanece alimentado a 5V y la comunicación serie con Arduino se establece a través de los pines SDA y SCL (pines analógicos 4 y 5 de Arduino). El LED se controla a través del pin digital 5.

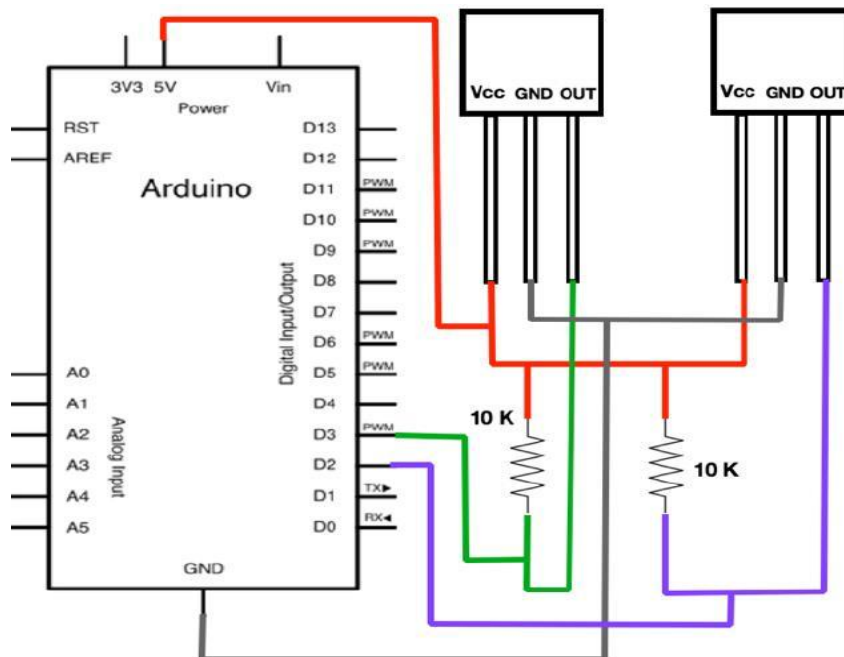


Figura 54. Conexión de los sensores de efecto Hall a Arduino Uno. Éstos permanecen alimentados a 5V y entre el pin de alimentación y el de su respectiva salida digital se incorpora una resistencia de 10 kΩ. La salida digital del sensor Hall superior está conectada al pin 2 de Arduino y la del inferior al pin 3.

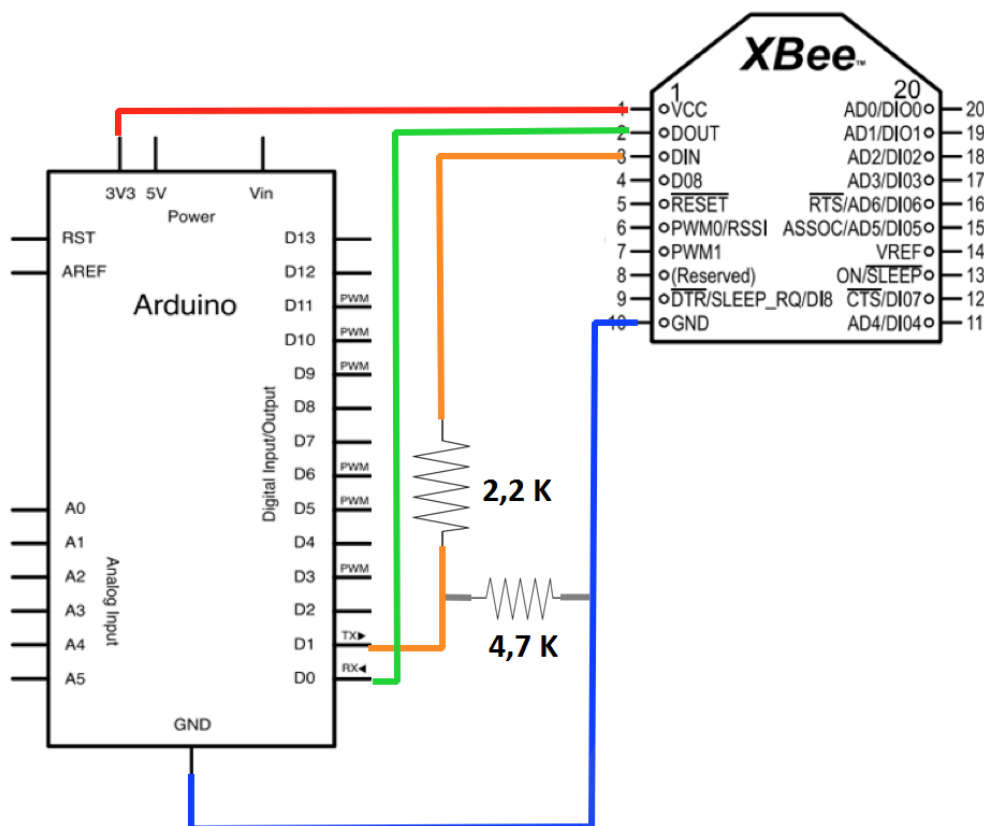


Figura 55. Conexión del módulo Xbee a Arduino Uno. Éste permanece alimentado a 3.3V. El puerto de transmisión de datos de Arduino (TX, pin D1) permanece conectado al puerto recepción de datos del Xbee (DIN, pin 3). Asimismo, el puerto de recepción de datos de Arduino (RX, pin D0) permanece conectado al puerto transmisión de datos del Xbee (DOUT, pin 2).

Cabe destacar que fue necesario adaptar los valores de tensión proporcionados por Arduino a los valores admisibles por el Xbee. Para ello se implementó un divisor de tensión (véase Figura 56) con una resistencia de 2,2 k $\Omega$  y otra de 4,7 k $\Omega$  que transforma los 5V proporcionados por el microcontrolador en 3.3V con el objetivo de alimentar al Xbee.

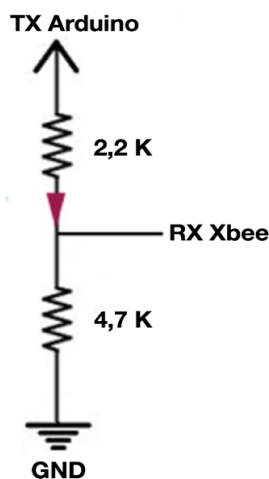
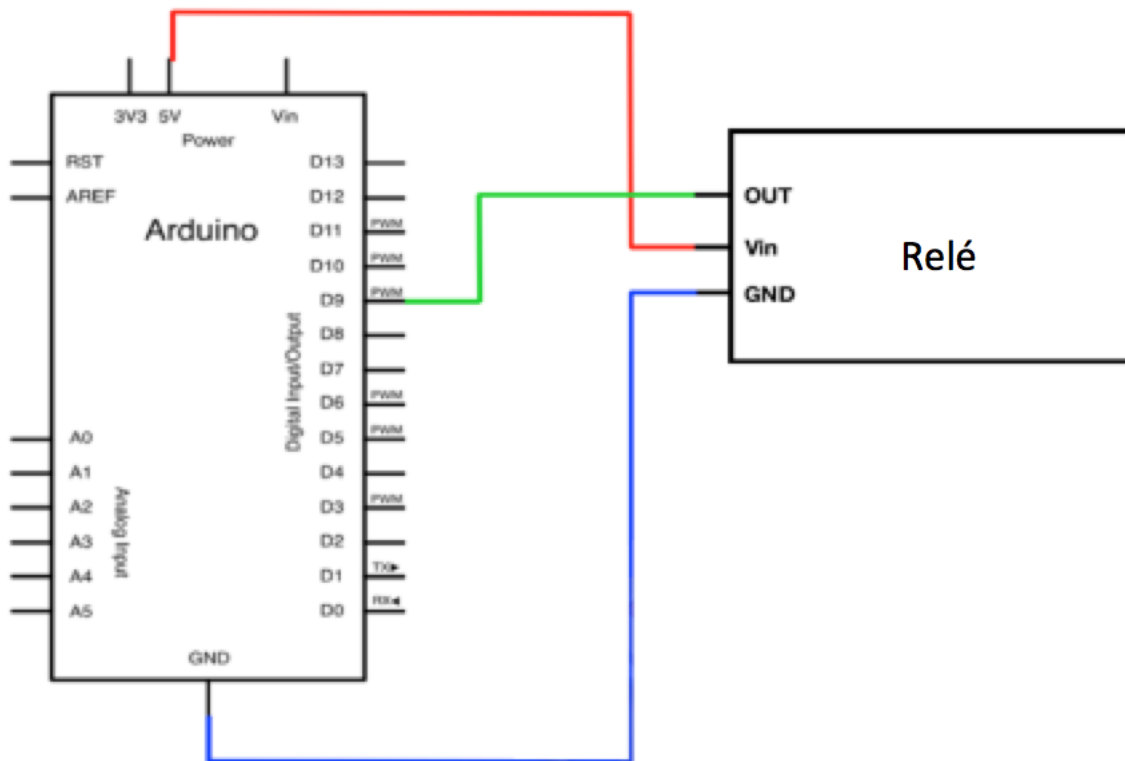


Figura 56. Divisor de tensión de ajuste de niveles de salida del microcontrolador.





**Figura 57. Conexión del relé a Arduino Uno. Éste permanece alimentado a 5V y su salida digital está conectada al pin digital 9 de Arduino. Al extremo opuesto de donde se sitúan los pines del relé va conectado el motor de continua de la bomba peristáltica.**



## ANEXO II. CÓDIGO ARDUINO

```

BOMBA § Color Comunicacion Motor Peristaltica Temporizaciones sensor_RGB
#include <Wire.h> //declaracion de la libreria para bus I2C
#include <EEPROM.h> //declaracion libreria memoria EEPROM Arduino
#include "Adafruit_TCS34725.h" //declaracion libreria sensor de color RGB
#include <Adafruit_MotorShield.h> //declaracion libreria driver motor
#include "utility/Adafruit_PWMServoDriver.h"

Adafruit_TCS34725 tcs = Adafruit_TCS34725(TCS34725_INTEGRATIONTIME_700MS, TCS34725_GAIN_1X); //declaracion del sensor de color con un tiempo de integracion 700 ms y ganancia de 1X
Adafruit_MotorShield AFMS = Adafruit_MotorShield(); //declaracion de la shield motor
Adafruit_StepperMotor *myStepper = AFMS.getStepper(200, 2); //declaracion del motor paso a paso (200 pasos/rev) en el puerto 2
Adafruit_DCMotor *myMotor = AFMS.getMotor(1); //declaracion del motor de continua en el puerto 1

//Declaracion de variables de comunicacion
String inputString = ""; //Inicializacion de la variable que recibira el string procedente del puerto serie principal
boolean stringComplete = false;

//Declaracion variables temporizacion
unsigned long previousMillis_1 = 0;
unsigned long previousMillis_2 = 0;
unsigned long previousMillis_3 = 0;
unsigned long previousMillis_4 = 0;
unsigned long previousMillis_5 = 0;
unsigned long currentMillis_2;
unsigned long interval3;
unsigned long interval2=20000; //Por defecto la duracion de la bomba peristaltica es de 20 s

//Declaracion variables motor paso a paso
float volumen;
float volumen_actual;
String vol_aut="100"; //Por defecto el volumen a inyectar en modo automatico es de 1 ml
int sentido;
int pasos;
int cont=0;
float posicion;
float posicion_actual;
boolean flagMotor = LOW;

//Declaracion variables sensor efecto Hall
const int hallPin = 2; // sensor Hall superior
const int hallPin2 = 3; // sensor Hall inferior
boolean Fsup = HIGH, Finf = HIGH;

//Declaracion variables sensor color RGB
float ph_final;
uint16_t cal_r,cal_g,cal_b;
uint16_t r, g, b, c, colorTemp, lux;
uint16_t g_buena;
int diff_r, diff_g, diff_b;
int media_r,media_g,media_b;
float ph;
float ph_change;
int temp;
float media_ph;
float ph_bueno;
float sum_ph;
int i=0;
float color_r;
float color_g;
float color_b;
int medio;
int contador=0;

```

```

boolean flagColor;

//Declaracion variables bomba
boolean flagBomba = LOW;
int duracion;

//Declaracion variables automaticidad
boolean flagAUTO = LOW;

void setup() {
    Serial.begin(9600); //se establece la comunicacion serie a 9600 baudios

    AFMS.begin(); // se inicializan los motores
    myStepper->setSpeed(100); //se establece la velocidad del motor paso a paso
    myMotor->run(FORWARD); //se establece el sentido del motor de continua de la bomba peristaltica
    myMotor->setSpeed(0); //se establece la velocidad del motor de continua, por defecto, 0

    tcs.begin(); //se inicializa el sensor de color RGB

    pinMode(5,OUTPUT); //declaracion del pin para controlar la intensidad del LED
    digitalWrite(5,LOW); //LED apagado: por defecto, el LED estara apagado, solo se enchufa para lectura

    pinMode(9,OUTPUT); /// declaracion del pin de salida del rele

    pinMode(hallPin, INPUT); //declaracion del pin de salida del sensor de efecto Hall superior
    pinMode(hallPin2, INPUT); //declaracion del pin de salida del sensor de efecto Hall superior

    cal_r=EEPROM.read(0)*256+EEPROM.read(1); //se lee el valor de calibracion de la componente R de la memoria EEPROM
    cal_g=EEPROM.read(2)*256+EEPROM.read(3); //se lee el valor de calibracion de la componente G de la memoria EEPROM
    cal_b=EEPROM.read(4)*256+EEPROM.read(5); //se lee el valor de calibracion de la componente B de la memoria EEPROM
}

void loop() {
    moverMotor();
    if(flagAUTO==HIGH){temporizacion();} //entrara cuando se active el modo automatico
    if(flagAUTO==HIGH){temporizacion3();} //entrara cuando se active el modo automatico
    if(flagBomba==HIGH){temporizacion2();} //entrara cuando se active la bomba peristaltica
    temporizacion4(); //se ejecuta continuamente

    if (stringComplete){ //Entrara cuando haya leído un string por puerto serie
        stringComplete = false;
        if (inputString.startsWith("VOL")){inicializarMotor(inputString.substring(3,7));inputString = "";} //trama que inicializa el motor paso a paso e indica cantidad de volumen
        if (inputString.startsWith("STP")){pararMotor();inputString = "";} //trama que detiene el motor paso a paso
        if (inputString.startsWith("RST")){resetearMotor();inputString = "";} //trama que resetea el motor paso a paso a su posicion inicial
        if (inputString.startsWith("CAL")){calibracion();inputString = "";} //trama para calibrar el sensor de color
        if (inputString.startsWith("SEN")){leer_ph();inputString = "";} //trama que indica al sensor de color que empiece a tomar medidas
        if (inputString.startsWith("CHG")){ph_change=(inputString.substring(3,5)).toInt();inputString = "";ph_change=ph_change/10;} //trama que indica valor umbral de pH a partir
        if (inputString.startsWith("BOM")){bomba();inputString = "";} //trama que inicializa la bomba peristáltica en modo automatico
        if (inputString.startsWith("BMN")){duracion=inputString.substring(3,10).toInt();bombaMan(duracion);inputString = "";} //trama que inicializa la bomba peristáltica en modo
        if (inputString.startsWith("STB")){stopBomba();inputString = "";} //trama que detiene la bomba peristáltica en modo manual
        if (inputString.startsWith("VAL")){vol_aut=(inputString.substring(3,6));inputString = "";} //trama que indica valor de volumen a inyectar en modo automatico
        if (inputString.startsWith("IN2")){interval2=(inputString.substring(3,10)).toInt();inputString = "";} //trama que indica cuanto tiempo tiene que estar retirando medio la
        if (inputString.startsWith("IN3")){interval3=(inputString.substring(3,10)).toInt();inputString = "";} //trama que indica cada cuanto tiempo se mide el pH
        if (inputString.startsWith("COL")){color();inputString = "";} //trama que muestra el color del medio
        if (inputString.startsWith("MED")){medio=(inputString.substring(3,4)).toInt();inputString = "";} //trama que selecciona el medio de cultivo a medir
        if (inputString.startsWith("AUT")){automatico();inputString = "";} //trama que especifica que el sistema trabaja en modo automatico
        if (inputString.startsWith("MAN")){manual();inputString = "";} //trama que especifica que el sistema trabaja en modo manual
        stringComplete = false;
    }

    void serialEvent(){// funcion que detecta un evento en el puerto serie principal

        while (Serial.available()){
            char inChar = (char)Serial.read();
            if (inChar == '\n') { //Si es el caracter de final marco que he terminado de leer
                stringComplete = true;
            }
            else {inputString += inChar;} //Si no es el caracter de final, entonces añafÃ±ado caracteres al string
        }
    }
}

```

Figura 58. Bloque "BOMBA" del código. Se trata del bloque principal del código, donde están definidas todas las librerías y las variables utilizadas en el programa. También es donde se encuentran las dos funciones propias del firmware de Arduino: setup() y loop(). La primera solo se ejecuta cada vez que se arranca Arduino y la segunda se ejecuta continuamente.

ANEXO II

BOMBA S	Color	Comunicacion	Motor	Peristaltica	Temporizaciones	sensor_RGB
---------	-------	--------------	-------	--------------	-----------------	------------

```

void color(){
flagColor = HIGH;
digitalWrite(5,HIGH); //se enciende la luz LED para leer
delay(2000);

int sum_r = 0;
int sum_g = 0;
int sum_b = 0;

for (int temp=0; temp<=9; temp++){ //se toman 10 medidas RGB
tcs.getRawData(&r, &g, &b, &c); //funcion de la libreria del sensor que devuelve las componentes RGB
colorTemp = tcs.calculateColorTemperature(r, g, b); //funcion de la libreria del sensor que devuelve la temperatura de color
lux = tcs.calculateLux(r, g, b); //funcion de la libreria del sensor que devuelve los lumens

diff_r=r-cal_r; //se resta el valor de calibracion R al valor de R obtenido en cada medida para sustraer color de fondo
diff_g=g-cal_g; //se resta el valor de calibracion G al valor de obtenido en cada medida para sustraer color de fondo
diff_b=b-cal_b; //se resta el valor de calibracion B al valor de B obtenido en cada medida para sustraer color de fondo

sum_r=sum_r+diff_r; //la diferencia obtenida (valor R puro) se va acumulando en una variable
sum_g=sum_g+diff_g; //la diferencia obtenida (valor G puro) se va acumulando en una variable
sum_b=sum_b+diff_b; //la diferencia obtenida (valor B puro) se va acumulando en una variable
}

media_r=sum_r/10; //se calcula la media de las 10 medidas de R para eliminar posibles datos anómalos
media_g=sum_g/10; //se calcula la media de las 10 medidas de G para eliminar posibles datos anómalos
media_b=sum_b/10; //se calcula la media de las 10 medidas de B para eliminar posibles datos anómalos

if (media_r<=0){ //para eliminar los posibles valores negativos al realizar la sustraccion
media_r=0; //los valores negativos saturarlos a 0
}
else {
media_r=sum_r/10;
}

if (media_g<=0){ //para eliminar los posibles valores negativos al realizar la sustraccion
media_g=0; //los valores negativos saturarlos a 0
}
else {
media_g=sum_g/10;
}

if (media_b<=0){ //para eliminar los posibles valores negativos al realizar la sustraccion
media_b=0; //los valores negativos saturarlos a 0
}
else {
media_b=sum_b/10;
}

int val1=max(media_r,media_g); //se calcula valor maximo de las componentes RGB
int val_max=max(val1,media_b);

color_r=map(media_r,0,val_max,0,1000); //se realiza una normalizacion
color_g=map(media_g,0,val_max,0,1000);
color_b=map(media_b,0,val_max,0,1000);

color_r=abs(color_r/1000); //
color_g=abs(color_g/1000);
color_b=abs(color_b/1000);

digitalWrite(5,LOW); //se apaga la luz LED tras la lectura
}
    
```

Figura 59. Bloque "Color" del código. Se trata de la sección donde está definida la función encargada de obtener el color del medio de cultivo.

BOMBA S	Color	Comunicacion	Motor	Peristaltica	Temporizaciones	sensor_RGB
---------	-------	--------------	-------	--------------	-----------------	------------

```

void enviarDatos(){
delay(100);
if (flagAUTO==LOW){
Serial.print("PHM"); //Envio por serie el valor de pH obtenido en modo manual para ser mostrado en MATLAB
Serial.println(ph,2);
}
if (flagAUTO==HIGH){
Serial.print("PHA"); //Envio por serie el valor de pH en modo automatico para ser mostrado en MATLAB
Serial.println(ph_bueno,2);
}
if (digitalRead(2)==LOW){
Serial.print("RST"); //Envio por serie un mensaje de aviso para ser mostrado en MATLAB
Serial.println("Rellenar jeringuilla, liquido agotado. Pulsar boton RESET");
}
if (digitalRead(3)==LOW){
Serial.print("LIS"); //Envio por serie un mensaje de aviso para ser mostrado en MATLAB
Serial.println("Jeringuilla llena. Bomba lista para inyectar!!");
}
if (flagMotor==HIGH){
Serial.print("INY"); //Envio por serie un mensaje de aviso para ser mostrado en MATLAB
Serial.println("Inyectando volumen deseado...");
}

Serial.print("VOL"); //Envio por serie el valor de volumen restante para ser mostrado en MATLAB
Serial.println(volumen_actual);
Serial.print("POS"); //Envio por serie la posicion actual de la bomba para ser mostrada en MATLAB
Serial.println(posicion_actual);

if (flagColor==HIGH){
Serial.print("COLR"); //Envio por serie el valor de la componente roja para ser mostrada en MATLAB
Serial.println(color_r*1000);
}
if (flagColor==HIGH){
Serial.print("COLG"); //Envio por serie el valor de la componente verde para ser mostrada en MATLAB
Serial.println(color_g*1000);
}
if (flagColor==HIGH){
Serial.print("COLB"); //Envio por serie el valor de la componente azul para ser mostrada en MATLAB
Serial.println(color_b*1000);
}
delay(100);
}

void automatico(){
flagAUTO=HIGH; //se activa modo automatico
}

void manual(){
flagAUTO=LOW; //se activa modo manual
}
    
```

Figura 60. Bloque "Comunicación" del código. Se trata de la sección donde está definida la función encargada de enviar los datos a través del puerto serie al PC para ser mostrado en el GUI.

```

BOMBA  Color  Comunicacion  Motor  Peristaltica  Temporizaciones  sensor_RGB
void inicializarMotor(String inputString){
flagMotor = HIGH; //se activa el motor paso a paso
sentido = inputString.substring(0,1).toInt(); //el valor del sentido contenido en la trama se guarda en la variable sentido: 0 hacia delante o 1 hacia detrás
volumen = inputString.substring(1,5).toInt(); //el valor de volumen contenido en la trama se guarda en la variable volumen
volumen = volumen/100;
pasos = (volumen*0.0239)/0.0012; //ecuacion de la recta dada por la curva de calibracion tras ajuste lineal que calcula el numero de pasos correspondientes a un volumen determinado
if (volumen_actual<0){ //para calcular el volumen restante en la jeringa tras inyectar el deseado
volumen=0;}
else{
volumen_actual=volumen_actual-volumen;
}
}

void moverMotor(){
if (flagMotor == HIGH){ //el motor paso a paso se mueve si se ha enviado la trama que lo activa

if (digitalRead(2)==HIGH){ //si el sensor de efecto Hall superior esta en estado alto (no campo magnetico cerca)
if (sentido == 0){
myStepper->step(1, FORWARD, DOUBLE); //mover el motor se mueve hacia delante
Finf=HIGH;
}
}
if (digitalRead(3)==HIGH){ //si el sensor de efecto Hall inferior esta en estado alto (no campo magnetico cerca)
if (sentido == 1){
myStepper->step(1, BACKWARD, DOUBLE); // el motor se mueve hacia detras
Fsup=HIGH;
}
}
}
pasos = pasos - 1; //el motor se mueve los pasos indicados por la trama hasta llegar a 0
cont = cont + 1;
posicion=((cont/200)*1.25)/10; //ecuacion que calcula la posicion de la bomba (en cm) teniendo en cuenta que 1 paso equivalen a 1,25 mm

void pararMotor (){
flagMotor = LOW; //se detiene el motor paso a paso
}

void resetearMotor (){
flagMotor = HIGH;
while ((digitalRead(3)==HIGH)){ //mientras que el sensor de efecto Hall inferior este en estado alto
myStepper->step(1,BACKWARD,DOUBLE); //mover el motor hacia detras hasta su posicion inicial
}
Finf = LOW; //el sensor de efecto Hall inferior esta en estado bajo
Fsup = HIGH; //el sensor de efecto Hall superior esta en estado alto
posicion_actual=0; //se reinicia la posicion inicial de la bomba a 0 cm
cont=0;
volumen_actual=10; //se reinicia el volumen total de la jeringa a 10 ml
}

```

Figura 61. Bloque "Motor" del código. Se trata de la sección en la que están definidas las funciones encargadas de controlar el motor paso a paso que mueve la bomba de inyección.

```

BOMBA  Color  Comunicacion  Motor  Peristaltica  Temporizaciones  sensor_RGB
void bomba(){
flagBomba=HIGH; //la bomba peristaltica se activa
digitalWrite(9,HIGH); //rele se pone a nivel alto (interruptor cerrado y pasa corriente)
previousMillis_2=millis();
}

void stopBomba(){
digitalWrite(9,LOW); //rele se pone a nivel bajo (interruptor abierto y no pasa corriente)
delay(100);
}

void bombaMan(int dur){
digitalWrite(9,HIGH); //rele se pone a nivel alto (interruptor cerrado y pasa corriente)
delay(dur); //el motor de la bomba se mueve durante el tiempo indicador por "dur"
digitalWrite(9,LOW); //pasado este tiempo se detiene el motor al poner el rele a nivel bajo
delay(100);
}

```

Figura 62. Bloque "Peristáltica" del código. Se trata de la sección en la que están definidas las funciones encargadas de controlar el motor de continua de la bomba peristáltica.

BOMBA	Color	Comunicacion	Motor	Peristaltica	Temporizaciones	sensor_RGB
-------	-------	--------------	-------	--------------	-----------------	------------

```

void temporizacionC(){
  unsigned long interval1 = 10000;
  unsigned long currentMillis_1 = millis(); //ms desde que se enchufa arduino

  if(currentMillis_1 - previousMillis_1 >= interval1) { //Cada tanto tiempo indicado por la variable interval1 se realizan las siguientes funciones
    previousMillis_1 = currentMillis_1;

    if (flagMotor == LOW && flagBomba==LOW){ //si las dos bombas no estan funcionando
      leer_ph(); //se toma una medida de ph del medio
      i=i+1;
      sum_ph=sum_ph+ph; //se van acumulando los valores de ph obtenidos
    }
  }
}

void temporizacion2C(){
  currentMillis_2= millis(); //ms desde que se enchufa arduino

  if(currentMillis_2 - previousMillis_2 >= interval2) { //Cada tanto tiempo indicado por la variable interval2 se realizan las siguientes funciones
    previousMillis_2 = currentMillis_2;

    digitalWrite(9,LOW); //el rele pasa a un nivel bajo
    flagBomba=LOW; //la bomba peristaltica se detiene
    inicializarMotor('0'+vol_aut); //a continuacion se activa el motor paso a paso q mueve la bomba de inyeccion para inyectar la cantidad de volumen fijada
    //por vol_aut en matlab
  }
}

void temporizacion3C(){
  unsigned long currentMillis_3 = millis(); //ms desde que se enchufa arduino

  if (flagMotor == LOW && flagBomba==LOW){
    if(currentMillis_3 - previousMillis_3 >= interval3) { //Cada tanto tiempo indicado por la variable interval se realizan las siguientes funciones
      previousMillis_3 = currentMillis_3;

      media_ph=sum_ph/i; //se calcula la media de los valores de ph que se han ido acumulando durante cierto tiempo

      if (media_ph<=ph_change){ //cuando la media de los pH calculados sea menor o igual que el pH deseado
        contador=contador + 1; //para evitar que la bomba cambie medio basandose en unico valor tomado, se declara contador. Si se cumple cumple que el pH es menor que el pH umbral
        //se suma 1
      }
      else{
        contador=0; //si no cumple esto, el contador vuelve a 0
      }

      if (contador==4){ //cuando el contador llegue a 4, es decir, se hayan medido 4 valores de pH por debajo del pH aceptable
        bomba(); //se ejecuta la funcion bomba que activa la bomba peristaltica para retirar el medio
        contador=0; //el contador se vuelve a poner a 0 para seguir monitorizando el ph
      }

      ph_bueno=media_ph; //el valor de ph que se muestra por pantalla en matlab es el correspondiente a la media de los ph calculados
      i=0;
      sum_ph=0;
      media_ph=0;
    }
  }
}

void temporizacion4C(){
  double interval4 = 20000; |
  unsigned long currentMillis_4 = millis(); //ms desde que se enchufa arduino

  if(currentMillis_4 - previousMillis_4 >= interval4) { //Cada tanto tiempo indicado por la variable interval se realizan las siguientes funciones
    previousMillis_4 = currentMillis_4;

    enviarDatos(); // se envian datos a matlab para ser mostrados
  }
}

```

**Figura 63. Bloque "Temporizaciones" del código. Se trata de la sección donde están definidas las diferentes temporizaciones que se ejecutan en el modo de funcionamiento automático del sistema.**



BOMBA	Color	Comunicacion	Motor	Peristaltica	Temporizaciones	sensor_RGB
-------	-------	--------------	-------	--------------	-----------------	------------

```

void leer_ph(){
digitalWrite(5,HIGH); //encender luz LED para leer
delay(1000);

tcs.getRawData(&r, &g, &b, &c); //funcion de la libreria del sensor que devuelve las componentes RGB
colorTemp = tcs.calculateColorTemperature(r, g, b);
lux = tcs.calculateLux(r, g, b);
delay(10);

if (medio==1){
  ph=(g-7753.2)/-255.03; //Curva de calibracion para DMEM para obtener pH en funcion de G
}

digitalWrite(5,LOW); //apagar luz LED tras lectura
}

void calibracion (){
  uint16_t r_acum = 0;
  uint16_t g_acum = 0;
  uint16_t b_acum = 0;
  int H_r,L_r,H_g,L_g,H_b,L_b;

digitalWrite(5,HIGH); // se enciende la luz LED
delay(2000);

  for (temp=0; temp<=9; temp++){ //se toman 10 medidas RGB sin pocillo encima
    tcs.getRawData(&r, &g, &b, &c); //funcion de la libreria del sensor que devuelve las componentes RGB

    r_acum=r_acum + r; //los valores de R obtenidos se van acumulando
    g_acum=g_acum + g; //los valores de G obtenidos se van acumulando
    b_acum=b_acum + b; //los valores de B obtenidos se van acumulando
  }

  cal_r=r_acum/10; //se calcula la media de las 10 medidas de R tomadas y el valor obtenido es el de calibracion que se resta para sustraer el ruido de fondo
  cal_g=g_acum/10; //se calcula la media de las 10 medidas de G tomadas y el valor obtenido es el de calibracion que se resta para sustraer el ruido de fondo
  cal_b=b_acum/10; //se calcula la media de las 10 medidas de B tomadas y el valor obtenido es el de calibracion que se resta para sustraer el ruido de fondo

  H_r=highByte(cal_r); //funcion que devuelve el byte mas significativo del valor cal_r para poder guardarlo en la memoria
  L_r=lowByte(cal_r); //funcion que devuelve el byte menos significativo del valor cal_r para poder guardarlo en la memoria
  H_g=highByte(cal_g); //funcion que devuelve el byte mas significativo del valor cal_g para poder guardarlo en la memoria
  L_g=lowByte(cal_g); //funcion que devuelve el byte menos significativo del valor cal_g para poder guardarlo en la memoria
  H_b=highByte(cal_b); //funcion que devuelve el byte mas significativo del valor cal_b para poder guardarlo en la memoria
  L_b=lowByte(cal_b); //funcion que devuelve el byte menos significativo del valor cal_b para poder guardarlo en la memoria

  EEPROM.write(0,H_r); //se escribe el byte mas significativo de cal_r en la direccion 0 de la memoria EEPROM
  EEPROM.write(1,L_r); //se escribe el byte menos significativo de cal_r en la direccion 0 de la memoria EEPROM
  EEPROM.write(2,H_g); //se escribe el byte mas significativo de cal_g en la direccion 0 de la memoria EEPROM
  EEPROM.write(3,L_g); //se escribe el byte menos significativo de cal_g en la direccion 0 de la memoria EEPROM
  EEPROM.write(4,H_b); //se escribe el byte mas significativo de cal_b en la direccion 0 de la memoria EEPROM
  EEPROM.write(5,L_b); //se escribe el byte menos significativo de cal_b en la direccion 0 de la memoria EEPROM

  digitalWrite(5,LOW); //se apaga la luz LED tras calibracion
}

```

**Figura 64. Bloque "Sensor\_RGB" del código. Se trata de la sección donde están definidas las funciones encargadas de calibrar el sensor de color y de medir el pH.**



## ANEXO III. TABLAS DE RESULTADOS

**Tabla 4. Volumen obtenido para los diferentes valores de pasos.**

Pasos	Volumen (ml)
1000	1.188
2000	2.302
3000	3.517
4000	4.543
5000	5.656
6000	6.932
7000	8.257
8000	9.261

ANEXO III

**Tabla 5. Valores de pH obtenidos con el pHímetro (pH de referencia), valores de pH obtenidos con el sistema (pH experimental) y error absoluto de cada medida.**

<b>Nº muestra</b>	<b>pH referencia</b>	<b>pH experimental</b>	<b>Error absoluto</b>
1	6	6.22	-0.2
2	6	6.08	-0.08
3	6	6.15	-0.15
4	6	5.89	0.11
5	6	6.03	-0.03
6	6	6.25	-0.25
7	6	6.19	-0.19
8	6	6.01	-0.01
9	6.5	6.33	0.17
10	6.5	6.49	0.01
11	6.5	6.24	0.26
12	6.5	6.39	0.11
13	6.5	6.69	-0.19
14	6.5	6.34	0.16
15	6.5	6.3	0.2
16	6.5	6.47	0.03
17	7	7.34	-0.34
18	7	7.01	-0.01
19	7	7.12	-0.12
20	7	7.2	-0.2
21	7	7.29	-0.29
22	7	6.75	0.25
23	7	7.09	-0.09
24	7	6.95	0.05
25	7.5	7.74	-0.24
26	7.5	7.71	-0.21
27	7.5	7.69	-0.19
28	7.5	7.68	-0.18
29	7.5	7.8	-0.3
30	7.5	7.71	-0.21
31	7.5	7.59	-0.09
32	7.5	7.57	-0.07
33	8	8.05	-0.05
34	8	8.26	-0.26
35	8	7.9	0.1
36	8	8.21	-0.21
37	8	8.21	-0.21
38	8	8.1	-0.1
39	8	8.16	-0.16
40	8	8	0

**Tabla 6. Error absoluto medio y desviación típica para cada nivel de pH.**

<b>pH</b>	<b> Error absoluto medio </b>	<b>Desviación típica (s)</b>
<b>6</b>	0.13	0.087668206
<b>6.5</b>	0.14125	0.085929789
<b>7</b>	0.16875	0.11921619
<b>7.5</b>	0.18625	0.075391834
<b>8</b>	0.13625	0.088952234
<b>MEDIA</b>	0.1525	0.0914



# PRESUPUESTO

---

*DOCUMENTO II*



# ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PLANIFICACIÓN TEMPORAL</b> .....	<b>2</b>
<b>3. PRESUPUESTO</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1. Presupuesto desglosado por capítulos</b> .....	<b>4</b>
CAPÍTULO 1. HARDWARE BIORREACTOR .....	4
CAPÍTULO 2. SOFTWARE BIORREACTOR.....	6
CAPÍTULO 3. CALIBRACIONES DEL SISTEMA .....	6
<b>3.2. Presupuesto total del proyecto</b> .....	<b>7</b>





## OBJETIVO

### 1. OBJETIVO

En el presente documento se ha llevado a cabo una valoración económica del proyecto desarrollado, tanto a nivel de planificación/gestión del proyecto como presupuestaria. Esto se ha elaborado con el objetivo de proporcionar una visión aproximada del coste económico asociado a la fabricación de un biorreactor de este tipo, pues aunque en primera instancia éste se ha desarrollado exclusivamente para ser utilizado en el laboratorio de la unidad de investigación del Hospital Gregorio Marañón de Madrid, es susceptible de poder ser comercializado en un futuro.

En primer lugar se ha detallado la planificación temporal que se ha seguido en la elaboración del biorreactor y a continuación, en el presupuesto se han detallado los costes de maquinaria, materiales y mano de obra empleada en el desarrollo del mismo. Este último se encuentra dividido por los siguientes capítulos: hardware biorreactor, software biorreactor y calibraciones del sistema.

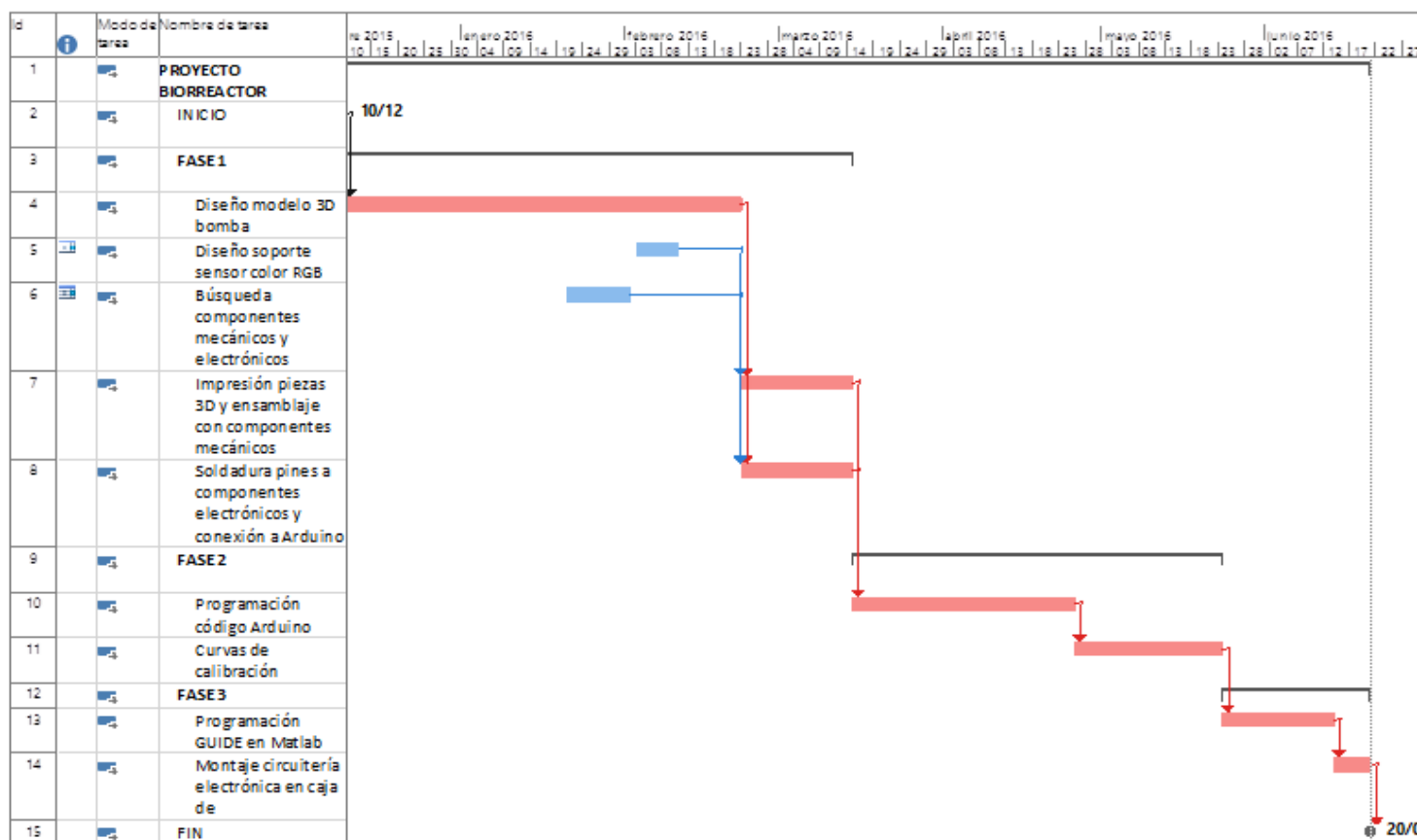


## 2. PLANIFICACIÓN TEMPORAL

La Tabla 1 recoge la duración de las diferentes tareas que se han llevado a cabo en el presente proyecto. Por otra parte, la Figura 1 muestra el Diagrama de Gantt del proyecto, realizado con la ayuda del programa MS Project 2016. En este se puede observar cuál ha sido la distribución de las tareas dentro del mismo, la duración de cada una y el camino crítico.

**Tabla 1. Tareas llevadas a cabo en el proyecto y duración de las mismas (en días).**

Nº TAREA	TAREA	DURACIÓN (días)
1	Diseño modelo 3D bomba	53
2	Diseño soporte sensor color RGB	6
3	Búsqueda componentes mecánicos y electrónicos	8
4	Impresión piezas y ensamblaje con componentes mecánicos	15
5	Soldadura pines y conexión a Arduino	15
6	Programación código Arduino	30
7	Curvas de calibración	20
8	Programación GUIDE en MATLAB	15
9	Montaje circuitería en caja de plástico ABS	5



**Figura 1. Diagrama de Gantt del proyecto. Las líneas negras indican la duración de cada fase y las tareas en rojo representan el camino crítico. En la parte izquierda de la figura se muestran las diferentes tareas del proyecto.**

PLANIFICACIÓN TEMPORAL

Cabe destacar que las tareas 4 y 5 se realizaron simultáneamente y éstas no dieron comienzo hasta que no se dieron por finalizadas las tareas 1, 2 y 3. Asimismo, la tarea 6 no comenzó hasta que no se dieron por finalizadas la 4 y la 5, la tarea 7 no comenzó hasta que la 6 no finalizó, la 8 no comenzó hasta que la 7 no se dio por finalizada y la 9 no se inició hasta que la 8 no estuvo terminada.

Además, la Figura 2 representa el diagrama temporal del proyecto más detalladamente. En esta se puede observar claramente la duración de cada una de las fases del proyecto así como la duración total del mismo. La duración de la Fase 1 ha sido de 68 días, la de la Fase 2 de 50 días y la de la Fase 3 de 20 días. Por último, el proyecto ha tenido una duración total de 138 días, con fecha de inicio el 10 de Diciembre de 2015 y fin el 20 de Junio de 2016.

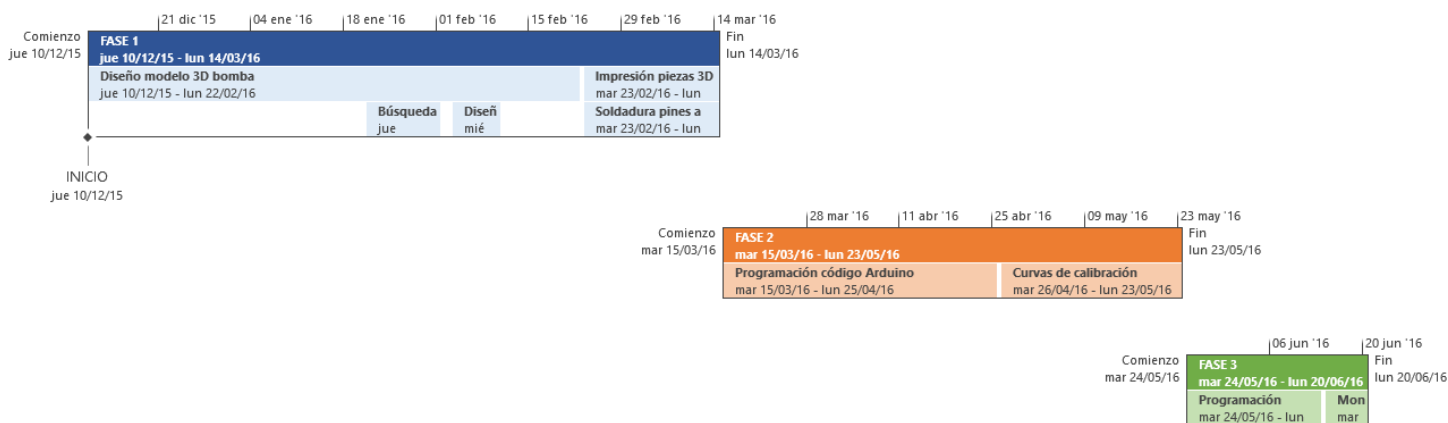


Figura 2. Escala de tiempo del proyecto. La gráfica azul muestra la duración de la Fase 1, la naranja la duración de la Fase 2 y la verde la duración de la Fase 3.

PRESUPUESTO

### 3. PRESUPUESTO

#### 3.1. Presupuesto desglosado por capítulos

##### CAPÍTULO 1. HARDWARE BIORREACTOR

##### 1. GASTOS DE EJECUCIÓN MATERIAL

Ud	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (€)	PRECIO TOTAL (€)	PROVEED.
kg	Filamento de PLA impresora 3D	1	19	19	Sicnova 3D
mm	Eje de acero de precisión M6 (100 mm)	2	1,57	3,14	eBay
u	Cojinete LM6UU	2	0,25	0,5	eBay
mm	Varilla roscada acero inoxidable M8 (100 mm)	1	0,336	0,336	eBay
u	Tuerca hexagonal M8	1	0,662	0,662	eBay
u	Imanes de Neodimio (5x1mm)	12	0,05	0,6	eBay
u	Stepper Motor	1	13,61	13,61	DigiKey
u	Tornillería varia 3M	1	1	1	Electrónica Gimeno
u	Tornillería varia 2M	1	1	1	Electrónica Gimeno
mm	Tubo vinilo diámetro 8 mm (30 mm)	1	0,06	0,06	eBay
u	Placa de polimetacrilato	4	3,63	14,52	eBay
u	Separador hexagonal	1	0,59	0,59	DigiKey
u	Bomba peristáltica 12 V	1	7,96	7,96	eBay
u	Fuente de alimentación 12V	1	47,44	47,44	Mouser
u	Arduino Uno	1	20,31	20,31	DigiKey
u	Sensor de efecto Hall	2	1,03	2,06	Electrónica Gimeno
u	Driver Motor	1	17,5	17,5	Adafruit
u	Resistencias (10 K, 2K2, 4K7)	4	0,03	0,12	Electrónica Gimeno
u	Sensor de color TCS34725	1	7,5	7,5	Electrónica Gimeno

Prototipo de biorreactor con sistema de intercambio de medios de cultivo

PRESUPUESTO

u	Zigbee	2	16,03	32,06	DigiKey
u	Relé 5V 1 canal	1	3,10	3,10	eBay
u	Conector DB9	4	1,67	6,68	Electrónica Gimeno
u	Adaptador USB Zigbee	1	23,56	23,56	DigiKey
u	Termorretractil de varios tamaños	1	1	1	Electrónica Gimeno
u	Conector Sucko Hembra 220V con fusible	1	8,48	8,48	DigiKey
u	Tira pines hembras	1	0,85	0,85	Electrónica Gimeno
u	Tira pines macho	1	0,34	0,34	Electrónica Gimeno
u	Caja de instrumentación ABS	1	45,7	45,7	DigiKey
<b>TOTAL</b>				<b>279,678</b>	

**2. GASTOS MAQUINARIA**

Ud	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (€)	PRECIO TOTAL (€)
h	Soldador	10	5,75	57,50
h	Taladradora	6	8,60	51,60
h	Pistola silicona	2	3,50	7
h	FreeCAD	1	0	0
h	Alicates, lima, destornillador, etc	15	0,9	13,50
<b>TOTAL</b>				<b>129,6</b>

**3. GASTOS PERSONAL**

Ud	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (€)	PRECIO TOTAL (€)
h	Tutor TFG	10	22	220
h	Cotutor TFG	200	15	3000
h	Alumno TFG*	340	8	2720
<b>TOTAL</b>				<b>5940</b>

\*Teniendo en cuenta una media de 5 h/día con una duración total de la fase 1 (hardware) de 68 día

Prototipo de biorreactor con sistema de intercambio de medios de cultivo

PRESUPUESTO

CAPÍTULO 2. SOFTWARE BIORREACTOR

Ud	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (€)	PRECIO TOTAL (€)
h	Tutor TFG	6	22	132
h	Cotutor TFG	150	15	2250
h	Alumno TFG*	225	8	1800
u	Matlab 2013b (licencia UPV)	1	0	0
u	Arduino (open source)	1	0	0
<b>TOTAL</b>				4182

\*Teniendo en cuenta una media de 5 h/día con una duración total de las tareas de software de 45 días

CAPÍTULO 3. CALIBRACIONES DEL SISTEMA

Ud	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (€)	PRECIO TOTAL (€)
h	Tutor TFG	10	22	220
h	Cotutor TFG	50	15	750
h	Alumno TFG*	100	8	800
h	Microbalanza	3	2,60	7,80
h	pHímetro	50	3,70	185
ml	Medio DMEM	500	22,90	22,90
ml	NaOH/HCl	25	0,062	1,55
<b>TOTAL</b>				1987,25

\*Teniendo en cuenta una media de 5 h/día con una duración total de la tarea de calibración de 20 días

PRESUPUESTO

**3.2. Presupuesto total del proyecto**

<b>Capítulo</b>		<b>Importe (€)</b>
Capítulo 1	HARDWARE BIORREACTOR	6349,278
Capítulo 2	SOFTWARE BIORREACTOR	4182
Capítulo 3	CALIBRACIONES DEL SISTEMA	1987,25
Presupuesto de ejecución material (PEM)		12518,528
Gastos generales (20% s/PEM)		2503,706
Beneficio industrial (6% s/PEM)		751,112
Presupuesto total (PT)		15773,346
I.V.A. (21% s/PT)		3312,403
<b>Presupuesto total de inversión</b>		<b>19085,75</b>

El presupuesto total de inversión asciende, con I.V.A. incluido, a la cantidad de DIECINUEVE MIL OCHENTA Y CINCO CON SETENTA Y CINCO.



