

SISTEMA PROTOTIPO DE DETECCIÓN DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

Julián Andrés Peña Flórez

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y
TELECOMUNICACIONES

BUCARAMANGA

2010



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Escuela de Ingenierías Eléctrica, Electrónica y de Telecomunicaciones



SISTEMA PROTOTIPO DE DETECCIÓN DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

Julián Andrés Peña Flórez



Trabajo de Grado para optar por el título de Ingeniero Electrónico

Director

PhD. Rodrigo Correa

Codirector

MSc. José Alejandro Amaya

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y
TELECOMUNICACIONES
BUCARAMANGA

2010

*“ A Dios,
por darme la fuerza para alcanzar mis metas
y guiar siempre mi camino.
A mis padres, Víctor Hugo y Libia,
y a mi hermano Daniel,
por su apoyo incondicional
y permanente interés en formarme como persona.”*

Julián Andrés

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Industrial de Santander por darme la formación necesaria para asumir este proyecto. Al profesor Rodrigo Correa, por su constante interés en el desarrollo de éste y su apoyo como Director del Trabajo de Grado, y al profesor José Amaya, por su colaboración como Codirector del Trabajo de Grado. Al grupo de investigación CEMOS por su respaldo al proyecto, y al grupo estudiantil ERA, por su apoyo incondicional y amistad brindada. A Diana Sofía y Nelly, por su constante interés en este proyecto desde sus respectivos campos de acción. A mi familia, amigos, compañeros, 2050s y demás personas involucradas en el proceso de formación que me ha permitido alcanzar los logros propuestos.

Julián Andrés Peña Flórez

RESUMEN

TÍTULO: SISTEMA PROTOTIPO DE DETECCIÓN DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES¹

AUTOR: JULIÁN ANDRÉS PEÑA FLÓREZ²

PALABRAS CLAVE: Medición por Campo Eléctrico, Crecimiento de cultivos celulares, Velocidad de crecimiento.

CONTENIDO:

Este trabajo presenta el desarrollo de un sistema capaz de detectar la evolución de un cultivo celular en tiempo real y de forma no invasiva, usando la tecnología de medición por campo eléctrico. El sistema incluye una tarjeta de adquisición de datos, electrodos de medición y el software necesario para su funcionamiento.

Después de plantear el problema, se realiza un estudio de la teoría relacionada con el crecimiento de cultivos celulares y el principio de funcionamiento de la medición por campo eléctrico, en los Capítulos 2 y 3, respectivamente. Para la implementación de esta tecnología, se realiza el diseño de los electrodos utilizados en las mediciones a partir de la evaluación de figuras de mérito y simulaciones en el Capítulo 4. En el Capítulo 5, se presenta el análisis inicial de la aplicación que permite seleccionar el hardware del sistema, el cual se presenta y analiza en éste. El software desarrollado para el prototipo, que incluye la programación de un microcontrolador y el desarrollo de una interfaz de usuario, es descrito en el Capítulo 6, y adicionalmente, se presenta el procesamiento de señales propuesto en el Capítulo 7. Finalmente, se muestran los resultados de las pruebas de funcionamiento en las cuales se realiza una variación de las condiciones de operación con el fin de evaluar el funcionamiento del sistema en el Capítulo 8, en las que el cultivo de referencia es *Saccharomyces Cerevisiae*. Las conclusiones y recomendaciones son presentadas en el Capítulo 9.

¹Trabajo de Grado.

²Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas. Escuela de Ingenierías Eléctrica, Electrónica y Telecomunicaciones. Director: PhD. Rodrigo Correa.

ABSTRACT

TITLE: PROTOTYPE SYSTEM FOR THE DETECTION OF CELL CULTURES GROWTH³

AUTHOR: JULIÁN ANDRÉS PEÑA FLÓREZ⁴

KEY WORDS: Electric Field Imaging, Cell cultures growth, Growth rate.

CONTENTS:

This project presents the development of a prototype system that is able to detect the evolution of a cell culture in real time and in a noninvasive way, using the electric field imaging technology. The system includes three main components: a data acquisition board, measurement electrodes and the software needed for its operation.

After formulating the problem, the theory related to cell cultures growth and the operation principle of electric field imaging is studied in Chapters 2 and 3, respectively. For the implementation of the technology, an evaluation of figures of merit and simulations is done to design the measurement electrodes that are built in Chapter 4. In Chapter 5, an initial analysis of the application is presented to support the hardware selection, which is described and analyzed in this chapter. The software programmed for the prototype system, that involves the microcontroller programming and the user interface development, is described in Chapter 6, and additionally, the signal processing proposal is presented in Chapter 7. Finally, the results of the experiments using *Saccharomyces Cerevisiae* as a reference, where the operation conditions were changed to evaluate the prototype system functioning, are shown in Chapter 8. Conclusions and recommendations are presented in Chapter 9.

³Graduation Project

⁴Physical-Mechanical Engineering Faculty. Electrical, Electronics and Telecommunications Engineering School. Advisor: PhD. Rodrigo Correa.

Índice general

1. PRESENTACIÓN	19
1.1. Introducción	19
1.2. Planteamiento del Problema	19
2. CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES	21
2.1. CRECIMIENTO MICROBIANO	21
2.1.1. Cultivo de Microorganismos	21
2.2. MEDIDA DEL CRECIMIENTO Y ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS	21
2.2.1. Métodos Directos e Indirectos	21
2.2.2. Clasificación de métodos físicos para la detección de microorganismos	23
2.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO DISCONTINUO	23
2.3.1. Ciclo de crecimiento de poblaciones	23
2.3.2. Tratamiento del crecimiento como progresión geométrica	24
2.3.3. Tratamiento del crecimiento en función de la tasa de crecimiento μ	25
2.4. DETECTORES DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES	25
2.4.1. Sistemas patentados	26
2.5. SACCHAROMYCES CEREVISIAE	26
3. SISTEMA DE MEDICIÓN POR CAMPO ELÉCTRICO	29
3.1. MEDICIÓN POR CAMPO ELÉCTRICO	30
3.1.1. Modo <i>Shunt</i>	31
3.1.2. Modo Transmisor	31
3.2. DISPOSITIVO DE MEDICIÓN POR CAMPO ELÉCTRICO	32
3.2.1. Generación del campo eléctrico	32
3.2.2. Medición de la perturbación del campo eléctrico	32
3.2.3. Detección del objeto	33
3.3. DETECCIÓN DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES	33
4. ELECTRODOS DEL SISTEMA	35
4.1. TIPOS DE ELECTRODOS	35
4.1.1. La importancia del retorno a tierra	36
4.2. DISEÑO DE LOS ELECTRODOS	36
4.2.1. Figuras de Mérito	36
4.2.2. Consideraciones de Diseño	37
4.3. ELECTRODOS CONSTRUIDOS	44
4.3.1. Electrodo Clase 1	44
4.3.2. Electrodo Clase 2	45

5. CONSTRUCCIÓN DEL PROTOTIPO	47
5.1. RANGO DE MEDICIÓN DE CAPACITANCIA	47
5.1.1. Relación Tensión-Capacitancia del <i>E-Field IC</i>	47
5.1.2. Variación de la Capacitancia del Cultivo	48
5.1.3. Variación de tensión debido al crecimiento del cultivo	48
5.2. HARDWARE DEL SISTEMA	50
5.2.1. Componentes del Sistema	50
5.3. DESCRIPCIÓN DE RUIDO Y RESOLUCIÓN	53
5.3.1. Tensión del Regulador	54
5.3.2. Convertidor Digital-Analógico	54
5.3.3. Amplificador de Instrumentación	55
5.3.4. Convertidor Analógico-Digital	55
6. SOFTWARE DEL SISTEMA	57
6.1. PROGRAMACIÓN DEL MICROCONTROLADOR	57
6.1.1. Recepción de datos	58
6.1.2. Envío de datos	59
6.1.3. Calibración del sistema	59
6.2. LabVIEW	59
6.2.1. Panel Frontal	59
6.2.2. Diagrama de Bloques	61
7. PROCESAMIENTO DE SEÑALES	65
7.1. ESTRATEGIA DE DETECCIÓN	65
7.1.1. Establecimiento de la Referencia	65
7.1.2. Señales asociadas al sistema	66
7.1.3. Muestreo de la señal	67
7.2. FILTRADO	67
7.3. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	68
8. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO	71
8.1. Selección de los electrodos	72
8.1.1. Electrodos Clase 1	72
8.1.2. Electrodos Clase 2	73
8.2. Variación de la cantidad de levadura activa seca en el cultivo	74
8.3. Adición de metales al cultivo	75
8.4. Variación de la temperatura del cultivo	75
8.5. Variación de la cantidad de sustrato del cultivo	77
8.6. Aceleración de la Fase de Muerte del Cultivo Celular	77
8.6.1. Aumento de la temperatura	77
8.6.2. Adición de Digtluconato de Clorhexidina	78
9. CONCLUSIONES	81
Bibliografía	83
A. Componentes Seleccionados	85
B. Circuito Impreso	91
C. Código de Programación	93

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	11
D. Diagrama de Bloques en LabVIEW	97
E. Manual de Usuario	103

Índice de figuras

2.1. Ciclo o curva de crecimiento. Elaborada por el autor.	24
2.2. Saccharomyces cerevisiae en forma activa seca.	27
3.1. Electrodo y objeto detectado. Adaptada de [15].	30
3.2. Modo Shunt. Adaptada de [13].	31
3.3. Modo Transmisor. Adaptada de [13].	31
3.4. Diagrama de bloques del <i>E-Field IC</i> . Tomada de [14].	32
3.5. Diagrama funcional del <i>E-Field IC</i> . Adaptada de [16].	34
4.1. Tipos de sensores. Adaptada de [14].	35
4.2. Electrodo Interdigital. Elaborada por el autor.	37
4.3. <i>Fringing field</i> y espaciamiento de los electrodos. Adaptada de [17].	38
4.4. Intensidad del campo eléctrico para $\lambda = 1,6256mm$ (arriba) y $\lambda = 0,8128mm$ (abajo).	39
4.5. Intensidad del campo eléctrico para <i>ancho</i> = 0,8128mm (arriba) y <i>ancho</i> = 0,4064mm (abajo).	39
4.6. Intensidad del campo eléctrico para <i>No.Conductores</i> = 6 (arriba) y <i>No.Conductores</i> = 4 (abajo).	40
4.7. Señal del electrodo seleccionado y señal del <i>SHIELD</i> . Adaptada de [14].	40
4.8. Uso de un plano en la parte inferior conectado al <i>SHIELD</i> . Adaptada de [17].	41
4.9. Intensidad del campo eléctrico sin plano de apantallado (arriba) y con plano de apantallado (abajo).	41
4.10. Intensidad del campo eléctrico con plano de apantallado por secciones (arriba) y con plano de apantallado de una sola capa (abajo).	42
4.11. Intensidad del campo eléctrico para <i>EspesorSubstrato</i> = 1,6mm (arriba) y <i>EspesorSubstrato</i> = 0,1mm (abajo).	43
4.12. Intensidad del campo eléctrico para <i>EspesorConductores</i> = 35 μm (arriba) y <i>EspesorConductores</i> = 17 μm (abajo).	43
4.13. Intensidad del campo eléctrico para <i>anchotierra</i> = 0,8128mm (arriba) y <i>anchotierra</i> = 0,4064mm (abajo).	44
4.14. Electrodo construido clase 1.	45
4.15. Simulación electrodos clase 1.	45
4.16. Electrodo construido clase 2.	46
4.17. Simulación electrodos clase 2.	46
5.1. LEVEL Vs Capacitancia con f=120kHz.	47
5.2. LEVEL Vs Capacitancia con f=60kHz.	48
5.3. Capacitancia Vs Tiempo.	49
5.4. (a) Fase de crecimiento con f=120kHz, (b) Fase de crecimiento con f=60kHz.	49
5.5. Diagrama de bloques general de la Tarjeta de Adquisición de Datos.	50
5.6. Conexión del <i>E-Field IC</i>	51
5.7. Conexión del INA.	52

5.8. Conexión del DAC.	53
5.9. Conexión del Microcontrolador.	53
5.10. Conexión del Regulador de Tensión.	54
6.1. Diagrama de Flujo.	58
6.2. Página Principal.	60
6.3. Configuración Inicial.	60
6.4. Lectura de Datos.	61
6.5. Señales Internas.	61
6.6. Evento "Ok".	62
6.7. Lectura de los datos.	63
7.1. Señal original y filtrada de cada uno de los electrodos, tipo electrodo único.	65
7.2. Señal original y filtrada de cada uno de los electrodos, tipo electrodos múltiples.	66
7.3. Hardware y señales del sistema.	66
7.4. Filtrado de la señal.	68
7.5. Cálculo de la velocidad de crecimiento.	69
7.6. Curva y velocidad de crecimiento.	69
8.1. Imágenes del crecimiento de la levadura.	71
8.2. Imágenes de la levadura después de ocupar el máximo volumen del recipiente.	72
8.3. Recipiente del cultivo con electrodo clase 1 (izquierda) y electrodo clase 2 (derecha).	72
8.4. Clase 1: Detección de tipo electrodo único (izquierda) y tipo electrodos múltiples (derecha).	73
8.5. Clase 2: Detección de tipo electrodo único (izquierda) y tipo electrodos múltiples (derecha).	73
8.6. Clase 2 (contacto directo): Detección de tipo electrodo único (izquierda) y tipo electrodos múltiples (derecha).	74
8.7. Curvas de Crecimiento al variar la cantidad de levadura activa seca.	74
8.8. Curvas de Crecimiento al agregar metales al medio de cultivo.	75
8.9. Curvas de Crecimiento al agregar plomo al medio de cultivo. Tomada de [22].	75
8.10. Curvas de Crecimiento al variar la temperatura del medio de cultivo.	76
8.11. Curvas de Crecimiento al variar la temperatura del medio de cultivo. Tomada de [21].	76
8.12. (a) Curva de Crecimiento al variar la cantidad de sustrato, (b) Velocidad de Crecimiento al variar la cantidad de sustrato.	77
8.13. (a) Curva de Crecimiento al incrementar la temperatura, (b) Velocidad de Crecimiento al incrementar la temperatura.	78
8.14. (a) Curva de Crecimiento al agregar digluconato de clorhexidina, (b) Velocidad de Crecimiento al agregar digluconato de clorhexidina.	79
A.1. Descripción del MC33941. Hoja de datos propiedad de Freescale Semiconductor, Inc [16].	86
A.2. Descripción del AD8231. Hoja de datos propiedad de Analog Devices, Inc [23].	87
A.3. Descripción del TLV5638. Hoja de datos propiedad de Texas Instruments Incorporated [24].	88
A.4. Descripción del MC9S08JM60. Hoja de datos propiedad de Freescale Semiconductor, Inc [25].	89
A.5. Descripción del REG104-5. Hoja de datos propiedad de Texas Instruments Incorporated [26].	90
B.1. Esquemático del PCB.	91
B.2. Cara superior del PCB.	92
B.3. Cara inferior del PCB.	92
D.1. Evento "OpenSession".	97
D.2. Evento "CloseSession".	98
D.3. Evento "BulkOut".	98
D.4. Evento "Configuración".	99
D.5. Evento "Ok".	99
D.6. Evento "DAQ".	100

D.7. Evento "Stop".	100
D.8. Evento "Start".	101

Índice de tablas

4.1. Parámetros de referencia para los electrodos simulados.	38
4.2. Parámetros para los electrodos clase 1.	45
4.3. Parámetros para los electrodos clase 2.	46

Capítulo 1

PRESENTACIÓN

1.1. Introducción

El presente documento compila todas las actividades descritas en el plan de trabajo aprobado. En éste se consignan los resultados del diseño y construcción de un sistema utilizado para detectar la evolución de un cultivo celular; igualmente, se muestran los resultados de las pruebas preliminares que demostraron en forma concluyente que este tipo de estrategia para detectar el crecimiento celular es viable.

El desarrollo de esta alternativa, implica un estudio acerca del crecimiento microbiano y la medición por campo eléctrico, tópicos a los que se hace referencia en los capítulos 2 y 3, respectivamente. Además, incluye el desarrollo de hardware y software del prototipo, cuya propuesta se realiza en los capítulos 4 y 5, y el diseño de los electrodos que permiten realizar la medición, correspondiente al capítulo 6. En el capítulo 7, se explica el procesamiento de las señales para obtener la curva de crecimiento e indicar la velocidad de crecimiento del cultivo, y finalmente, se analizan los resultados de diferentes pruebas que buscan comprobar el buen funcionamiento del sistema propuesto, en el capítulo 8. Las conclusiones y recomendaciones se presentan en el capítulo 9.

1.2. Planteamiento del Problema

El presente proyecto aborda el problema de determinar en forma no invasiva y en tiempo real el crecimiento de un cultivo celular. Se seleccionó *Saccharomyces Cerevisiae* como ejemplo demostrativo, dadas las características y el amplio conocimiento que existe sobre su cinética de crecimiento.

Capítulo 2

CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

2.1. CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano, por definición, hace referencia al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por lo tanto, este concepto corresponde al crecimiento de la población como conjunto, y no al crecimiento de un único microorganismo, ya que este último se denomina ciclo celular. El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos los individuos de dicha población [1].

2.1.1. Cultivo de Microorganismos

Como se define en [1], “el cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada”. En general, se pueden distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio, y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en éste.

2.2. MEDIDA DEL CRECIMIENTO Y ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS

Existen diferentes sistemas y métodos para detectar y medir el crecimiento de microorganismos. A continuación se muestran las clasificaciones principales de éstos.

2.2.1. Métodos Directos e Indirectos

Los métodos para el seguimiento de la evolución de un cultivo microbiano pueden clasificarse en directos e indirectos. Los métodos directos se basan en la medida de la evolución del número de células vivas o del número de partículas. Los métodos indirectos se basan en la medida de algún parámetro del cultivo que permite deducir información sobre la evolución del número de microorganismos [2].

Métodos Directos

Conteo de Viables Sólo se cuentan las células vivas que pueden reproducirse. Consiste en sembrar un volumen determinado de muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables, contando el número de colonias que se forman a partir de cada célula aislada, conocida como UFC (Unidad Formadora de Colonia) [1].

1. Diluciones Seriadas

Se toman soluciones sucesivas de cultivo líquido y se transfieren a una placa de agar, para contar las colonias que se forman [3].

2. Filtración

Se ejecuta en ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, razón por la cual se recolectan por filtración a través de una membrana. Posteriormente, ésta se coloca en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias. [1].

Conteo Microscópico Directo Se cuentan las células vivas y muertas. Consiste en usar un microscopio o un contador electrónico de partículas para determinar el número de células. [1].

1. Cámara de Conteo

Consiste en la observación en el microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de microorganismos que se ubican en unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser [1].

2. Conteo Automático

Consiste en la utilización de sistemas automáticos del tipo *Coulter Counter*. La conductividad cambia cuando la célula pasa por un pequeño orificio, generando un pulso de voltaje que permite detectar las células individualmente, de forma electrónica. [6].

Métodos Indirectos

1. Método Turbidométrico

Funciona a partir del hecho de que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez se mide con un espectrofotómetro y depende de la masa en suspensión, por tanto, esta medición permite estimarla. Una curva estándar permite relacionar la medida del equipo con la masa de las células [1].

2. Medida de Peso Seco

Su ejecución implica que, por intervalos de tiempo determinados, se tome un volumen de muestra, el cual es filtrado a través de una membrana de forma que se retengan las células, y posteriormente se pesen [4].

3. Medida de Parámetros Bioquímicos

La medición de parámetros tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, etc. por unidad de volumen de cultivo, entrega una idea de su crecimiento [4].

4. Medida de Actividad Metabólica

La actividad metabólica permite realizar la detección de los microorganismos. En el caso de las bacterias, se puede analizar la disminución del potencial redox ¹ del medio como consecuencia del consumo de oxígeno, utilizando colorantes sensibles a la oxidación-reducción [4].

¹Potencial redox es la tendencia a reducir u oxidar otros elementos químicos.

2.2.2. Clasificación de métodos físicos para la detección de microorganismos

A continuación se presentan los métodos físicos más importantes [4], utilizados en la detección de microorganismos.

Impedancia

En un cultivo los microorganismos alteran los substratos cambiando su conductividad eléctrica, y esto varía la impedancia. El método se basa en detectar estos cambios y la cantidad de microorganismos se expresa como función del tiempo que tarda el cultivo en alcanzar unos valores de impedancia específicos[4].

Microcalorimetría

Consiste en el estudio de los pequeños cambios de calor producidos como consecuencia del anabolismo² de nutrientes. Los diferentes tipos de microorganismos metabolizan los substratos de forma diferente, y por ello, se ha usado la microcalorimetría para poder identificar las especies presentes en un alimento[4].

Citometría de Flujo

Consiste en hacer pasar una a una las células de una suspensión por un sistema de detección; este sistema contiene un detector capaz de medir diferentes parámetros (diferentes tipos de fluorescencia, absorbancia, dispersión de luz, etc.) lo que permite identificar las células durante su paso por el detector [4].

La citometría de flujo (intensidad de luz desviada delantera) se utiliza para medir el volumen relativo de las células en el flujo. Ésta mide la luz desviada en la dirección delantera cuando una célula pasa por un rayo láser, la cual constituye un parámetro proporcional al volumen para una célula esférica [5].

2.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO DISCONTINUO

En esta sección se realiza un estudio de la cinética del crecimiento de microorganismos que crecen aislados y que no forman ningún tipo de estructura, la cual corresponde a la forma de crecimiento de la levadura (hongo unicelular) y de las bacterias. Es importante conocer la cinética de crecimiento de los cultivos microbianos para predecir cómo va a evolucionar un cultivo, cómo va a ir consumiéndose el substrato y cómo se van a ir acumulando los productos del cultivo.

“Las células aisladas cultivadas en un volumen finito de medio de cultivo apropiado van utilizando los nutrientes que tienen disponibles con la mayor eficiencia y rapidez que pueden, sintetizando sus propios componentes celulares y dividiéndose en cuanto han podido duplicar su masa y su material genético” [1].

El tiempo que tarda una célula en hacer todo lo anterior es lo que se conoce como tiempo de generación (τ) y puede variar desde unos 20 minutos en condiciones óptimas hasta varios meses en condiciones del suelo. Cada vez que transcurre un tiempo de generación, el número de células se duplica, siguiendo, por tanto, un incremento exponencial [1].

2.3.1. Ciclo de crecimiento de poblaciones

En los cultivos discontinuos, generalmente en medio líquido, se pueden distinguir cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano [1], mostradas en la figura 2.1.

²Anabolismo es la síntesis de moléculas orgánicas más complejas a partir de otras más sencillas.

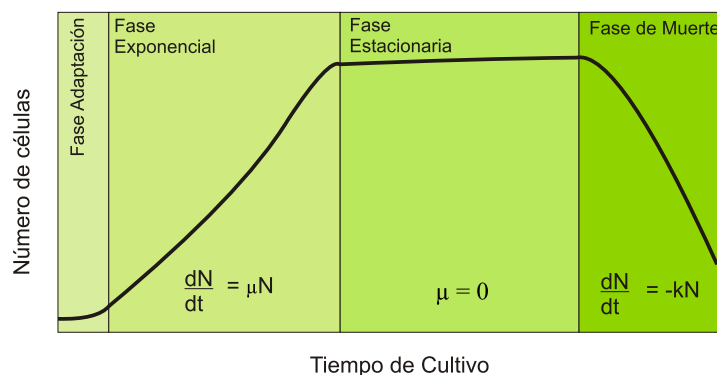


Figura 2.1: Ciclo o curva de crecimiento. Elaborada por el autor.

Fase de Adaptación

En esta fase los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales para poder iniciar su crecimiento.

Fase Exponencial o Logarítmica

Fase en la que la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo, debido al rápido consumo de los nutrientes del medio. En la sección siguiente se modela el comportamiento en esta fase.

Fase Estacionaria

Fase en la que se detiene el crecimiento después de alcanzar el máximo, debido a que los productos de desecho afectan el medio de cultivo o se agota algún nutriente esencial.

Fase de Muerte

Reducción del número de viables del cultivo.

2.3.2. Tratamiento del crecimiento como progresión geométrica

El comportamiento de los cultivos celulares ha sido modelado para analizar su crecimiento, por lo tanto, en esta subsección se muestran las ecuaciones más importantes referentes a éste, tomadas de [1].

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se duplica al cabo del tiempo de generación (τ). De esta forma, se puede calcular el número de bacterias (N) al cabo de un número de generaciones (n) usando la ecuación siguiente:

$$N = N_0 2^n \quad (2.1)$$

siendo N_0 el número de células en el momento actual. El número de generaciones se puede calcular de la siguiente forma:

$$n = \frac{t}{\tau} \quad (2.2)$$

donde t es el tiempo transcurrido.

Por consiguiente, combinando las ecuaciones 2.1 y 2.2, se obtiene:

$$N = N_0 2^{\frac{t}{\tau}} \quad (2.3)$$

Para facilitar el manejo de las ecuaciones se realiza una linealización de éstas que resulta en:

$$\ln N = \ln N_0 + \frac{t}{\tau} \ln 2 \quad (2.4)$$

El logaritmo del número de células crece linealmente con el tiempo a razón de una constante igual a $\frac{\ln 2}{\tau}$.

2.3.3. Tratamiento del crecimiento en función de la tasa de crecimiento μ

Otra forma de representar la cinética es considerando el incremento en el número de células (dN) en un intervalo corto de tiempo (dt). Nuevamente, se presentan las ecuaciones que modelan este comportamiento, tomadas de [1].

En este caso, la ecuación que describe la cinética es la siguiente:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (2.5)$$

El incremento del número de células (dN) por unidad de tiempo (dt) es proporcional al número de células presentes en el cultivo (N). A la constante de proporcionalidad (μ) se le denomina tasa de crecimiento.

Integrando la ecuación anterior durante el tiempo de cultivo, se transforma en la siguiente función exponencial:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (2.6)$$

La linealización de la ecuación corresponde a:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t \quad (2.7)$$

El incremento del logaritmo del número de células aumenta linealmente con el tiempo siendo la constante de proporcionalidad μ .

Comparando la ecuación 2.7 con la ecuación 2.4, podemos concluir que $\mu = \frac{\ln 2}{\tau}$ y, por consiguiente, que $\tau = \frac{\ln 2}{\mu}$.

Estas ecuaciones permiten predecir cuál será el número de células, masa celular, etc. después de un cierto tiempo de cultivo (t) si se conoce μ ; o bien, poder calcular la tasa de crecimiento μ a partir de medidas experimentales del incremento en el número de células, biomasa, etc.

2.4. DETECTORES DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

La detección de crecimiento de cultivos celulares es conocida por los altos costos que implica y por la dificultad en el cumplimiento de los requerimientos planteados por quienes realizan los experimentos con éstos. Sin embargo, es un campo en el que ya se han desarrollado equipos de detección.

Uno de estos, permite monitorear la división celular de levadura por Espectroscopia Dieléctrica. Para este caso, las células se encuentran en un campo AC y el incremento en la permitividad relativa es proporcional al contenido de éstas. Esta variación depende de la frecuencia y corresponde a la dispersión eléctrica, la cual se relaciona con los parámetros morfológicos y eléctricos de las células. Se utiliza inducción electromagnética, y se ubican en el recipiente dos toroides concéntricos acoplados a través de la admitancia del líquido muestra. A partir de la tensión aplicada en el primer toroide y la corriente de salida del segundo, se puede determinar la permitividad relativa y la conductividad de la muestra en un rango de frecuencia de 75kHz a 30MHz [7].

Otro de los trabajos importantes en esta área, indica el uso de un sensor LC, el cual se encarga de detectar los cambios en la permitividad del medio a partir de la variación en la frecuencia de resonancia del sensor y de la frecuencia de cero reactancia. El acoplamiento magnético entre una antena ubicada cerca al medio (mas no en

contacto con éste) y el sensor, altera la impedancia de ésta. Utilizando un analizador de impedancia se obtiene la información correspondiente a la permitividad compleja del medio en el que se sumerge el sensor [8].

Finalmente, cabe resaltar la implementación del método ECIS (*electric cell-substrate impedance sensing*), usando un electrodo de oro inmerso en un medio de cultivo de tejido. Cuando las células se adhieren a éste, la impedancia eléctrica medida varía ya que éstas afectan el flujo de corriente. La variación de impedancia eléctrica promedio, permite obtener información importante sobre la actividad metabólica y la morfología de las células. Partiendo de este principio, se presenta un biosensor que monitorea la morfología celular usando campos eléctricos [9].

2.4.1. Sistemas patentados

A partir de una búsqueda de patentes correspondiente al problema descrito anteriormente, se escogieron los sistemas más relacionados con el tema. Se pudo notar que en cuanto a los cultivos celulares, se mantiene un enfoque dirigido a la concentración de sustancias y al ajuste de condiciones óptimas del medio. El monitoreo de cultivos celulares, en algunos casos, involucra distintas tecnologías en un sólo sistema, como un aparato electro-óptico. La parte eléctrica incluye electrodos en los que una corriente alterna induce un campo eléctrico variable en el tiempo cuya función consiste en lograr la orientación deseada de las células. Además, existen canales ópticos y rayos de luz necesarios para la parte óptica, encargada de generar señales en respuesta a los cambios en la densidad óptica al provocar la presencia y ausencia del campo eléctrico mencionado. A partir de este proceso logra obtenerse información concerniente a la concentración, distribución y contenido celular de la suspensión analizada [10].

También existen tecnologías como la de medición óptico-química en la que una fuente de excitación óptica excita un sensor óptico-químico. El sensor emite o absorbe luz cuya medición se lleva a cabo con un detector. La cantidad de luz que se emite o absorbe está relacionada con la concentración de sustancias, y cuando ésta varía, se interpreta que ha ocurrido un cambio de concentración. A partir de estos análisis se pueden determinar y ajustar las condiciones para un cultivo celular [11].

2.5. SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Diversos procesos de alta complejidad correspondientes a organismos eucarióticos³ se pueden explorar en detalle en un organismo con un sistema genético bien desarrollado, como *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es fácil de cultivar para obtener cantidades significativas, lo cual es apropiado para análisis bioquímicos [12], y en este caso, para corroborar los resultados obtenidos con el sistema de detección, teniendo en cuenta que esta levadura funcionaría como punto de referencia gracias a los estudios que sobre ella existen.

En este proyecto se utilizó levadura activa seca, mostrada en la figura 2.2.

³Como organismos eucarióticos que son, los hongos tienen su núcleo diferenciado en el interior de la célula, tienen varios cromosomas, la división celular se produce por mitosis y la producción de células sexuales por meiosis.



Figura 2.2: Saccharomyces cerevisiae en forma activa seca.

Capítulo 3

SISTEMA DE MEDICIÓN POR CAMPO ELÉCTRICO

La elección del sistema de medición apropiado para esta aplicación, depende de diversos factores asociados a ésta, los cuales plantean unas condiciones de operación específicas. A partir de éstas, se puede realizar una evaluación de la variedad de sensores existentes, que permite determinar una tecnología de medición apropiada. Algunos de los requerimientos tenidos en cuenta en esta evaluación son:

- Evitar el contacto cultivo-sensor
No debe introducirse ningún dispositivo en la muestra analizada de forma que el instrumento de medición no pueda contaminar el cultivo celular.
- Evitar el análisis netamente visual
El comportamiento y la ubicación del cultivo celular dentro del recipiente, impiden que la información obtenida al analizar lo exteriormente observable indique la cantidad real de levadura en éste.
- Evitar exigencias en cuanto a las condiciones de iluminación
Las condiciones de iluminación serán las requeridas por el cultivo, por lo cual el sistema de medición no debe plantear ninguna exigencia en este aspecto.
- Bajo costo
En el estudio de cultivos celulares se han desarrollado sistemas de tecnología avanzada con énfasis en análisis microscópico, sin embargo, su costo los convierte en herramientas inasequibles para los trabajos de laboratorio más comunes, por lo cual la construcción del sistema propuesto en este trabajo debe tener un costo reducido.

La opción escogida es la Medición por Campo Eléctrico, que se explica en la sección siguiente.

Algunas de las ventajas de la medición por campo eléctrico comparada con otras tecnologías son [13]:

- Se pueden detectar objetos en movimiento o estacionarios a través de cualquier material no conductor.
- No requiere un contacto físico con el objeto, como los detectores mecánicos.
- No requiere un posicionamiento cuidadoso como los detectores fotoeléctricos, y su funcionamiento no se ve afectado por efectos de iluminación o reflectividad de los objetos.
- No sólo detecta conductores metálicos como en los sensores inductivos, en los que generalmente el tipo de metal afecta el rango de detección.

- Detecta objetos que sean conductores o que tengan propiedades dieléctricas diferentes al entorno de los electrodos del sensor [14]. Puede operar a través de capas delgadas de plástico, papel, vidrio, entre otros [15].

3.1. MEDICIÓN POR CAMPO ELÉCTRICO

La tecnología de medición por campo eléctrico no es un planteamiento reciente, sin embargo, el trabajo en este campo ha tenido ciertas limitaciones que han impedido un amplio desarrollo de éste. Por esta razón, se convierte en un ámbito interesante teniendo en cuenta que no ha sido explotado lo suficiente como para determinar todas las propiedades que presenta.

El funcionamiento básico corresponde a un esquema de dos electrodos: un transmisor y un receptor. Sobre el electrodo transmisor se aplica un potencial variable en el tiempo, mientras el electrodo receptor está aterrizado. De esta forma, se establece un campo eléctrico entre los dos electrodos, el cual es perturbado cuando un objeto se encuentra cerca a éstos. Este último genera variaciones en las capacitancias asociadas al sistema, y por lo tanto, variaciones de corriente que permiten detectar la presencia del objeto. Básicamente, el cambio en la capacitancia en respuesta a un cambio en el entorno, se mide al detectar las atenuaciones del campo eléctrico generado [14].

El funcionamiento también se puede explicar entendiendo el sistema como el circuito equivalente con tres elementos principales de la figura 3.1: transmisor, receptor y objeto. Entre cada uno de éstos y tierra, existe una capacitancia determinada, y entre ellos como tal, también existe una capacitancia específica. Un voltaje de AC se aplica al transmisor, y a través de la capacitancia transmisor-receptor, induce un desplazamiento de corriente en el receptor. La posición del objeto modifica la capacitancia transmisor-receptor, y por consiguiente, la amplitud de la señal recibida. Si el objeto se aterriza, el desplazamiento de corriente en el receptor decrece a medida que el objeto se acerca a los electrodos. Esta tecnología se clasifica como una forma de sensores de capacitancia [15].

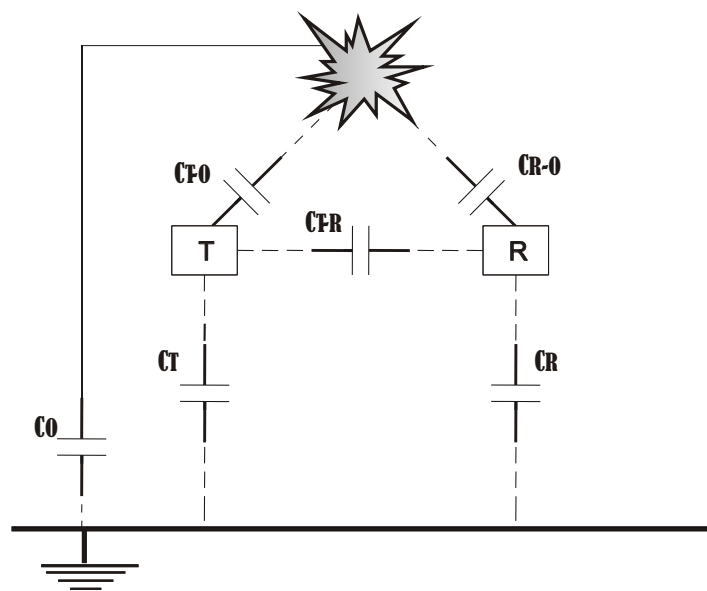


Figura 3.1: Electrodo y objeto detectado. Adaptada de [15].

3.1.1. Modo *Shunt*

Este es el modo de operación más utilizado, y está representado en la figura 3.2. En ésta, se observa que el electrodo de la izquierda es el transmisor del campo eléctrico, mientras el de la derecha es el receptor. Cuando el objeto se acerca al campo establecido entre las placas, una corriente fluye por éste hacia tierra, y consecuentemente, se produce una atenuación del campo eléctrico transmisor-receptor, que finalmente es la variación que permitirá medir el cambio existente. Es importante recalcar que el objeto debe estar aterrizado para generar una variación significativa, cuya medición dependerá del acoplamiento a tierra. [13]

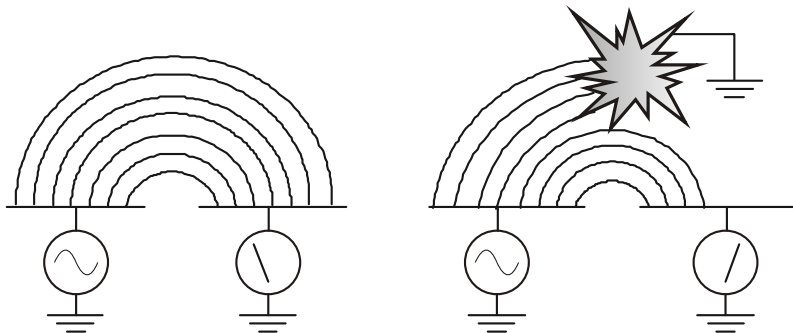


Figura 3.2: Modo Shunt. Adaptada de [13].

3.1.2. Modo Transmisor

Generalmente se utiliza en ocasiones en las que no es posible aterrizar los objetos que se desea detectar, planteando un modo de funcionamiento cuya dependencia del acoplamiento a tierra no impide la detección. De acuerdo a este modo de funcionamiento (representado en la figura 3.3), el acercamiento del objeto conductor al electrodo transmisor, hace que la señal se acople capacitivamente en el cuerpo, convirtiéndolo en un electrodo transmisor. Esto conduce a una señal transmitida mucho más fuerte. [13]

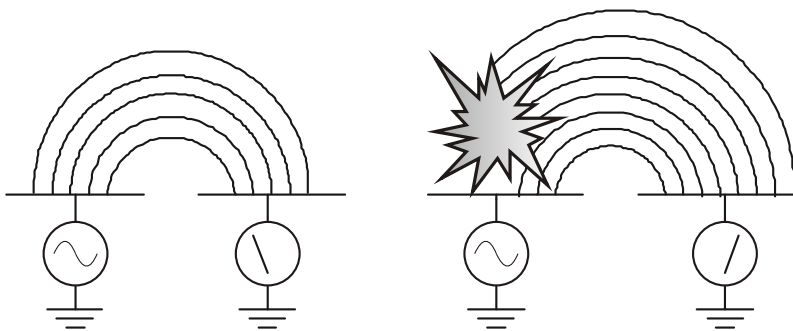


Figura 3.3: Modo Transmisor. Adaptada de [13].

Los modos de operación realmente ocurren de forma simultánea, pues cierta parte de la señal es siempre acoplada en el objeto y radiada al receptor, así como cierta parte de la señal radiada suele aterrizar. Sin embargo, a menos que el objeto se encuentre muy cerca al electrodo transmisor, generalmente la cantidad aterrizada supera la cantidad acoplada y radiada [13].

3.2. DISPOSITIVO DE MEDICIÓN POR CAMPO ELÉCTRICO

Se ha seleccionado un circuito integrado (*E-Field IC*) encargado de generar el campo eléctrico, y además, de proporcionar un esquema de detección de las variaciones que en éste se producen. Su diagrama de bloques se muestra en la figura 3.4. A partir del diagrama se explicará el funcionamiento del *E-Field IC*.

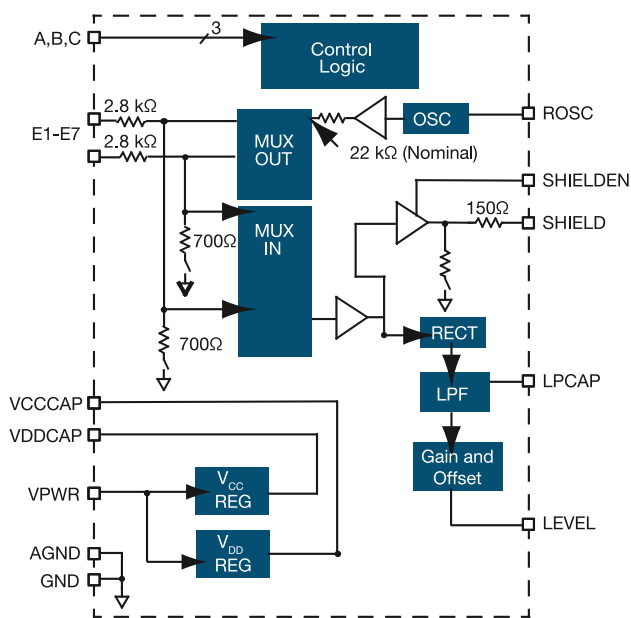


Figura 3.4: Diagrama de bloques del *E-Field IC*. Tomada de [14].

3.2.1. Generación del campo eléctrico

El campo eléctrico es generado usando un circuito oscilador (*OSC* en la figura 3.4) del IC. Éste se genera a partir de una señal senoidal de baja frecuencia, 5V pico a pico y contenido armónico muy bajo para evitar interferencia armónica [16]. Su frecuencia puede ajustarse con la resistencia conectada al pin *ROSC* y está optimizada para 120kHz (cuando la resistencia es 39kΩ).

La señal de AC generada (en la que adicionalmente se incluye una tensión de *offset*) se entrega al multiplexor *MUX OUT* a través de la resistencia de 22kΩ que se muestra en la figura 3.4. El multiplexor se encarga de entregar la señal al electrodo seleccionado con el circuito de control (*Control Logic*), que puede variar entre E1 y E7 de acuerdo a los bits de selección en los pines A, B y C. Los *pads* externos de conexión de los electrodos tienen una resistencia de 2.8kΩ en serie con la electrónica interna.

Los electrodos no seleccionados son conectados a la tierra del circuito integrado. Éstos pueden actuar como los caminos de retorno necesarios para cerrar el lazo que permite la circulación de la corriente del campo eléctrico, la cual fluye desde el pin del electrodo seleccionado hasta la tierra del circuito. De esta forma, debido al campo eléctrico fluye una corriente entre el electrodo activo y cualquier objeto con un camino hacia la tierra del circuito, incluyendo los electrodos no seleccionados [17].

3.2.2. Medición de la perturbación del campo eléctrico

La corriente que fluye entre el electrodo y las tierras que lo rodean resulta en una caída de tensión sobre la resistencia interna, lo cual implica un cambio en la tensión del pin. El multiplexor receptor *MUX IN*, conectado

simultáneamente al electrodo escogido, dirige la señal senoidal hacia el detector del circuito para realizar la medición correspondiente. El bloque rectificador *RECT* lleva el *offset* de la señal a cero volts y se encarga de rectificar la onda senoidal, obteniendo una tensión DC.

Esta última es filtrada en el bloque *LPF* que corresponde a un filtro pasa-bajas que utiliza una resistencia interna y un capacitor conectado al pin *LPCAP*. Típicamente se usa un capacitor de 10nF que implica un tiempo de respuesta de 1.5ms. Si se requiere una respuesta más rápida, se puede utilizar un capacitor de 1nF, con el cual el tiempo es de menos de 200 μ s. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la reducción del valor del capacitor incrementa el ruido [16].

Posteriormente la tensión DC es amplificada y se le suma un *offset* (bloque *Gain and Offset*), para finalmente entregarla en el pin *LEVEL* [17].

3.2.3. Detección del objeto

Para comprender la detección del objeto usando el *E-Field IC*, se plantea la formación de un capacitor entre el electrodo activado y una tierra virtual. La capacitancia, y por lo tanto la medición del sensor, se ve afectada por ciertos factores de acuerdo a la fórmula 3.1.

$$C = \frac{k\epsilon_0 A}{d} \quad (3.1)$$

C = capacitancia (F)

k = constante dieléctrica del material que separa las placas

A = área de las placas (m^2)

d = distancia entre las placas (m^2)

ϵ_0 = permitividad del espacio libre ($8.85 \cdot 10^{-12}$ F/m)

De acuerdo a esto, la sensibilidad de la detección es función del tamaño de la placa, de la constante dieléctrica del medio entre las placas, y de la distancia entre ellas. Además, la tensión en el pin del electrodo es inversamente proporcional a la capacitancia entre el electrodo activado, y los electrodos y otros objetos en el campo eléctrico que lo rodean. La resistencia en serie con *OSC* de 22k Ω fue escogida para mantener una relación aproximadamente lineal a 120kHz en el rango de 10pF a 70pF.

El diagrama funcional simplificado para este circuito integrado se muestra en la figura 3.5. Allí se observa la tensión senoidal entregada por el bloque *OSC* del circuito integrado, la cual se conecta a una resistencia de 22k Ω en serie con la resistencia del *pad* externo y con la capacitancia entre el electrodo y la tierra virtual. Este circuito indica que la tensión en el “capacitor” mostrado varía de acuerdo a la capacitancia que se genere; este voltaje variable corresponde a la tensión del pin del electrodo activado. Esta tensión es conectada a un detector que la convierte en una señal DC, que es filtrada para obtener la señal de salida del *E-Field IC* conocida como *LEVEL*.

3.3. DETECCIÓN DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

Los trabajos presentados en el capítulo 1 relacionados con el estudio de cultivos celulares muestran que la permitividad relativa es proporcional al contenido de células del cultivo. Por lo tanto, siendo la capacitancia directamente proporcional a la permitividad relativa, el crecimiento se traduce en una variación de capacitancia de forma que puede detectarse con un sensor como el escogido para este proyecto.

En [7], se menciona que para una suspensión de células, el incremento en la permitividad relativa (o la diferencia en permitividad relativa entre la suspensión de células y el medio) es proporcional al contenido de células, permitiendo la estimación de la biomasa con una medición dieléctrica.

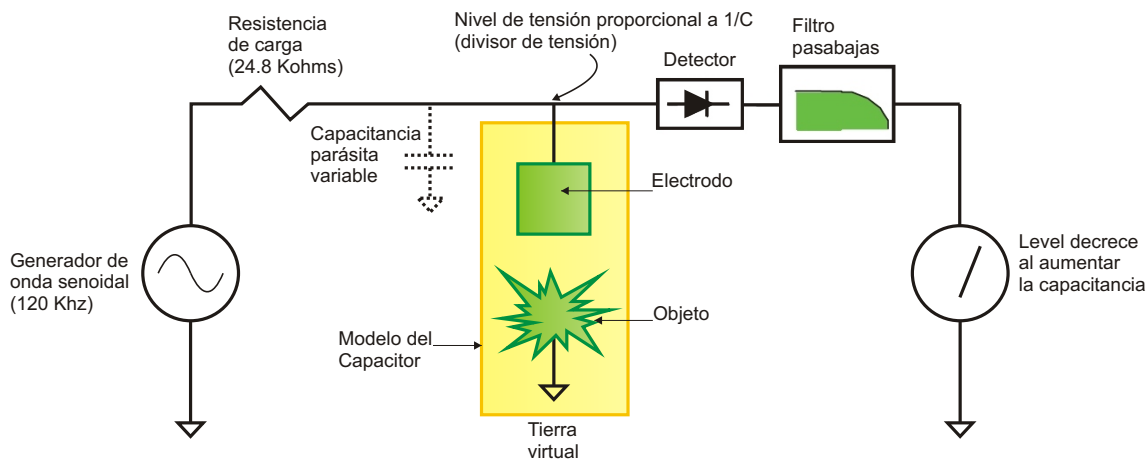


Figura 3.5: Diagrama funcional del *E-Field IC*. Adaptada de [16].

Además, [8] indica que el decremento en la permitividad medida en un cultivo celular específico se debe a la presencia de células muertas, cuyas membranas son menos polarizables y menos capaces de transmitir señales eléctricas, lo cual permitiría detectar no sólo el crecimiento sino también la muerte de las células de un cultivo.

Capítulo 4

ELECTRODOS DEL SISTEMA

Los pines E1 a E7 en el *E-Field IC* son los terminales de los electrodos. Éstos se conectan a través de cable coaxial a los electrodos donde ocurre la radiación del campo eléctrico. Cada uno de ellos tiene una resistencia de $2.8k\Omega (\pm 20\%)$ en serie con la electrónica interna. Sólo puede seleccionarse un electrodo a la vez, pues los demás son aterrizados por un interruptor interno que tiene una resistencia de aproximadamente 700Ω .

4.1. TIPOS DE ELECTRODOS

Aunque el modo básico de funcionamiento implica el uso de un electrodo transmisor y uno receptor, los sensores pueden ser de dos tipos: de electrodo único o de múltiples electrodos. La figura 4.1 muestra estas configuraciones.

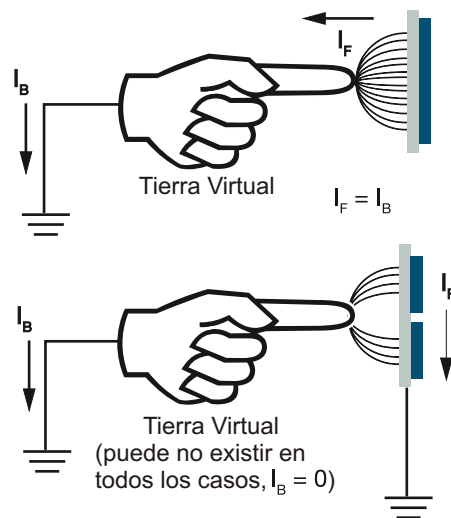


Figura 4.1: Tipos de sensores. Adaptada de [14].

El electrodo único muestra que el campo eléctrico se establece entre el electrodo transmisor y el objeto, el cual actuaría como electrodo receptor, y por lo tanto, debería estar conectado a una tierra virtual. La corriente del electrodo es la misma que fluye por el objeto hacia tierra.

En el caso de múltiples electrodos, el campo se establece entre el transmisor y el receptor, y el objeto constituye el elemento que perturba este campo. Por este último fluye una corriente, que finalmente genera una atenuación del campo eléctrico que permite realizar la medición deseada.

En el caso en el que el objeto no esté acoplado directamente a tierra, se obtiene una atenuación del campo eléctrico menos significativa, pero a pesar de que las variaciones son de menor magnitud aún se puede realizar la detección.

4.1.1. La importancia del retorno a tierra

Para medir los cambios de corriente del sistema es necesario un retorno a tierra, el cual varía de acuerdo a los Tipos de Sensores presentados anteriormente. En el caso de electrodo único, las corrientes del campo eléctrico se establecen entre el electrodo y cualquier objeto aterrizado. También es posible entrelazar el electrodo con la tierra, usando electrodos múltiples, de forma que ésta sea directamente asequible para la creación del campo eléctrico. Este esquema es menos variable que el del camino a tierra a través del objeto, siendo más predecible y menos ruidoso, aunque generalmente implica una menor sensibilidad.

Para este trabajo se pretende realizar pruebas con los dos tipos de sensores propuestos, sin embargo, el diseño de los electrodos de la sección siguiente hace énfasis en el esquema transmisor-receptor; aún así se pueden implementar las dos configuraciones.

4.2. DISEÑO DE LOS ELECTRODOS

En esta sección se presentan los conceptos y consideraciones tenidas en cuenta en el diseño de los electrodos, los cuales se conocen como sensores FEF (*Fringing Electric Field*), concepto que hace referencia a la distorsión del campo eléctrico en los bordes. Éstos son usados para detectar la presencia de un material, estimar la concentración de materia, medir propiedades de ciertos materiales de forma no invasiva, entre otras aplicaciones. Sus características no lineales hacen que el modelado de su comportamiento sea bastante complicado, y además, dedicado a geometrías simplificadas y casos idealizados, lo cual limita su precisión en aplicaciones reales [20].

Debido a esta situación, en esta sección se analizarán figuras de mérito y consideraciones especiales, a partir de los conceptos relacionados con éstas y del soporte que proporcionan las simulaciones numéricas obtenidas con el software *Maxwell SV* de Ansoft.

4.2.1. Figuras de Mérito

Las figuras de mérito que se tienen en cuenta en el diseño de los electrodos, sugeridas en [18], se presentan a continuación.

Profundidad de Penetración

Es una medida efectiva de la disminución de la intensidad del campo eléctrico al aumentar la distancia respecto al plano de los electrodos. La variación de esta figura es de gran interés en casos en los que desea analizarse una capa específica de la muestra [19], y para electrodos interdigitales, su ajuste radica en el cambio de la longitud de onda espacial o *spatial wavelength*, λ , que corresponde a la separación entre las líneas centrales de electrodos contiguos del mismo tipo (ambos transmisores, o receptores) y cuyo aumento implica un incremento en la profundidad de penetración.

Sensitividad de Medida

Es la relación entre el cambio en la salida del sensor y el cambio en el parámetro físico medido en la muestra. Ya que el campo eléctrico es no uniforme, la sensitividad de medida depende de la posición, y decrece exponencialmente al aumentar la distancia respecto al plano de los electrodos [18]. Esta figura también depende del

área de los electrodos, pues al mantener una λ constante, un aumento en el área de éstos implica una mayor sensibilidad de medida.

Intensidad de la Señal

La intensidad del campo eléctrico en sensores FEF es generalmente baja, sin embargo, puede aumentarse agregando estructuras periódicas interdigitales [18]. Ésta varía exponencialmente con la distancia respecto a la muestra.

Tolerancia al Ruido

El uso de electrodos de guarda permite blindar frente al ruido a los electrodos involucrados en la medición. Este blindaje se presenta en forma de electrodos de guarda junto a los transmisores y receptores del sistema en la cara superior, o como plano de apantallado en la cara inferior del electrodo.

4.2.2. Consideraciones de Diseño

Configuración del electrodo Respecto a la configuración de los electrodos, una de las más apropiadas es la de forma interdigital, que se muestra en la figura 4.2. Ésta ha dado buenos resultados en aplicaciones como la implementación de pantallas táctiles [17] y es fácil de simular en el software de análisis 2D utilizado. Además, la forma de crecimiento de la levadura ha mostrado de forma netamente visual cierta similitud con una estructura de capas, por lo cual la forma en la que se establece el campo eléctrico en esta configuración podría ser apropiada al ubicar los conductores en paralelo con las capas mencionadas.



Figura 4.2: Electrodo Interdigital. Elaborada por el autor.

Simulación Las simulaciones muestran la gráfica de intensidad del campo eléctrico E (en V/m) en el electrodo y el espacio que lo rodea; en ésta se puede observar el modelo utilizado en cada simulación.

La solución es del tipo *AC Conduction*, que analiza el modelo cuando existe un campo eléctrico variante en el tiempo. El material asignado a los conductores es cobre, el del sustrato es baquelita, y el espacio que lo rodea es aire. La frontera establecida es de tipo *Balloon*, donde el globo modela un espacio aislado eléctricamente donde la carga en el infinito logra balancear las cargas internas. A los conductores se les asigna una tensión con amplitud de 5V y frecuencia de 120kHz cuando aparecen en color rojo, y están aterrizados, si su color es azul. Se utiliza el análisis adaptativo de *Maxwell*.

Las gráficas mostradas corresponden a una fase de 0 radianes, donde la señal positiva tendría su tensión máxima. La grilla es de 0.2mm. Los parámetros de referencia de la simulación con la cual se comparan los resultados se indican en la tabla 4.1.

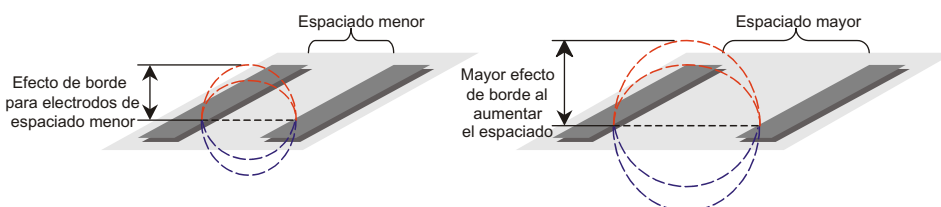
Parámetro	Valor
Ancho de los conductores	0.8128 mm
Espesor de los conductores	0.035 mm
Espesor del sustrato	1.6 mm
Longitud de onda espacial	1.6256 mm

Cuadro 4.1: Parámetros de referencia para los electrodos simulados.

Tamaño y Espaciamiento de los electrodos

La interacción entre el tamaño del electrodo y el espaciamiento afecta la detección de objetos en la tercera dimensión. El aumento en el tamaño de los electrodos incrementa la sensibilidad, pero así mismo, lo hace más susceptible a la interferencia, el ruido eléctrico y caminos parásitos del campo eléctrico en sus alrededores. De forma similar, un incremento en la longitud de onda espacial genera un campo eléctrico con mayor profundidad de penetración, sin embargo, la intensidad del campo es más baja y el flujo de corriente total disminuye [17].

Parte de la corriente del campo eléctrico fluye en el *fringing field* (distorsión del campo eléctrico en los bordes) entre un par de electrodos. La figura 4.3 muestra el camino directo del campo entre dos conductores cercanos y algunos de los caminos del *fringing field* entre los electrodos. La altura del *fringing field* relativa al plano de éstos se asume de forma aproximada como directamente proporcional al espaciamiento, lo cual se muestra en los dos casos presentados en la figura 4.3, ya que la altura es mayor en el caso de la derecha debido al aumento en la separación de los conductores [17].

Figura 4.3: *Fringing field* y espaciamiento de los electrodos. Adaptada de [17].

El *fringing field* permite detectar objetos que no están aterrizados en la tercera dimensión. En el caso de sensores de electrodo único, el *fringing field* pierde importancia, ya que al trabajar con objetos aterrizados la corriente fluye directamente a tierra a través del objeto [17].

De acuerdo a lo anterior, en el diseño de electrodos el área de éste debería corresponder aproximadamente a la superficie del objeto a detectar. Cuando el rango de distancia de detección es mayor, los electrodos deben ser más grandes al igual que el espaciamiento.

Simulación 1: Variación de la longitud de onda espacial Comparación de la intensidad de campo eléctrico al variar la longitud de onda espacial. La figura 4.4 muestra la intensidad de campo eléctrico para $\lambda = 1,6256\text{mm}$ y $\lambda = 0,8128\text{mm}$.

Esta simulación muestra que la disminución en la longitud de onda espacial aumenta la intensidad del campo eléctrico en la superficie del electrodo, especialmente en la región que va hasta los 0.2mm de distancia respecto a ésta. Sin embargo, este decremento también implica una leve reducción en la distancia hasta la cual llega la región de 2481.3 V/m, implicando una disminución en la profundidad de penetración.

Simulación 2: Variación del ancho de los conductores Comparación de la intensidad de campo eléctrico al variar el ancho de los conductores. La figura 4.5 muestra la intensidad de campo eléctrico para *ancho* =

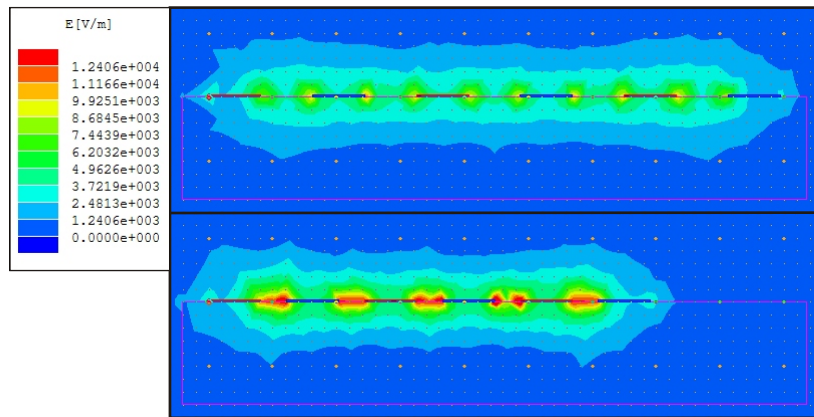


Figura 4.4: Intensidad del campo eléctrico para $\lambda = 1,6256\text{mm}$ (arriba) y $\lambda = 0,8128\text{mm}$ (abajo).

$0,8128\text{mm}$ y *ancho* = $0,4064\text{mm}$.

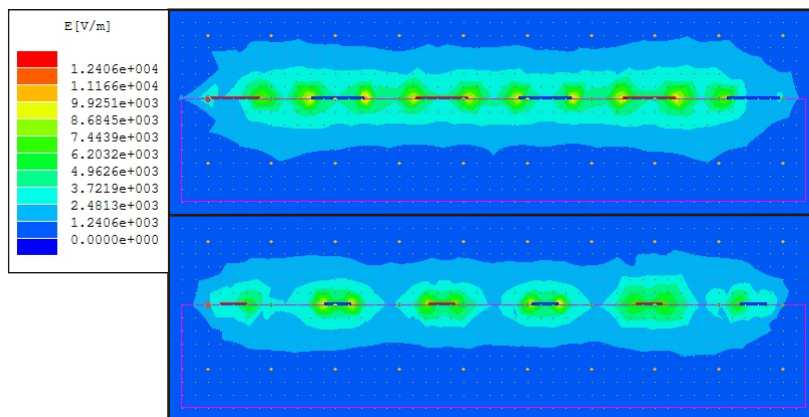


Figura 4.5: Intensidad del campo eléctrico para *ancho* = $0,8128\text{mm}$ (arriba) y *ancho* = $0,4064\text{mm}$ (abajo).

De acuerdo a los resultados, al reducir el ancho de los conductores, la mayor intensidad del campo eléctrico se alcanza en la región de 0.2mm estrictamente sobre cada uno de éstos, lo cual muestra una reducción en la intensidad de la señal, además de un decremento en la profundidad de penetración.

Simulación 3: Variación del número de conductores de una configuración interdigital Comparación de la intensidad de campo eléctrico al variar el número de conductores en el electrodo. La figura 4.6 muestra la intensidad de campo eléctrico para *No.Conductores* = 6 y *No.Conductores* = 4.

La simulación muestra que la profundidad de penetración permanece prácticamente constante, sin embargo, la gráfica en la región que va hasta 0.4mm respecto a la superficie del electrodo indica que el decremento en el número de conductores implica una leve reducción en la intensidad del campo eléctrico.

Blindaje de los electrodos

Para optimizar el desempeño del sensor es necesario establecer una geometría adecuada de apantallado del electrodo.

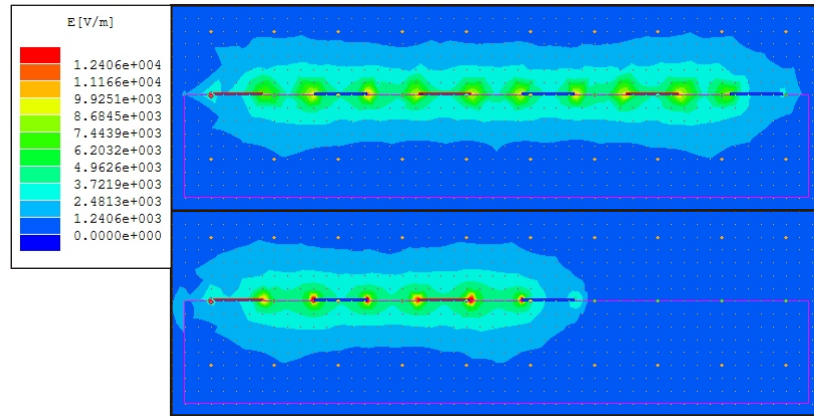


Figura 4.6: Intensidad del campo eléctrico para $No. Conductores = 6$ (arriba) y $No. Conductores = 4$ (abajo).

Shield Drive Technology: Circuito de Apantallado Como sensor capacitivo de proximidad, el *E-Field IC* puede manejar múltiples electrodos. Sin embargo, cuando la radiación del campo eléctrico debe realizarse a cierta distancia del IC, las señales de los electrodos deben transmitirse a éste a través de cables, lo cual puede implicar la atenuación de éstas debido a la interferencia externa. Para minimizar esta interferencia se ha incorporado un circuito de apantallado o *Shield Driver* en este dispositivo [16].

El *Shield Driver* entrega una señal correspondiente al paso de la señal de AC del electrodo seleccionado por un *buffer*, lo cual se muestra en la figura 4.7. Esta señal tiene aproximadamente la misma amplitud y fase de la señal del electrodo, por lo que idealmente la diferencia de potencial entre las señales es cero, anulando cualquier campo eléctrico entre éstas. De esta forma, el *Shield Driver* aísla la señal del electrodo de tierras virtuales externas, lo cual permite realizar mediciones remotas precisas [14].

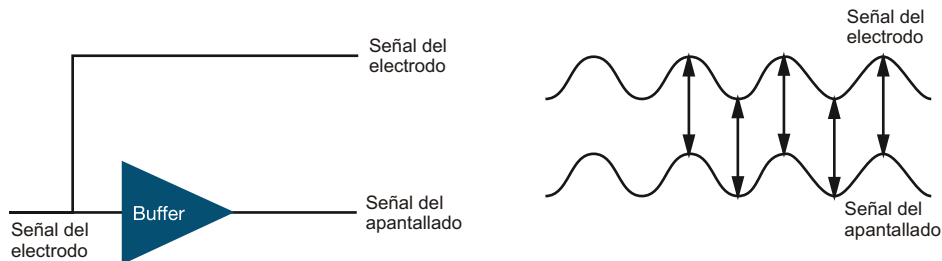


Figura 4.7: Señal del electrodo seleccionado y señal del *SHIELD*. Adaptada de [14].

Una aplicación común de este circuito, es conectar el pin *SHIELD* al apantallado del cable coaxial usado en la conexión de electrodos remotos. Así, se pueden utilizar cables coaxiales sin reducir la sensibilidad o agregando variaciones debido a cambios en la capacitancia de los cables. El campo eléctrico es prácticamente cero entre el conductor interno y el apantallado, lo cual resulta en una corriente idealmente nula entre éstos, por lo cual no se generan variaciones en la corriente del campo en los electrodos [17].

Otra aplicación de este circuito es la creación de un plano bajo el electrodo para anular cualquier tierra virtual que pueda atenuar la señal de AC de éste (Figura 4.8). El *SHIELD* limita las pérdidas de señal hacia el *fringing field* y elimina el efecto capacitivo en la cara inferior del electrodo, asegurando una fuerte radiación del campo eléctrico sólo en la parte superior de éste.

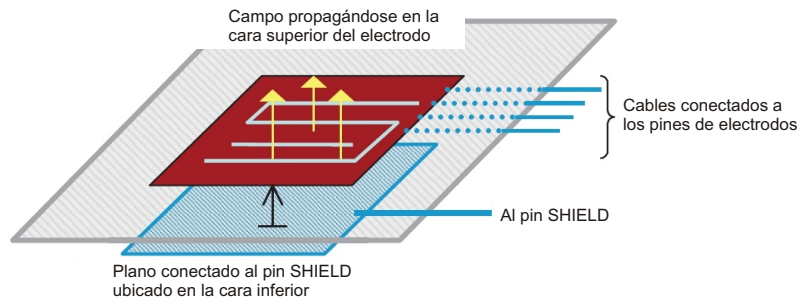


Figura 4.8: Uso de un plano en la parte inferior conectado al *SHIELD*. Adaptada de [17].

Simulación 4: Inclusión de un plano de apantallamiento en la cara inferior Comparación de la intensidad de campo eléctrico al incluir un plano de apantallamiento en la cara inferior del electrodo. La figura 4.9 muestra la intensidad de campo eléctrico sin plano de apantallamiento y con éste.

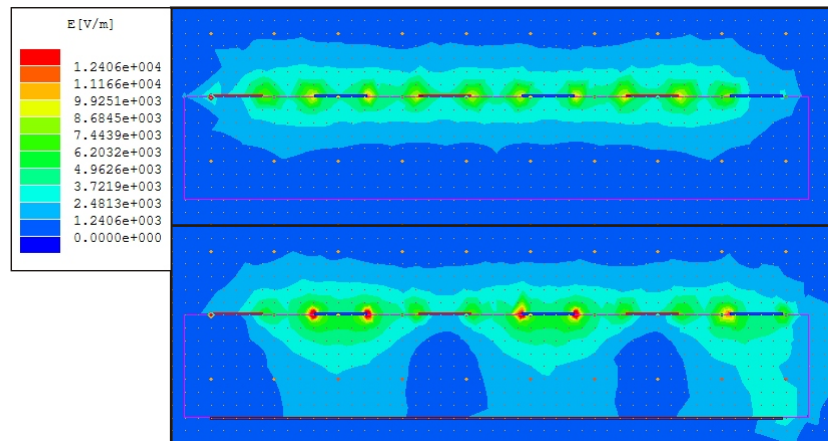


Figura 4.9: Intensidad del campo eléctrico sin plano de apantallamiento (arriba) y con plano de apantallamiento (abajo).

Los resultados indican un leve aumento en la profundidad de penetración y un incremento significativo en la intensidad del campo eléctrico, al incluir el plano de apantallamiento de la cara inferior. El aumento en la intensidad ocurre especialmente sobre los electrodos aterrizados, y es de gran importancia en la región que comprende hasta 0.5mm de distancia respecto a la superficie del electrodo. Además, se evidencia su utilidad al minimizar efectos de dispersión del campo en el borde de los electrodos, cuando en éste se encuentran electrodos transmisores, mostrando tolerancia al ruido. Cuando en el borde se tiene un electrodo receptor, el efecto de borde tiene gran intensidad por lo que debe evitarse ubicarlos allí.

Simulación 5: Variación de la geometría del plano de apantallamiento Comparación de la intensidad de campo eléctrico al variar la geometría del plano de apantallamiento del electrodo. La figura 4.10 muestra la intensidad de campo eléctrico cuando el plano de apantallamiento corresponde a varias secciones ubicadas bajo los electrodos transmisores, y cuando es una sola capa.

La simulación indica que usar un apantallamiento por secciones puede reducir la intensidad de la señal y la profundidad de penetración, y adicionalmente, implica una radiación del campo desde la cara inferior que permitiría medir cambios en esa región, afectando las mediciones de la cara superior, escogida como región de trabajo.

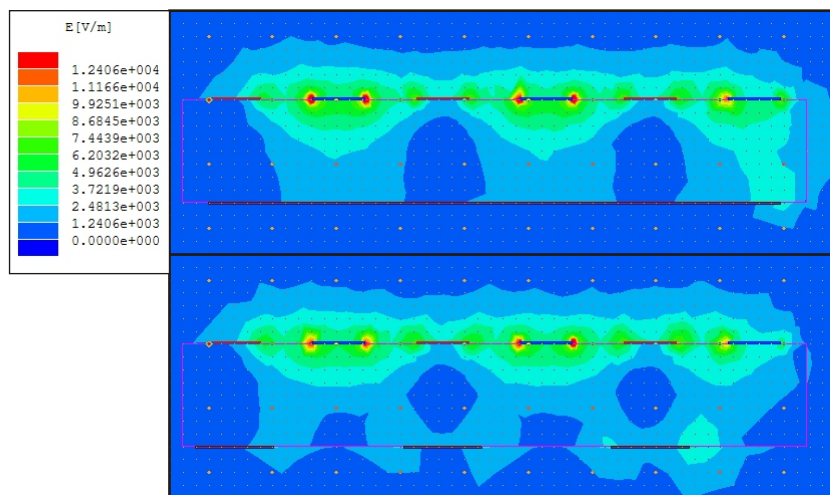


Figura 4.10: Intensidad del campo eléctrico con plano de apantallado por secciones (arriba) y con plano de apantallado de una sola capa (abajo).

Substrato del Electrodo

El metal que corresponde al electrodo como tal se encuentra sobre un sustrato que separa los electrodos transmisores y receptores, del plano de apantallado de la cara inferior. Su grosor afecta el campo eléctrico establecido; cuando es muy delgado, una parte significativa de las líneas de campo eléctrico se dirigen a la cara inferior en lugar de ir a los electrodos receptores, dependiendo de la configuración del plano de apantallado, y además, la pequeña distancia entre transmisor y plano de apantallado podría ocasionar una fuerte disminución de la intensidad de señal. Es importante recalcar que al reducir el grosor del sustrato, aumenta la profundidad de penetración, a pesar de la disminución en la intensidad de la señal [20].

Simulación 6: Variación del espesor del sustrato Comparación de la intensidad de campo eléctrico al variar el espesor del sustrato del electrodo. La figura 4.11 muestra la intensidad de campo eléctrico para $E_{\text{espesor Sustrato}} = 1,6\text{mm}$ y $E_{\text{espesor Sustrato}} = 0,1\text{mm}$.

Los resultados muestran que el tipo de apantallado usado en estos electrodos, en el que la misma señal de los electrodos transmisores corresponde a la del plano de la cara inferior, no implica una reducción de la intensidad de la señal, pues al contrario, ésta aumenta; luego, mientras el plano no se aterrice, el efecto de disminución del espesor del sustrato es positivo. Respecto a la profundidad de penetración, se observa un aumento en ésta en la región sobre los electrodos receptores, y una reducción en la región sobre los electrodos transmisores.

Espesor del conductor

El espesor del cobre ubicado en el sustrato del electrodo afecta al campo eléctrico, aunque de forma menos significativa a los demás factores mencionados.

Simulación 7: Variación del espesor de los conductores Comparación de la intensidad de campo eléctrico al variar el espesor de los conductores del electrodo. La figura 4.12 muestra la intensidad de campo eléctrico para $E_{\text{espesor Conductores}} = 35\mu\text{m}$ y $E_{\text{espesor Conductores}} = 17\mu\text{m}$.

La simulación arroja gráficas muy similares, sin embargo, se puede notar una leve reducción de la profundidad de penetración y de la intensidad del campo eléctrico al utilizar cobre de menor espesor.

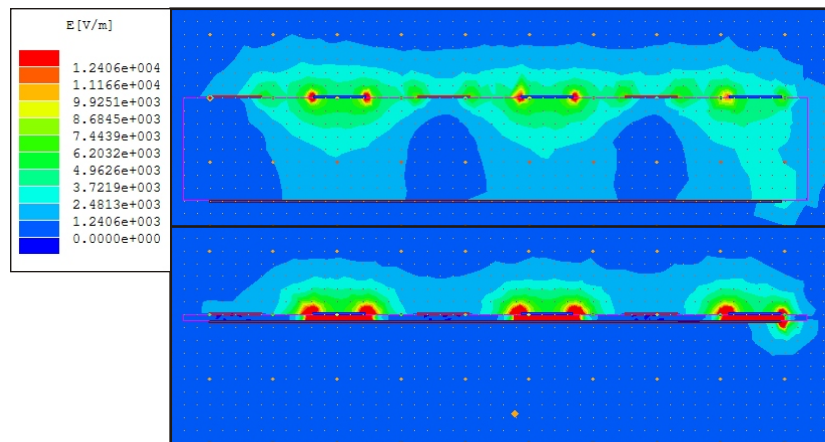


Figura 4.11: Intensidad del campo eléctrico para $EspesorSubstrato = 1,6mm$ (arriba) y $EspesorSubstrato = 0,1mm$ (abajo).

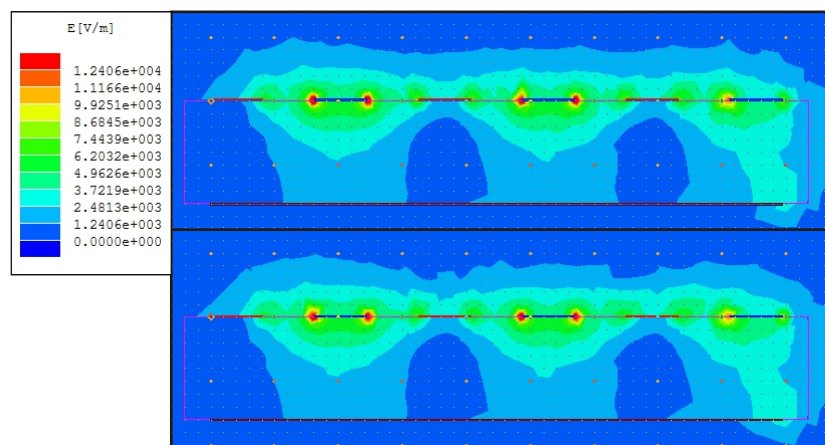


Figura 4.12: Intensidad del campo eléctrico para $EspesorConductores = 35\mu m$ (arriba) y $EspesorConductores = 17\mu m$ (abajo).

Tierra del Electrodo

En [17] se realizó una investigación respecto a los efectos que las variables relacionadas con la tierra tienen sobre la medida del IC. Las dos configuraciones propuestas corresponden a una forma en espiral, y una tipo cepillo. En éstas se comparan electrodos donde transmisor y receptor tienen el mismo ancho, con electrodos cuyo ancho del receptor ha sido reducido. El propósito de esta variación es establecer el efecto del área de la tierra sobre la medida.

La mayor sensibilidad se obtiene cuando el área de la tierra es menor. Adicionalmente, se realizaron pruebas incluyendo dos, tres y cuatro electrodos en la misma área para trabajar en el modo multiplexado de éstos, y se determinó que al aumentar el número de electrodos, disminuye la sensibilidad [17].

Simulación 8: Variación del ancho del conductor aterrizado Comparación de la intensidad de campo eléctrico al variar el ancho del conductor aterrizado. La figura 4.13 muestra la intensidad de campo eléctrico para

$anchotierra = 0,8128mm$ y $anchotierra = 0,4064mm$.

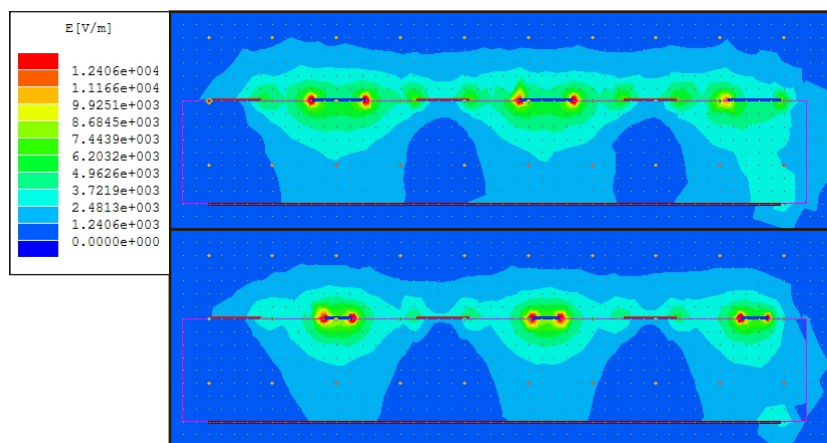


Figura 4.13: Intensidad del campo eléctrico para $anchotierra = 0,8128mm$ (arriba) y $anchotierra = 0,4064mm$ (abajo).

La simulación muestra que aunque la intensidad del campo eléctrico estrictamente sobre los electrodos receptores aumenta, al reducir el ancho de éstos, la intensidad disminuye en las demás áreas y la profundidad de penetración presenta una leve reducción.

Calidad de Contacto de Superficie

La sensibilidad de los sensores FEF a la composición del volumen directamente en contacto con la superficie de los electrodos, es elevada. Los espacios de aire o correspondientes a cualquier otro medio implican una capacitancia adicional a medir por parte del sistema, en serie con la muestra. Este efecto es mayor para longitudes de onda espaciales menores.

Efectos del Ambiente

La medición obtenida con el *E-Field IC* es susceptible a diferentes variables. La frecuencia y los parámetros de los componentes del sensor pueden variar con el tiempo o ser afectadas por variables del ambiente como la temperatura y la humedad. Además, los cambios en los electrodos como, por ejemplo, el contacto con determinadas sustancias y el paso del tiempo también pueden generar cambios en las mediciones [17].

4.3. ELECTRODOS CONSTRUIDOS

A partir de los efectos analizados en las simulaciones se construyen dos tipos de electrodos.

4.3.1. Electrodo Clase 1

En la figura 4.15 se muestra la simulación de los electrodos de la fotografía de la figura 4.14, cuyos parámetros corresponden a la tabla 4.2.



Figura 4.14: Electrodos construidos clase 1.

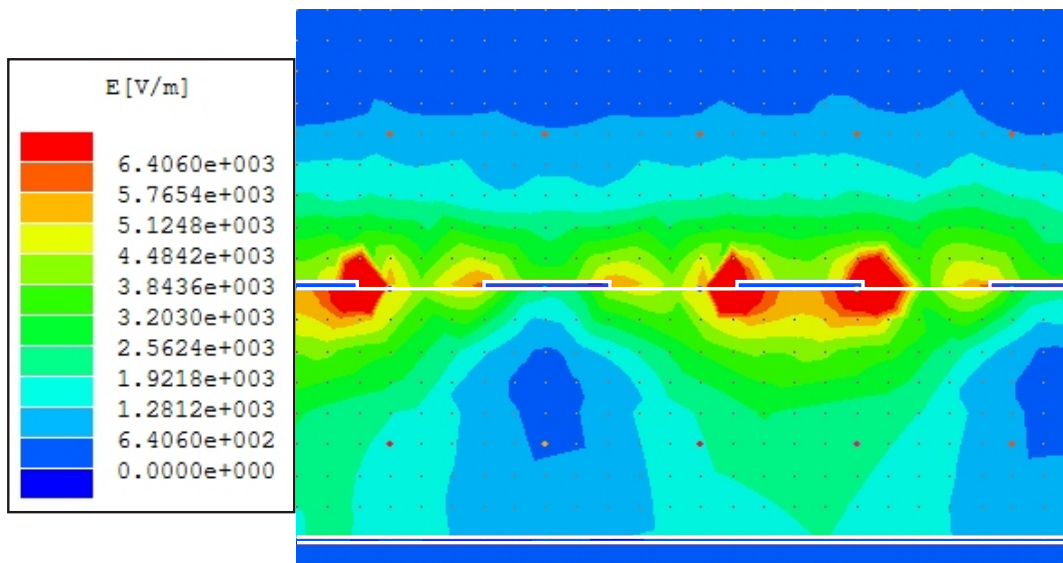


Figura 4.15: Simulación electrodos clase 1.

Parámetro	Valor
Ancho de los conductores	0.8128 mm
Espesor de los conductores	0.035 mm
Espesor del substrato	1.6 mm
Longitud de onda espacial	2.6416 mm
Tamaño	61.42mm x 53.93mm

Cuadro 4.2: Parámetros para los electrodos clase 1.

4.3.2. Electrodo Clase 2

En la figura 4.17 se muestra la simulación de los electrodos de la fotografía de la figura 4.16, cuyos parámetros corresponden a la tabla 4.3.

Los diseños realizados buscan comparar electrodos con figuras de mérito intencionalmente distintas, ya que de acuerdo a las simulaciones la optimización de todas en forma simultánea no es posible, implicando una decisión de compromiso. Los electrodos clase 1, tienen un área neta mayor con 41 “dedos” y una longitud de onda espacial menor, por lo tanto, se espera una mayor sensibilidad de medida y mayor intensidad del

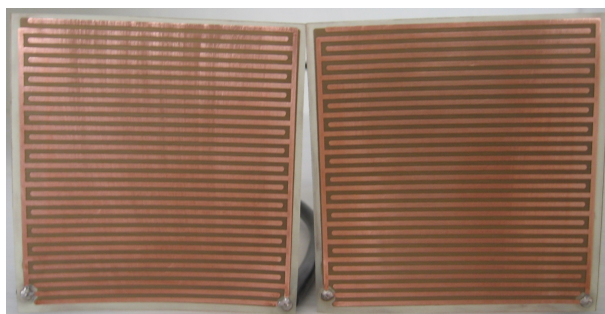


Figura 4.16: Electrodo construido clase 2.

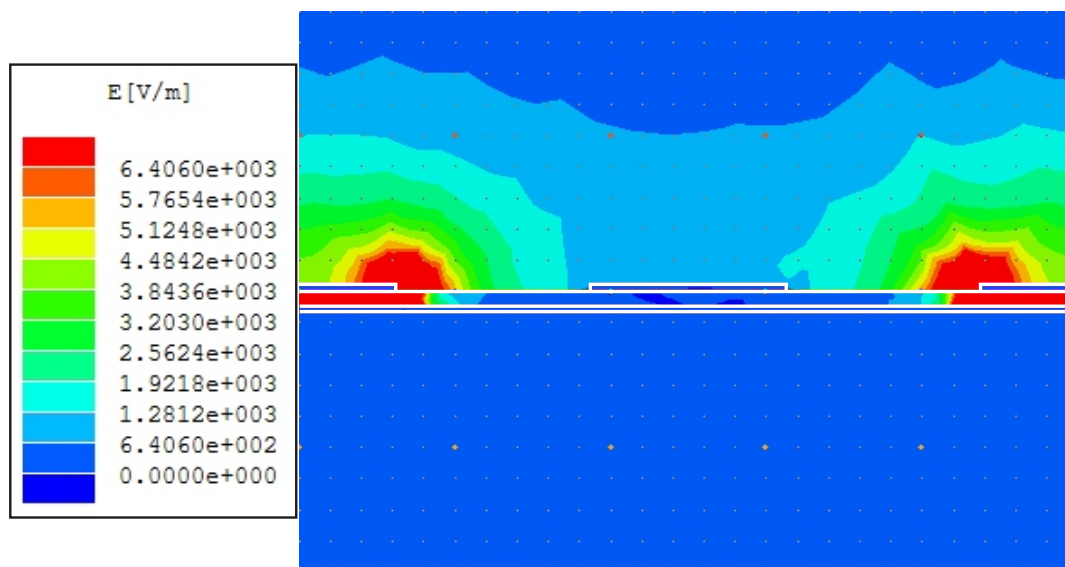


Figura 4.17: Simulación electrodo clase 2.

Parámetro	Valor
Ancho de los conductores	1.25 mm
Espesor de los conductores	0.035 mm
Espesor del sustrato	0.1 mm
Longitud de onda espacial	5 mm
Tamaño	77.23mm x 80.24mm

Cuadro 4.3: Parámetros para los electrodo clase 2.

campo eléctrico. Los electrodo clase 2, tienen 31 “dedos”, un área neta menor y una longitud de onda espacial mayor, por lo tanto, se espera una mayor profundidad de penetración. Adicionalmente, los electrodo clase 2 fueron construidos en un sustrato de espesor reducido, lo cual entregó excelentes resultados en la simulación, demostrando que este hecho permite aumentar la intensidad de campo eléctrico y la tolerancia al ruido, además de una flexibilidad que permite adaptarlo al recipiente mejorando la calidad de contacto de superficie.

Capítulo 5

CONSTRUCCIÓN DEL PROTOTIPO

5.1. RANGO DE MEDICIÓN DE CAPACITANCIA

El fabricante del *E-Field IC* indica que la tensión *LEVEL* es inversamente proporcional a la capacitancia medida. En esta sección se busca determinar cuál es la constante de proporcionalidad que relaciona la tensión y la capacitancia, y además, el rango en el que esta relación se mantiene. Estos resultados serán comparados con el caso específico de la detección del crecimiento de levadura.

5.1.1. Relación Tensión-Capacitancia del *E-Field IC*

La aplicación desarrollada tendrá un rango de trabajo específico respecto a la medición de capacitancia, por lo cual es necesario determinar el rango de capacitancia en el que la relación entre la tensión *LEVEL* del *E-Field IC* y la capacitancia medida es lineal. Para ello un capacitor variable es conectado a uno de los pines de electrodo del integrado, comparando la tensión *LEVEL* con el valor de la capacitancia en cada instante. La curva punteada de la figura 5.1 muestra esta relación.

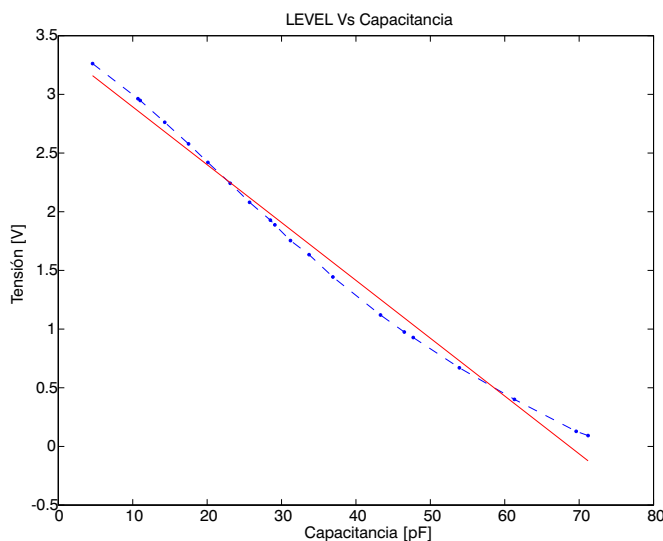


Figura 5.1: LEVEL Vs Capacitancia con $f=120\text{kHz}$.

Una linealización de la curva permite obtener la recta $y = -0,04927871197607x + 3,38614481362646$ de la

figura 5.1.

Relación Tensión-Capacitancia al variar la frecuencia

Aunque el *E-Field IC* ha sido optimizado por el fabricante para trabajar a 120kHz, una reducción de la frecuencia permite aumentar el rango lineal de medición de capacitancia. Por esta razón, se repite el proceso anterior, al forzar la frecuencia de la onda senoidal del *E-Field IC* hasta 60kHz. La curva punteada de la figura 5.2 muestra la relación.

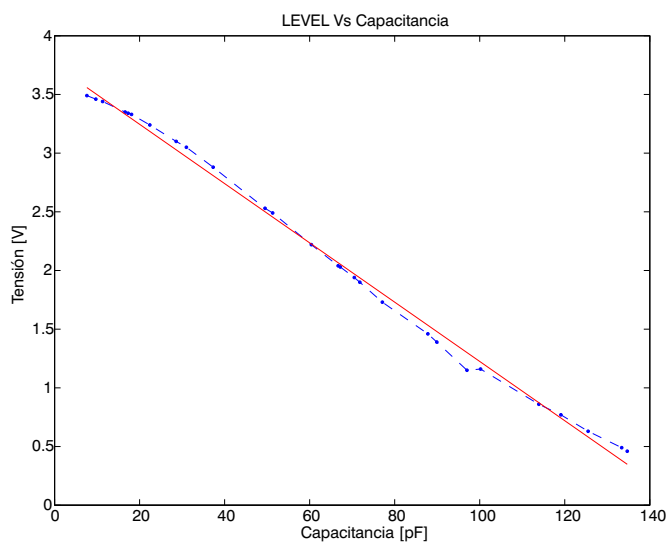


Figura 5.2: LEVEL Vs Capacitancia con $f=60\text{kHz}$.

Una linealización de la curva permite obtener la recta $y = -0,02525598083226x + 3,75061990778070$ de la figura 5.2.

5.1.2. Variación de la Capacitancia del Cultivo

Usando un equipo *RLC-Meter* se realiza una prueba para determinar las variaciones en la capacitancia debido al crecimiento del cultivo, representada por la figura 5.3. Ésta se realiza con electrodos clase 2 en modo electrodos múltiples, ya que es el caso crítico en el que se detecta la menor variación de capacitancia.

Se observa que la variación en la capacitancia debido al crecimiento es de aproximadamente 0.85pF desde fase de adaptación hasta fase exponencial.

5.1.3. Variación de tensión debido al crecimiento del cultivo

A partir de la relación tensión-capacitancia de las secciones anteriores, se comparan las medidas realizadas por el equipo de medición de impedancias y el prototipo de detección desarrollado en este trabajo. El valor de capacitancia inicial al medir con el *RLC-Meter* es de 361.2 pF. Usando el prototipo, la tensión inicial al trabajar a 120kHz es de aproximadamente 0.95V, y a 60kHz es de 2.45V. Esto indica que la capacitancia inicial es de 49.44pF y 51.50pF, respectivamente, al comparar las tensiones obtenidas con la capacitancia que les corresponde en las curvas de la sección 5.1.1. Por lo tanto, el rango de trabajo en esta aplicación estará alrededor de 50.47pF.

Para una variación de 0.85pF, específicamente para la frecuencia de 120kHz, de acuerdo a la linealización de la curva se obtendría un cambio en tensión de -41.89mV debido al crecimiento del cultivo, sin embargo, se linealiza un tramo que incluya el rango de capacitancia en el que se trabajará para obtener una mejor aproximación. El

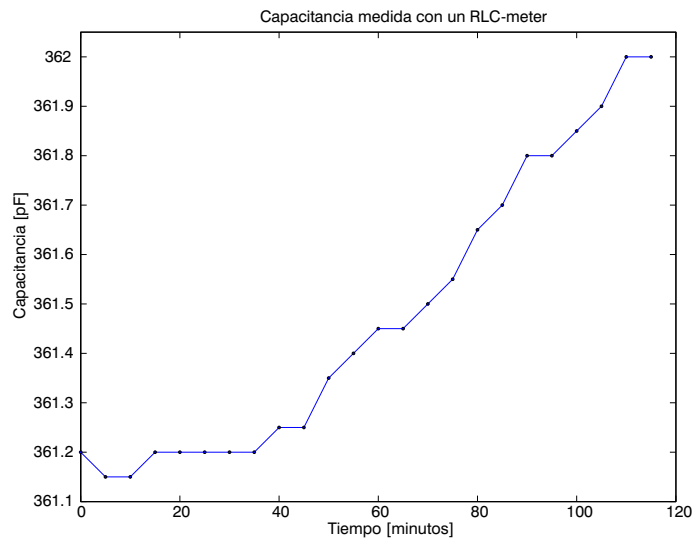


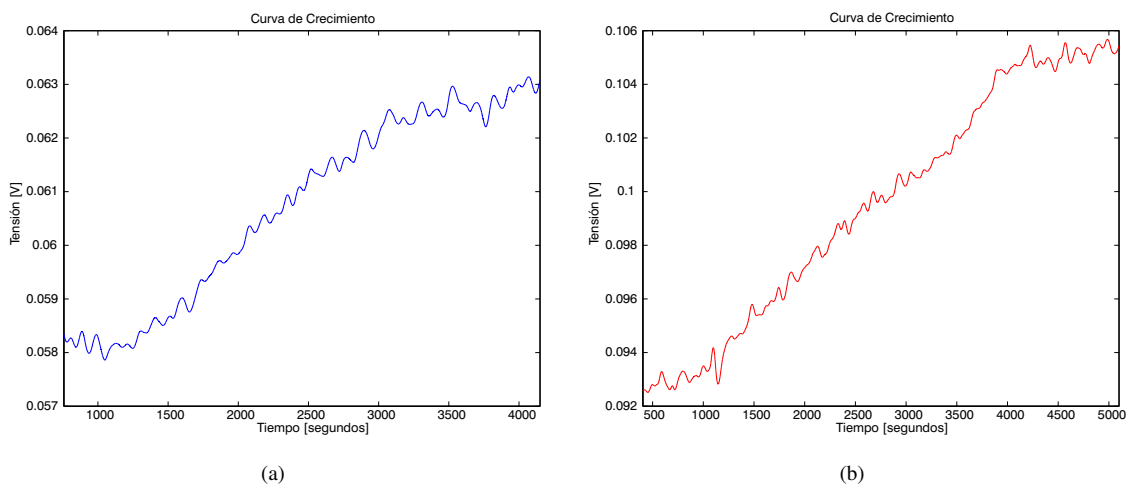
Figura 5.3: Capacitancia Vs Tiempo.

cambio finalmente es de -26.48mV . La diferencia es significativa debido a una disminución en la pendiente de la curva a partir de 35pF aproximadamente.

Para la frecuencia de 60kHz , de acuerdo a la linealización de la curva se obtendría un cambio en tensión de -21.46mV debido al crecimiento del cultivo, sin embargo, al linealizar un tramo que incluya el rango de capacitancia en el que se trabajará, se obtiene un cambio de -24.39mV .

Los valores de tensión obtenidos son muy cercanos, y aunque la curva de 120kHz muestra mayor sensibilidad, la capacitancia del cultivo lleva al sistema hacia el extremo del rango lineal de trabajo afectando este parámetro. En el caso de los 60kHz , el rango de trabajo puede tener como límite superior hasta 110pF , por lo cual a pesar de presentar una sensibilidad menor, permite obtener una variación de tensión significativa para el crecimiento del cultivo.

Para definir la frecuencia de trabajo, se detecta el crecimiento del cultivo con las dos posibles frecuencias, como se muestra en la figura 5.4.

Figura 5.4: (a) Fase de crecimiento con $f=120\text{kHz}$, (b) Fase de crecimiento con $f=60\text{kHz}$.

Para el caso de 120kHz la variación de tensión en la fase exponencial fue de aproximadamente 5.1mV, y para 60kHz, fue de 13.1mV. Por lo tanto, se confirma que la mayor sensibilidad en el rango de variación de la capacitancia de un cultivo de *Saccharomyces Cerevisiae* se obtiene al generar una onda senoidal de 60kHz en el electrodo transmisor.

5.2. HARDWARE DEL SISTEMA

A partir de la elección de la tecnología de medición, surge la necesidad de proponer una tarjeta de adquisición de datos cuyo funcionamiento comprende tres tareas básicas:

- Funcionamiento del *E-Field IC*:

El *E-Field IC* debe ser programado en esta tarjeta, de forma que se lleve a cabo la puesta en funcionamiento de la medición por campo eléctrico cuyo producto es la señal *LEVEL*.

- Adecuación de la señal *E-Field IC*:

La señal producto de la medición debe ser procesada para obtener la información deseada. Esto incluye su amplificación, ya que se desea detectar variaciones reducidas de la señal.

- Transmisión de datos:

La señal debe ser digitalizada por un microcontrolador para posteriormente enviarla a un computador donde se realice el procesamiento final de ésta. La tarjeta debe enviar la información al puerto USB del computador.

El diagrama de la figura 5.5 muestra de forma general los bloques necesarios para la ejecución de estas tareas.

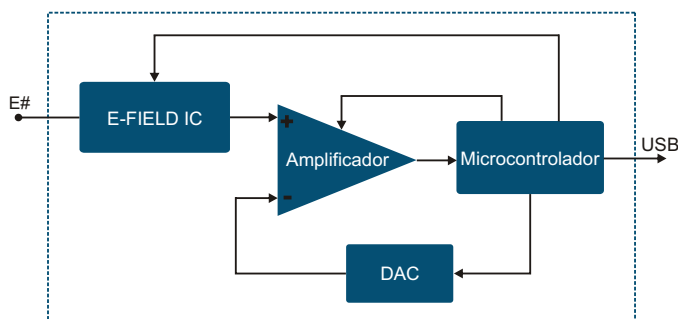


Figura 5.5: Diagrama de bloques general de la Tarjeta de Adquisición de Datos.

El microcontrolador se encarga de programar los parámetros de los dispositivos. La señal *LEVEL* entregada por el *E-Field IC* tiene un *offset* significativo, así que se utiliza un amplificador con entrada diferencial con el cual se reduce el *offset* a partir de la señal obtenida usando un convertidor digital-analógico (DAC) programado por el microcontrolador. La señal amplificada se entrega al microcontrolador para ser digitalizada y posteriormente enviada al PC.

5.2.1. Componentes del Sistema

Dispositivo de medición por campo eléctrico *E-Field IC*

Este circuito integrado se encarga de generar el campo eléctrico que permite la detección de objetos, y además, entrega la señal *LEVEL* que representa la medición realizada. La figura 5.6 muestra las conexiones necesarias para su funcionamiento:

- El *E-Field IC* se conecta a una alimentación de 12 VDC.
- Los pines E1-E7, junto al pin de apantallado *SHIELD*, permiten conectar los electrodos utilizados en el sistema.
- Un microcontrolador será utilizado para seleccionar el electrodo que se desea activar, con señales que controlan los pines A, B y C, y además, éste entregará una señal de activación del *SHIELD* cuando sea necesario.
- La señal *E-Field IC* es entregada a un amplificador con el fin de obtener la información correspondiente a pequeñas variaciones en la capacitancia.

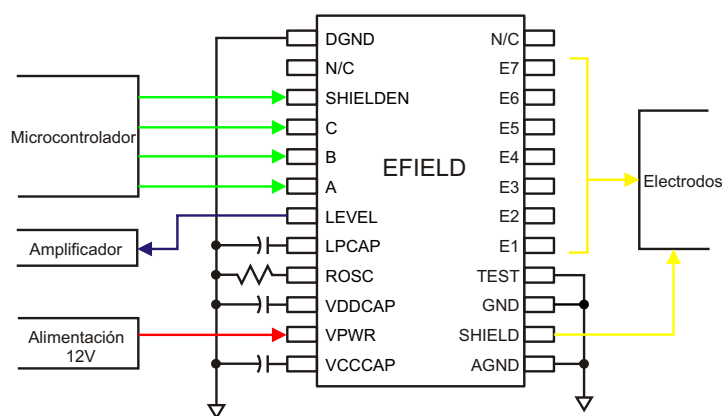


Figura 5.6: Conexión del *E-Field IC*.

Amplificador de Instrumentación

La señal *LEVEL* del *E-Field IC* corresponde a una tensión de aproximadamente 1V a 4V cuando se trabaja con un rango de capacitancia de 10pF a 70pF. Los cambios de capacitancia esperados en este proyecto se deben a la variación en la permitividad relativa de la muestra, que de acuerdo a las referencias consultadas es un cambio relativamente pequeño, por lo cual se implementa la posibilidad de amplificar la señal de forma que las variaciones se puedan detectar correctamente.

De acuerdo a lo anterior, esta aplicación requiere un esquema de amplificación que ofrezca precisión y estabilidad. Teniendo en cuenta que se esperan variaciones reducidas, pero que la amplificación está limitada por el rango del ADC con el que se debe digitalizar la información, es claro que el *offset* DC del amplificador y el ruido deben ser muy bajos para que no afecten el valor que representa la medición, y además, se requiere ajustar la ganancia que corresponda a las variaciones que se desee medir, de acuerdo al rango de trabajo del ADC del microcontrolador.

Para realizar el ajuste de la señal al rango del ADC, se eliminará el *offset* que el *E-Field IC* agrega a la señal *LEVEL* para facilitar la amplificación de ésta. Por lo tanto, la entrada del amplificador debe ser diferencial, y de acuerdo a las exigencias planteadas anteriormente, se decide utilizar un amplificador de instrumentación (INA). Este tipo de amplificadores presenta diferentes ventajas, como su alta impedancia de entrada, su entrada diferencial, el alto rechazo de las señales de modo común y el cambio de la ganancia modificando sólo una resistencia.

El amplificador de instrumentación escogido tiene las siguientes características:

- Ganancia de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, o 128, la cual es programada de forma digital, haciendo que el ajuste de acuerdo a las condiciones de operación del sistema sea fácil y rápido, pues no implica el cambio de ningún elemento de la tarjeta electrónica.
- Amplificador de deriva cero. Esto implica una auto-calibración periódica de su *offset*, la deriva del *offset* y errores de ruido de baja frecuencia. De esta forma, presenta un *offset* de entrada máximo de 15 μ V y una deriva del *offset* de entrada máxima de 50nV/ $^{\circ}$ C.
- CMRR de 80 dB para ganancia unitaria, sin embargo, se incrementa hasta 110 dB a ganancias superiores.
- Amplificador *rail-to-rail*, que puede tomar el rango total en la entrada y la salida, de 0 a 5V para esta aplicación.

Su interconexión se muestra en la figura 5.7. La señal diferencial corresponde a la señal *LEVEL* menos un *offset* entregado por un DAC. La ganancia del amplificador es programada usando un microcontrolador que controla los pines A0, A1, A2 y CS. Éste es polarizado a 5V y la señal amplificada es entregada al ADC.

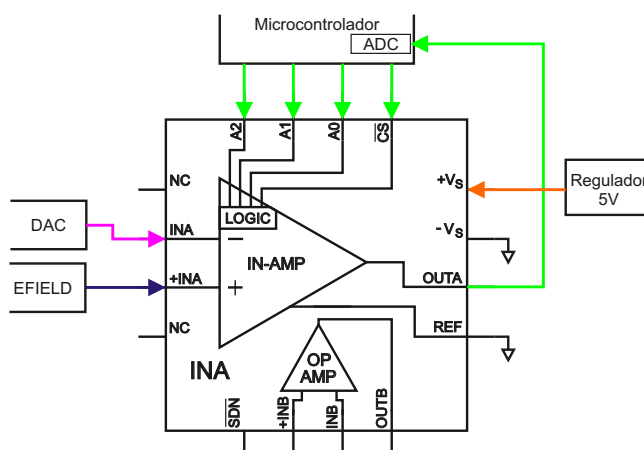


Figura 5.7: Conexión del INA.

Convertidor Digital-Analógico

Debido a la necesidad de amplificar la señal entregada por el *E-Field IC*, se decidió restar el *offset* que ésta posee, para lo cual un convertidor digital-analógico (DAC), controlado por el microcontrolador, entregará el *offset* programado al terminal negativo del amplificador de instrumentación cuya entrada diferencial permite realizar la operación mencionada.

La interconexión del DAC se muestra en la figura 5.8.

El DAC utilizado tiene una interfaz SPI (*Serial Peripheral Interface*), por lo cual será necesario usar el módulo SPI del microcontrolador, que se comportará como maestro en esta transmisión serial síncrona. El microcontrolador generará la señal de reloj SCLK, enviará los datos correspondientes al *offset* requerido por el pin MOSI (*Master Output Slave Input*) que corresponde a la entrada de datos DIN del DAC, y activará al esclavo por el pin SS (*Slave Select*) que corresponde al CS (*Chip Select*) del convertidor.

Microcontrolador

El sistema requiere un cerebro que se encargue de diferentes operaciones necesarias para el correcto funcionamiento de éste. El microcontrolador escogido para asumir estas tareas permite programar los distintos

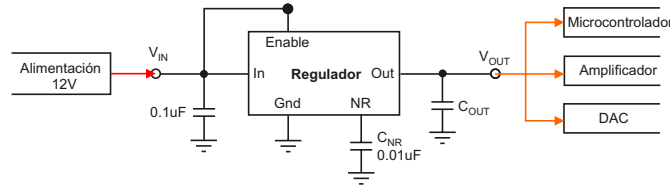


Figura 5.10: Conexión del Regulador de Tensión.

por lo cual se analiza su influencia en la obtención de la curva de crecimiento.

5.3.1. Tensión del Regulador

La variación de la tensión del regulador puede tener efectos significativos sobre los conversores del sistema. El regulador de salida fija (5V) escogido tiene una referencia de precisión *band-gap*, obteniendo aproximadamente $45\mu V_{RMS}$ de ruido en la banda de 10Hz a 100kHz. Además, tiene un lazo de control que permite calcular el ruido del regulador como se indica en la ecuación 5.1.

$$V_N = 45\mu V_{RMS} \frac{V_{OUT}}{V_{REF}} = 45\mu V_{RMS} \frac{5}{1,295} = 173,75\mu V_{RMS} \quad (5.1)$$

Conectando el capacitor de reducción de ruido C_{NR} , se logra una reducción de 3.5 veces, que resulta en $49.64\mu V_{RMS}$.

La temperatura, variaciones de corriente de salida y tensión de entrada, también pueden ocasionar cambios en la tensión de salida. De acuerdo a las especificaciones del regulador se desprecian los dos primeros efectos. La tensión de alimentación del regulador es de 12.2Vavg con tensión pico a pico máxima de 160mV. Una variación de esta magnitud indica un cambio en la tensión de salida de hasta 0.005 % aproximadamente, correspondiente a $250\mu V$.

Se asume como el peor de los casos una variación de $390\mu V$ en la tensión del regulador.

5.3.2. Convertidor Digital-Analógico

El DAC del sistema debe tener una resolución de al menos 2mV. Con una tensión de alimentación de 5V y una referencia de 2.048V entregada por una referencia de precisión *band-gap*, se utiliza un DAC de 12 bits con resolución de 1.17mV.

La no linealidad diferencial DNL (diferencia entre el cambio de amplitud real e ideal de dos códigos adyacentes) es de ± 0.4 LSB y la no linealidad integral INL (máxima desviación entre la salida y la línea entre cero y escala completa) es de ± 1.7 LSB. Además, el offset de código cero podría ser de hasta ± 24 mV. En cuanto a los requerimientos del DAC, más que precisión se requiere estabilidad, pues su única función es entregar una tensión constante durante toda la prueba de forma que se pueda realizar la amplificación. La tensión que debe entregar el DAC se programa en la rutina de calibración al inicio de la prueba, luego debería permanecer constante durante todo el experimento.

El número de bits efectivos de precisión absoluta se calcula a partir de una desviación absoluta entre el valor real e ideal de 24mV.

$$\frac{2 * 2,048}{2^{N_{eff}}} = 24mV \Rightarrow N_{eff} = 7,42bits \quad (5.2)$$

El número de bits efectivos de precisión relativa se calcula a partir de una INL máxima de 4 LSB lo cual corresponde a 4.68mV.

$$\frac{2 * 2,048}{2^{N_{eff}}} = 4,68mV \Rightarrow N_{eff} = 9,77bits \quad (5.3)$$

La referencia del DAC tiene un valor mínimo de 2.027V y un máximo de 2.069V. Tomando como el peor de los casos la existencia de una variación de 42mV en esta referencia, se obtendría un cambio en la tensión de salida de:

$$\frac{2 * 2,069}{2^{12}} - \frac{2 * 2,027}{2^{12}} = 20,51\mu V \quad (5.4)$$

5.3.3. Amplificador de Instrumentación

La variación de tensión debido al crecimiento se predijo como aproximadamente 24.39mV resultando después de las pruebas de detección en 13.1mV. Siendo este el peor de los casos se asumirá que la señal a amplificar tiene una amplitud de 14mV. El rango del ADC es de 0 a 5V, por tanto, la ganancia escogida en el INA teniendo en cuenta los valores programables de ésta, es de 128. Con este valor una variación de 14mV sería amplificada al menos hasta 1.8V, y una de 24.39mV hasta 3.1V. Aun considerando el posible error de offset del DAC, la señal se mantendrá en el rango de conversión.

A continuación se indican los principales errores en el amplificador indicados en la hoja de datos del componente.

Asumiendo un máximo de tensión de entrada de 14mV en el peor de los casos, este valor determina el valor de fondo de escala respecto al cual se calculan los errores.

La tensión de offset referida a la entrada para una ganancia de 128V/V es de 15.23 μ V, la cual corresponde a 1087.86 ppm y la corriente de offset es de 100pA por lo cual su efecto en la suma de errores se desprecia. El máximo error en la ganancia del amplificador es de 8000 ppm y la máxima no linealidad en la ganancia es de 5 ppm. El ruido de 0.1Hz a 10Hz es de 0.7 μ V que corresponde a 50 ppm. El total calculado corresponde a 9142.86 ppm. Este valor se puede comparar con el valor en ppm que corresponde a la resolución de un convertidor de determinada resolución. El total correspondería a una resolución entre 6 y 7 bits.

En el esquema propuesto para este trabajo se eliminarán los errores debido al offset y el de ganancia podría ajustarse por software, para obtener un total que se reduce a 55 ppm correspondiente a aproximadamente 14 bits de resolución.

El error que incluye el DAC debido a la variación en su referencia puede considerarse como una fuente de ruido que sería amplificada en el INA. La cuantificación del error es de 1465 ppm lo cual degradaría el esquema de adecuación de señal a una resolución de 10 bits.

5.3.4. Convertidor Analógico-Digital

A partir de los análisis anteriores se plantea la necesidad de escoger un ADC de más de 10 bits, por lo cual se elige uno de 12 bits cuya referencia es 5V, y por lo tanto, tiene una resolución de 1.22mV. La no linealidad diferencial DNL es de ± 1.75 LSB y la no linealidad integral INL es de ± 1.5 LSB. Además, el error de escala cero podría ser de hasta ± 6 LSB.

El número de bits efectivos de precisión absoluta se calcula a partir de una desviación absoluta entre el valor real e ideal de 7.32mV.

$$\frac{5}{2^{N_{eff}}} = 7,32mV \Rightarrow N_{eff} = 9,42bits \quad (5.5)$$

El número de bits efectivos de precisión relativa se calcula a partir de una INL máxima de 4 LSB lo cual corresponde a 4.88mV.

$$\frac{5}{2^{N_{eff}}} = 4,88mV \Rightarrow N_{eff} = 10bits \quad (5.6)$$

Los cambios en la tensión de referencia del ADC podrían tener efectos sobre la correcta conversión de los datos.

$$\frac{1}{2^{12}} * 390\mu V = 95,21nV \quad (5.7)$$

Sin embargo, la variación de tensión no tiene un efecto significativo sobre la resolución del ADC.

Capítulo 6

SOFTWARE DEL SISTEMA

Después de determinar los componentes del hardware del sistema, es necesario establecer el software a utilizar. Este capítulo se divide en dos secciones: Programación del Microcontrolador y LabVIEW.

6.1. PROGRAMACIÓN DEL MICROCONTROLADOR

Las funciones que debe cumplir el microcontrolador son:

- Transmitir la información al DAC del sistema usando un módulo SPI .
- Establecer el tiempo de muestreo de las mediciones del *E-Field IC* usando un módulo *Timer*.
- Programar la ganancia del amplificador de instrumentación.
- Digitalizar la señal amplificada usando un convertidor analógico-digital (ADC) .
- Programar la activación de un electrodo específico.
- Activar/Desactivar la opción *SHIELD* del *E-Field IC*.
- Recibir y transmitir la información a un computador usando un módulo USB.

Su programación se explica a partir del diagrama de flujo de la figura 6.1.

Inicialización El inicio del código corresponde a la ejecución de funciones que permiten inicializar el microcontrolador en términos generales, el reloj del bus, el ADC, el INA, el *E-Field IC*, el DAC y el módulo USB del microcontrolador.

Posteriormente, inicia el *for* infinito de funcionamiento del sistema.

Chequear USB La transmisión de datos del sistema se lleva a cabo a través del módulo USB del microcontrolador, que corresponde a la especificación USB 2.0 *full-speed* de 12 Mbps. La transferencia es tipo *bulk* y la interfaz comprende 7 *endpoints* (secciones del periférico que actúan como fuentes o receptores de datos), de los cuales se utiliza el *endpoint* 3 (EP3), de 8 bytes y dirección *out*, para la recepción de los datos que envía el *host* (computador en este caso), y el *endpoint* 4 (EP4), de 8 bytes y dirección *in*, para el envío de los datos hacia el *host*.

Esta parte del código ejecuta una función encargada de verificar el estado del módulo USB.

La rutina principal de funcionamiento puede dividirse en las tres subsecciones siguientes.

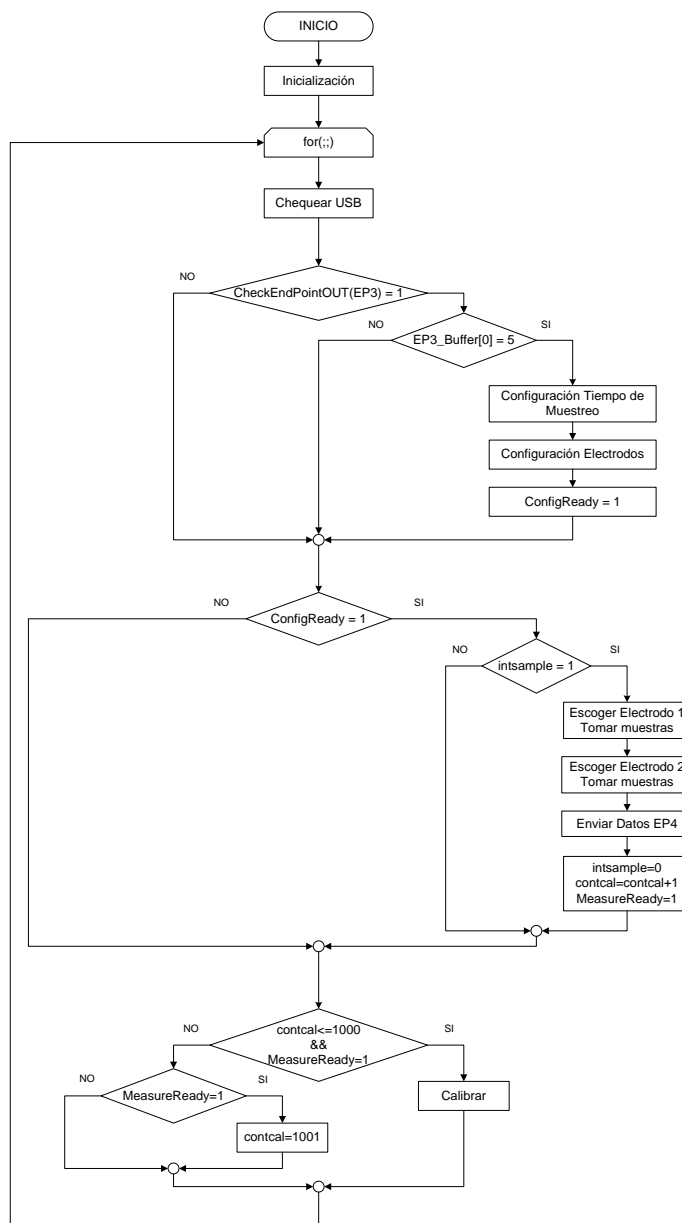


Figura 6.1: Diagrama de Flujo.

6.1.1. Recepción de datos

La primer condición a evaluar corresponde a la función *CheckEndPointOUT(EP3)*, la cual entrega un 1 cuando el EP3 ha recibido datos del *host*. Cuando esto ocurra, un nuevo condicional verifica que el primer byte del EP3 sea un 5, lo cual indicaría que la configuración del sistema en el *host* se ha completado correctamente. En este caso, a partir de la información contenida en los demás bytes, se configura el módulo *timer* del microcontrolador para establecer una interrupción, cuya bandera es *intsample*, que señale que es momento de enviar datos al *host* de acuerdo al tiempo de muestreo configurado en éste. Adicionalmente, se obtiene la información que indica cuáles de los electrodos disponibles en el sistema serán utilizados. Finalmente se activa la bandera *ConfigReady*,

que indica que la configuración con los datos recibidos ha sido realizada.

6.1.2. Envío de datos

El condicional de esta subsección hace referencia a la bandera *ConfigReady*. Si la configuración no se ha completado, la rutina de envío de datos no se ejecuta aún. En caso contrario, la bandera *intsample* indica el proceso a seguir. Si es momento de enviar información (*intsample=1*), se debe escoger el primer electrodo y tomar la muestra en el ADC almacenándola en el EP4, y posteriormente, se escoge el segundo, y se almacena en los siguientes bytes del mismo *endpoint*. Este proceso es necesario ya que el dispositivo de medición por campo eléctrico funciona de forma multiplexada, es decir, se selecciona un electrodo a la vez. Cuando se han digitalizado los datos, se indica que el envío ya puede realizarse. Finalmente se borra la bandera *intsample*, se incrementa un contador de puntos de calibración (*contcal*) y se activa una bandera que señala que ya se ha realizado el primer muestreo de la tensión del *E-Field IC* (*MeasureReady*).

6.1.3. Calibración del sistema

La adecuación de la señal *LEVEL* es realizada por el sistema de forma que los usuarios no tengan la necesidad de hacer un ajuste de parámetros. Ésta se lleva a cabo usando las primeras mil muestras que toma el sistema. Cuando las muestras no superen los 1000 puntos y ya haya iniciado la toma de éstas, se ejecuta la función de calibración. Ésta consiste en la selección de la menor y la mayor de las muestras, para establecer el rango de tensión de la señal *LEVEL*, y así determinar el *offset* y la ganancia más apropiados para la adecuación de la señal. Si la toma de muestras ya ha iniciado, pero ha superado los 1000 puntos, el contador se lleva a 1001 de forma que no se ejecute la calibración nuevamente.

6.2. LabVIEW

La interfaz del sistema está desarrollada en LabVIEW y corresponde a una programación basada en eventos.

La tarjeta de adquisición de datos se conecta al sistema como un dispositivo USB. Su comunicación con LabVIEW se facilita al utilizar NI VISA (*Virtual Instrument Software Architecture*), que funciona como un estándar que incluye *drivers* y herramientas diseñadas para manejar la interfaz USB, entre muchas otras.

6.2.1. Panel Frontal

A continuación se describen las páginas del panel frontal.

Principal

La página de inicio del VI se muestra en la figura 6.2 y permite escoger el dispositivo USB correspondiente al sistema y abrir su sesión. Además, allí se encuentran los pulsadores de Configuración y DAQ (Adquisición de Datos).

Configuración

En esta página se selecciona el electrodo del sistema que se encarga de la medición y el que funciona como referencia. Este esquema de funcionamiento se explica en el siguiente capítulo.

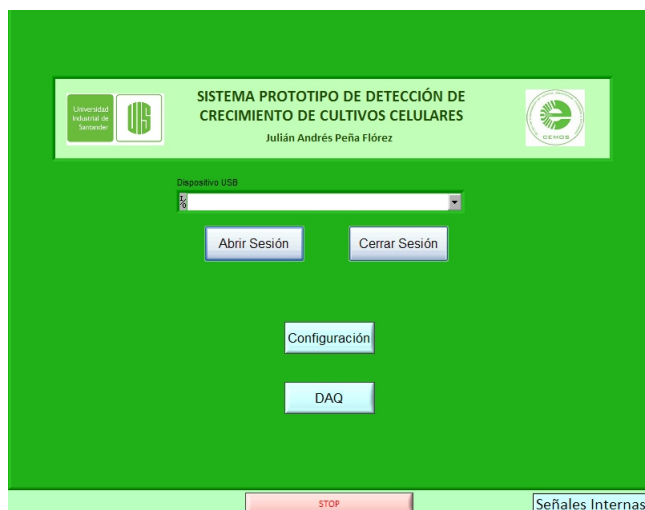


Figura 6.2: Página Principal.



Figura 6.3: Configuración Inicial.

Lectura

En esta página del panel se grafican los datos leídos correspondientes a la curva de crecimiento (diferencia entre las señales de los electrodos), y se muestran a su vez los valores calculados para la velocidad de crecimiento. Existen dos pulsadores que permiten iniciar o detener este proceso de lectura.

Señales

Esta es una página adicional, que permite observar la señal de cada electrodo de forma independiente, y se accede a ella con el pulsador “Señales Internas”.

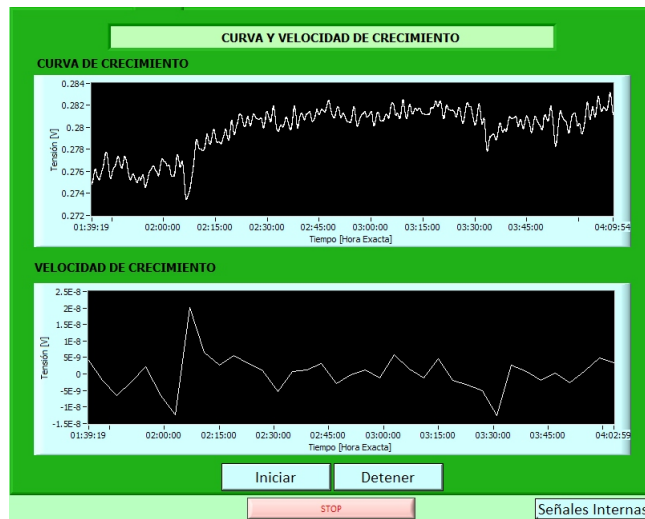


Figura 6.4: Lectura de Datos.

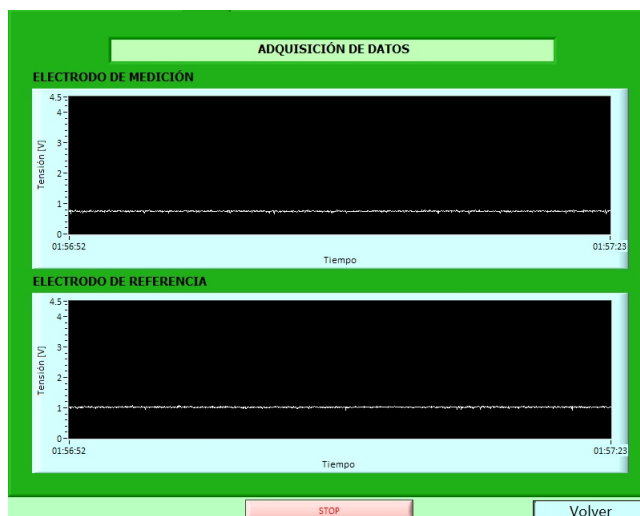


Figura 6.5: Señales Internas.

6.2.2. Diagrama de Bloques

A continuación se explican los 8 eventos que componen el VI (*Virtual Instrument*) y se encuentran en el diagrama de bloques.

Evento *OpenSession*

Abre la sesión del dispositivo USB usando el bloque *VISA Open*. En el panel frontal de la figura 6.2, se activa con el pulsador “Abrir Sesión”.

Evento *CloseSession*

Cierra la sesión del dispositivo USB usando el bloque *VISA Close*. En el panel frontal de la figura 6.2, se activa con el pulsador “Cerrar Sesión”.

Evento *BulkOut*

Envía los ocho bytes hacia el EP3 del microcontrolador usando el bloque *VISA Write*.

Evento *Configuración*

En el panel frontal de la figura 6.2, se activa con el pulsador “Configuración”. Este evento presenta la pantalla de configuración del sistema donde se pueden escoger los electrodos a usar. Su página en el panel frontal corresponde a la figura 6.3.

Evento *Ok*

En el panel frontal de la figura 6.3, se activa con el pulsador “Ok”. Construye el arreglo que constituye los bytes a enviar al microcontrolador. Tal como se observa en la figura 6.6, está compuesto por el indicador de configuración, el tiempo de muestreo, el número del electrodo de referencia y el número del electrodo de medición. En este evento se indica el paso a la página principal nuevamente, y además se activa el evento *BulkOut* usando un nodo de propiedad.

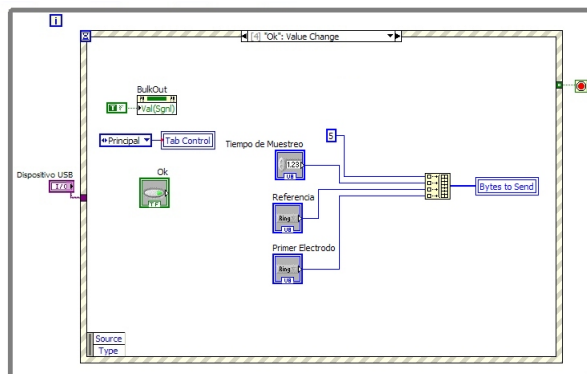


Figura 6.6: Evento “Ok”.

Evento *DAQ*

En el panel frontal de la figura 6.2, se activa con el pulsador “DAQ”. Este evento presenta la pantalla de lectura del sistema donde se pueden observar las gráficas de las medidas obtenidas en tiempo real. Su página en el panel frontal corresponde a la figura 6.4.

Evento *Start*

En el panel frontal de la figura 6.4, se activa con el pulsador “Iniciar”. Constituye el evento encargado de activar la recepción de la información, la cual se lleva a cabo en un ciclo *while* que se detiene con el pulsador “Detener”. Los ocho bytes del EP4 del microcontrolador son leídos usando el bloque *VISA Read*, y la figura 6.7, muestra que los primeros cuatro bytes son procesados de forma que se pueda realizar la conversión digital a analógica en LabVIEW, teniendo en cuenta que el ADC del microcontrolador es de 12 bits y que su polarización

es de 5V, de forma que se pueden obtener las gráficas correspondientes. Los dos últimos bytes, contienen el valor de la ganancia y el offset que resultaron de la calibración.

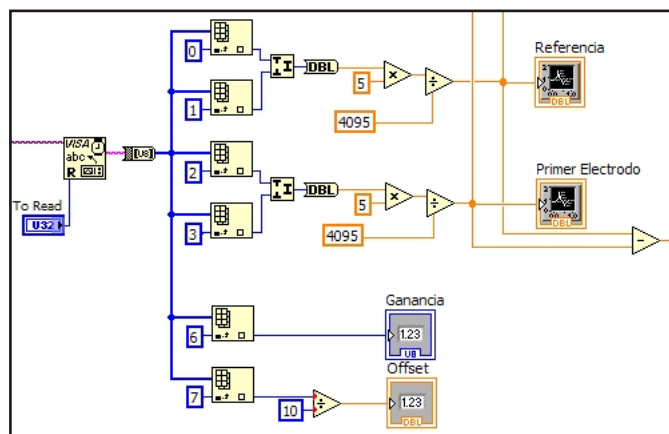


Figura 6.7: Lectura de los datos.

Además de recibir los datos y graficarlos, este evento se encarga del procesamiento de señales, que incluye el filtrado y el cálculo del parámetro de velocidad. Estos casos se explican en el capítulo siguiente.

Evento *Stop*

Detiene la ejecución del VI. Su pulsador se encuentra fuera de las páginas de forma que se pueda activar en cualquier momento.

Capítulo 7

PROCESAMIENTO DE SEÑALES

7.1. ESTRATEGIA DE DETECCIÓN: SEÑAL DE MEDICIÓN Y DE REFERENCIA

En esta sección se pretende profundizar en la estrategia de detección del crecimiento a partir de la presentación de las señales involucradas en el proceso.

7.1.1. Establecimiento de la Referencia

Los electrodos del sistema no responden únicamente a los cambios en el cultivo celular, éstos pueden medir efectos del medio que los rodea, y además, no están en contacto directo con la levadura, lo cual implica una detección del recipiente que los separa de ésta y demás objetos. Las dos primeras gráficas de la figura 7.1 muestra las señales que corresponden a dos electrodos que se encuentran sobre una mesa, sin detectar ningún objeto en particular, del tipo electrodo único, y las dos primeras de la figura 7.2, el mismo caso para el tipo electrodos múltiples.

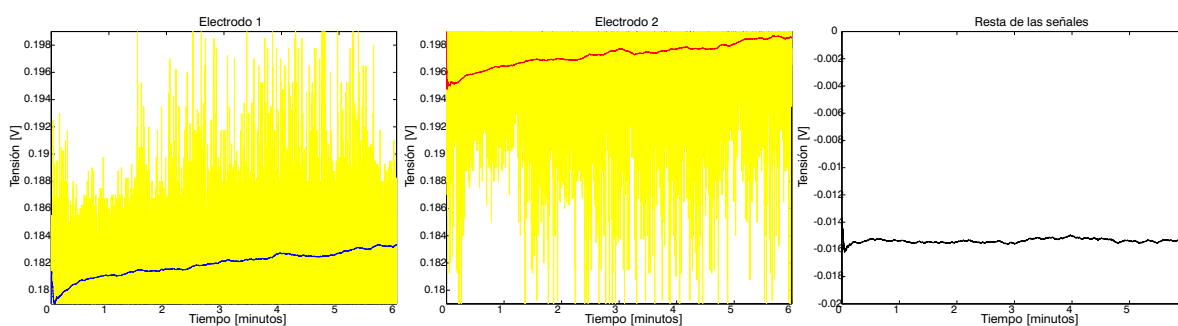


Figura 7.1: Señal original y filtrada de cada uno de los electrodos, tipo electrodo único.

Los efectos mencionados se captan de forma distinta de acuerdo a la geometría de los electrodos, por lo tanto, con el objetivo de minimizar estos efectos, se establece el uso de un electrodo de referencia. Este electrodo deberá estar en el mismo medio en el que se encuentra el electrodo de medición, sin acercarse al cultivo celular. De esta manera, los cambios debido al ambiente y al electrodo como tal, serán restados de la señal que detecta el crecimiento del cultivo, de forma que se eliminen esas variaciones, y sólo se mantengan las que corresponden a la evolución de la levadura. En la última gráfica de cada una de las figuras 7.1 y 7.2, se observa la resta entre las

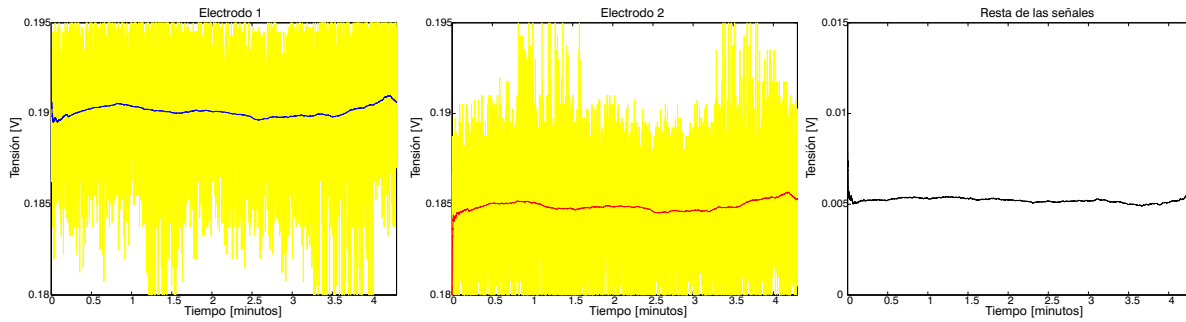


Figura 7.2: Señal original y filtrada de cada uno de los electrodos, tipo electrodos múltiples.

señales de los electrodos para cada caso. En un esquema de electrodo único, se presentan mayores variaciones, luego la necesidad de este esquema es mayor.

7.1.2. Señales asociadas al sistema

El *E-Field IC* tiene siete canales disponibles para el manejo de electrodos de medición de forma multiplexada. La estrategia planteada para corregir errores correspondientes a efectos ambientales es el uso de dos electrodos cuyas mediciones se restan, implicando el establecimiento de un electrodo de referencia y uno de medición. La señal *LEVEL* será entonces una señal multiplexada en el tiempo que contiene la información correspondiente a los dos electrodos. La figura 7.3 muestra las señales del sistema asociadas al hardware de éste.

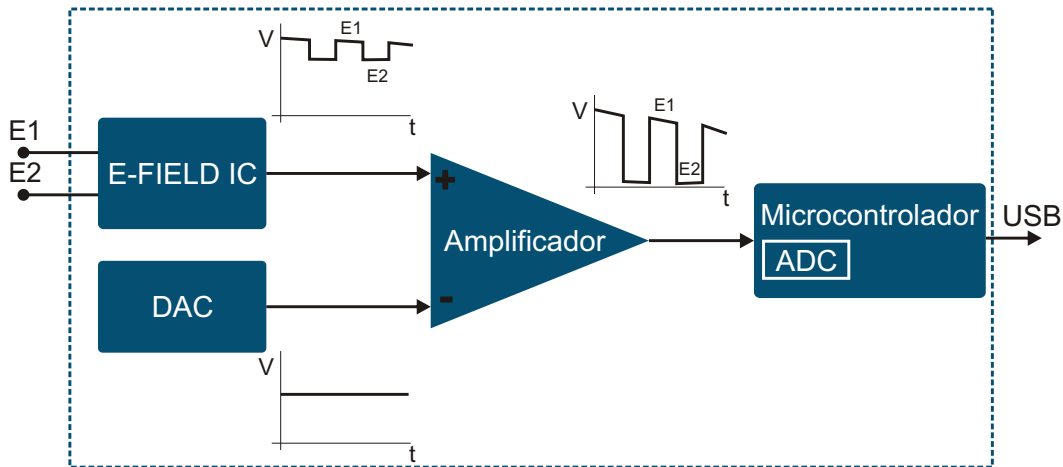


Figura 7.3: Hardware y señales del sistema.

Señal *LEVEL* El fabricante indica que la selección de cada electrodo debe realizarse por al menos 2.5ms antes de considerar la medición como válida, por lo tanto, la duración de la medición para un sólo electrodo se fija en un mínimo de 3ms. Existe una diferencia significativa entre los valores medidos por cada uno de los electrodos, que generalmente puede ser de hasta 100mV, y resulta en su forma escalonada en el tiempo debido a la multiplexación. Sin embargo, la señal *LEVEL* es esencialmente una señal DC.

Señal Amplificada La señal multiplexada *LEVEL* tiene un nivel de *offset* bastante significativo, el cual se reduce antes de amplificar la señal. La señal que entrega el INA abarca un rango de tensión mayor, para mejorar

la resolución del sistema.

7.1.3. Muestreo de la señal

Teniendo en cuenta el comportamiento del cultivo celular seleccionado y las características de su crecimiento, explicadas en el siguiente capítulo, es claro que el tiempo en el que se obtiene la curva de crecimiento está en el orden de horas, y los cambios apreciables en éste son significativos en el orden de minutos. Por lo tanto, el valor escogido como tiempo de muestreo en LabVIEW, que indica cada cuánto tiempo el *host* pide los datos, puede ser reducido de acuerdo a la aplicación, para cada una de las señales muestreadas.

Siendo 30ms un tiempo suficiente para detectar los cambios producidos en el cultivo, se escoge como el tiempo en el cual el *host* tomará los datos del dispositivo. Es importante indicar que el tener dos señales de continua multiplexadas en tiempo permite hacer el muestreo de las dos sin requerir una frecuencia elevada de funcionamiento del ADC. La demultiplexación de las señales se realiza directamente en el microcontrolador.

7.2. FILTRADO

El principio de funcionamiento del sistema y la radiación del campo eléctrico usando electrodos, implica una sensibilidad que no es exclusiva del cultivo celular, pues el prototipo puede captar diferentes cambios relacionados con el medio que lo rodea en forma general. Por tanto, en esta sección se analiza la necesidad del filtrado de la información. Las variaciones en la señal *LEVEL* debido al aumento de levadura se dan en el orden de los milivolts, por lo tanto es necesario eliminar el ruido de la señal que impide observar estos cambios.

Para proponer un esquema de filtrado del sistema es importante tener en cuenta varios aspectos.

- Señal *LEVEL*: corresponde a un nivel DC que representa la variación de la amplitud de la onda senoidal radiada.
- Funcionamiento de *E-Field IC*: Funciona de forma multiplexada, es decir, la señal *LEVEL* corresponde al electrodo seleccionado en el momento.
- Tiempo de espera: El fabricante indica que después de seleccionar uno de los electrodos, es necesario esperar un tiempo mínimo de 2.5ms antes de asumir la tensión *LEVEL* como válida, exigiendo un tiempo de estabilización.
- Tiempo de muestreo en LabVIEW: Indica cada cuánto tiempo el *host* pedirá al sistema que le envíe los datos.

Teniendo en cuenta el comportamiento del cultivo celular seleccionado y las características de su crecimiento, explicadas en el siguiente capítulo, es claro que el tiempo en el que se obtiene la curva de crecimiento está en el orden de horas, y los cambios apreciables en éste son significativos en el orden de minutos. Por lo tanto, el valor escogido como tiempo de muestreo en LabVIEW es de 30ms, suficiente para detectar los cambios producidos en el cultivo.

Además, se ha programado un tiempo de espera de 3ms para el cambio en la selección de los electrodos.

La demultiplexación de la señal *LEVEL* se realiza de forma digital de acuerdo a la figura 6.7, y se hace uso de las herramientas de LabVIEW para realizar un filtrado digital de ésta. De acuerdo a las características de las señales, se ha determinado la utilización de un filtro Butterworth pasabajas de orden 4 y frecuencia de corte 0.01Hz.

El bloque correspondiente al filtro exige la construcción de arreglos con los datos obtenidos para crear una onda con el bloque *Build Waveform*. Por lo tanto, el filtro se ubica en una estructura *case* de forma que cada determinado tiempo se filtrará un arreglo de datos distinto, realizando un filtrado on line, en el cual se ha decidido la construcción de arreglos de 8 puntos, correspondientes a 0.24s de tiempo. Esta determinación implica

que cada 0.24s el filtro toma las componentes de interés (esencialmente la de continua) para representar la señal de medición, eliminando el ruido observado en la señal original pero detectando aún los cambios que implica el crecimiento de la levadura. La figura 7.4 muestra la programación en LabVIEW descrita.

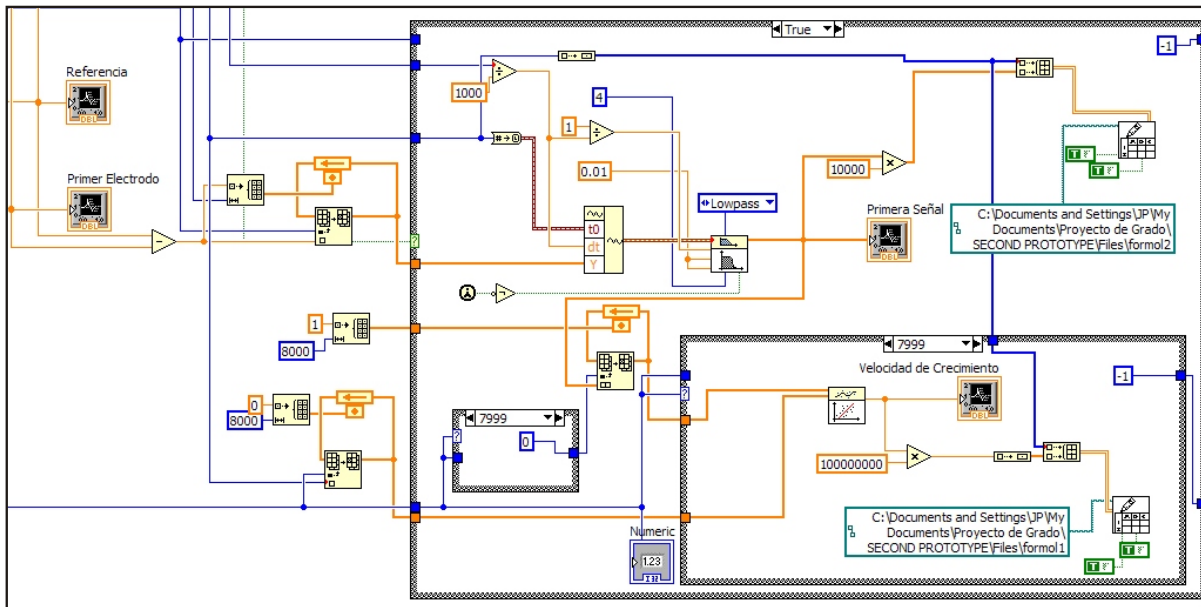


Figura 7.4: Filtrado de la señal.

El retardo incluido debido al filtrado, es tolerable en esta aplicación debido a las características de crecimiento del cultivo.

7.3. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

La velocidad de crecimiento del cultivo celular será expresada en las unidades volts por segundo [V/s]. Es importante aclarar que este parámetro es proporcional a lo que en el área de biología se conoce como tasa de crecimiento μ , mas no son iguales, ya que el sistema propuesto se clasifica como un método indirecto, lo cual implica la obtención de una curva patrón para relacionarlas, tal como se hace al usar otros métodos de este tipo que miden parámetros como por ejemplo la absorbancia.

El cálculo de este parámetro se realiza en LabVIEW, haciendo una linealización de la señal obtenida cada 4 minutos, por lo cual el proceso se realiza en la estructura *case* interna de la figura 7.4. El bloque de linealización entrega la pendiente de la recta ajustada, y este valor se toma como velocidad de crecimiento. La figura 7.5 muestra una señal y su respectiva velocidad de crecimiento obtenidas en el VI de LabVIEW.

Finalmente, en la figura 7.6, se puede observar una curva de crecimiento de levadura junto a su velocidad de crecimiento; esta última toma valores altos durante la fase exponencial, mientras en la fase estacionaria presenta valores positivos y negativos de menor valor.

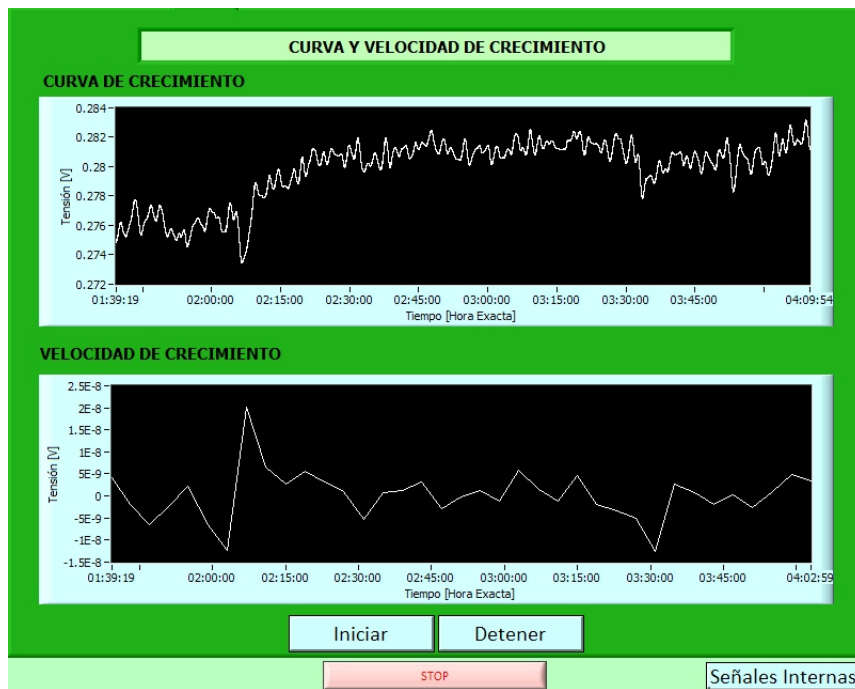


Figura 7.5: Cálculo de la velocidad de crecimiento.

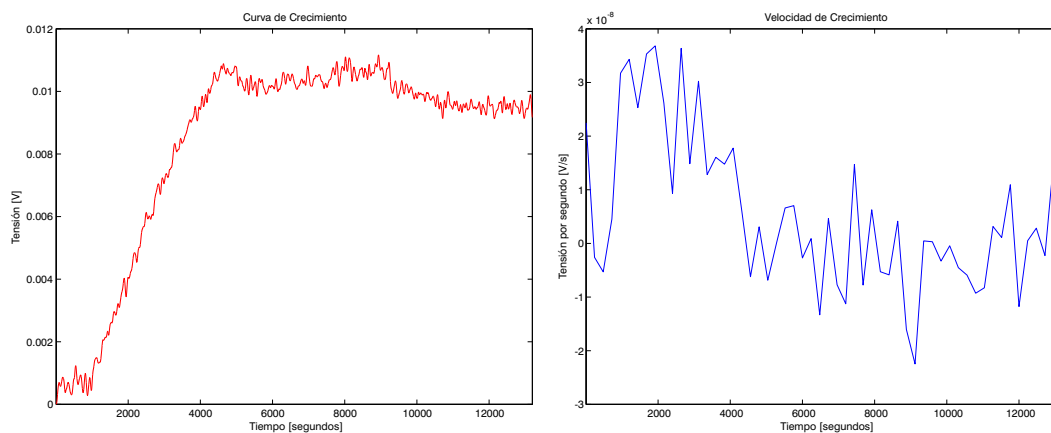


Figura 7.6: Curva y velocidad de crecimiento.

Capítulo 8

PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO

Las siguientes pruebas tienen como objetivo comprobar el buen funcionamiento del sistema propuesto, al variar las condiciones del cultivo celular de forma que los cambios realizados se detecten en el prototipo, y al comparar los resultados con estudios realizados en esta área.

El crecimiento de la levadura es rápido y significativo. En la figura 8.1 se muestran imágenes de su crecimiento cada 6 minutos.



Figura 8.1: Imágenes del crecimiento de la levadura.

En la figura 8.2 se muestran imágenes tomadas cada 12 minutos, después de alcanzar el máximo nivel observable en el recipiente.

En la figura 8.3, se muestra el recipiente con el electrodo de medición, a la izquierda un electrodo clase 1, y a la derecha, un clase 2.



Figura 8.2: Imágenes de la levadura después de ocupar el máximo volumen del recipiente.

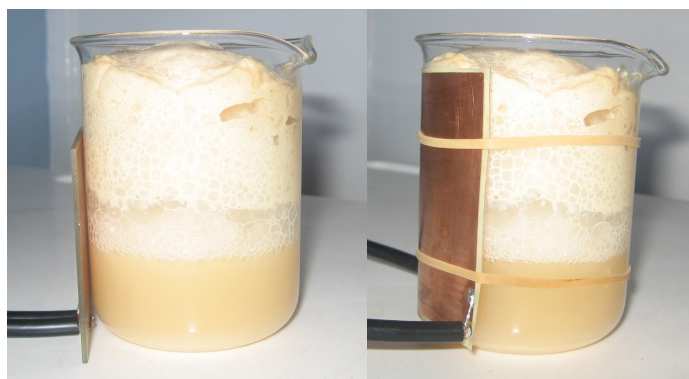


Figura 8.3: Recipiente del cultivo con electrodo clase 1 (izquierda) y electrodo clase 2 (derecha).

8.1. Selección de los electrodos

A partir de las consideraciones de diseño se han construido dos pares de electrodos, con características diferentes, que se pueden utilizar en dos modos distintos. A continuación se muestran los resultados para los diferentes casos, al detectar el crecimiento de 7 gramos de levadura en 100ml de agua con 7 gramos de azúcar.

8.1.1. Electrodos Clase 1

La figura 8.4 muestra los resultados obtenidos al realizar la detección con el tipo electrodo único y el de electrodos múltiples.

La curva de crecimiento de la izquierda muestra claramente el comportamiento del cultivo celular, mientras la de la derecha indica que existe la detección, mas no es una buena aproximación al crecimiento de la levadura, lo cual se explica dada la corta longitud de onda espacial de estos electrodos, que de acuerdo a los resultados, afecta

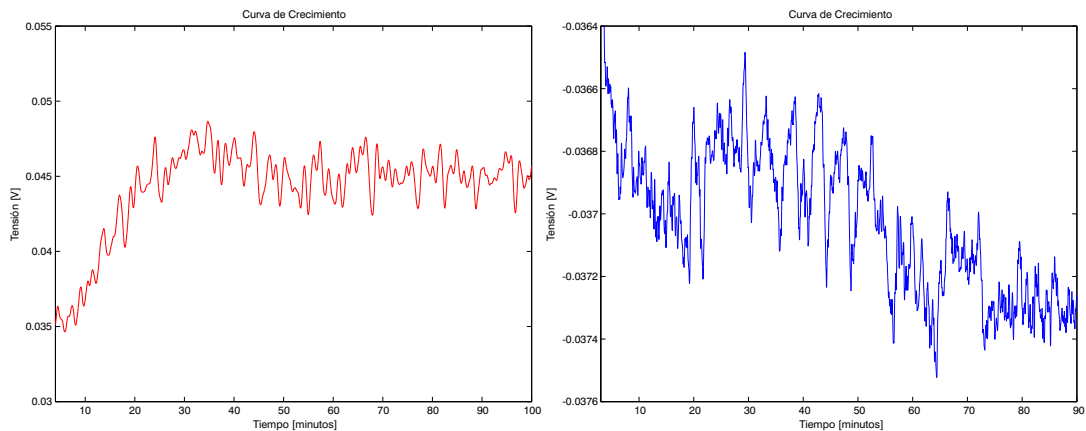


Figura 8.4: Clase 1: Detección de tipo electrodo único (izquierda) y tipo electrodos múltiples (derecha).

radicalmente su profundidad de penetración. Por lo tanto, estos electrodos sólo serán utilizados en configuración de electrodo único.

8.1.2. Electrodo Clase 2

La figura 8.5 muestra los resultados de la detección con los dos tipos de sensores.

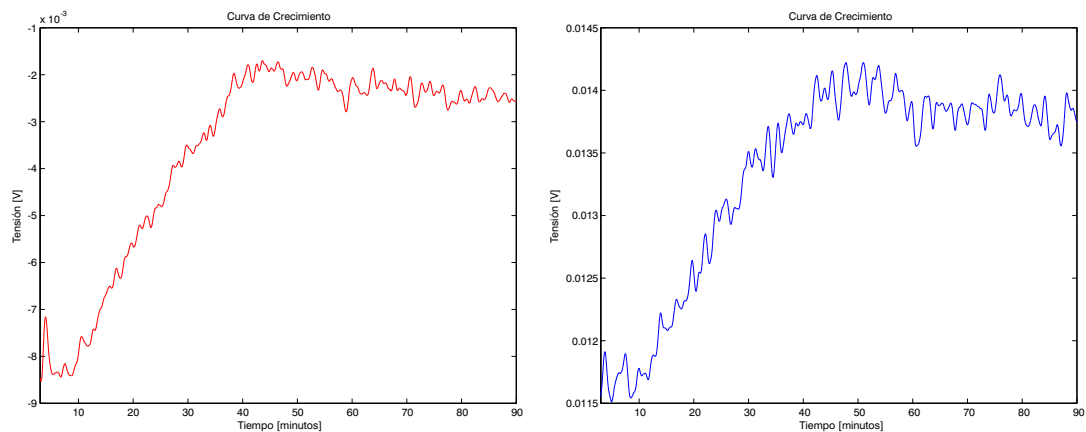


Figura 8.5: Clase 2: Detección de tipo electrodo único (izquierda) y tipo electrodos múltiples (derecha).

La figura 8.5 muestra los resultados de la detección con los dos tipos de sensores, pero ajustando el electrodo al recipiente, atándolo a éste con un caucho.

Su menor sensibilidad respecto a los clase 1 se evidencia en los menores cambios de tensión debido al crecimiento, mas su profundidad de penetración permite usarlos en el tipo electrodos múltiples a diferencia de éstos. Además, es clara su mayor tolerancia al ruido al obtener curvas donde éste tiene un efecto menor.

A partir de los resultados obtenidos en esta sección, se determina que para la ejecución de las pruebas que se presentan en las siguientes secciones, se utilizarán los electrodos clase 1 en modo de electrodo único, y los electrodos clase 2 en modo de electrodo único y electrodos múltiples en contacto directo con el recipiente.

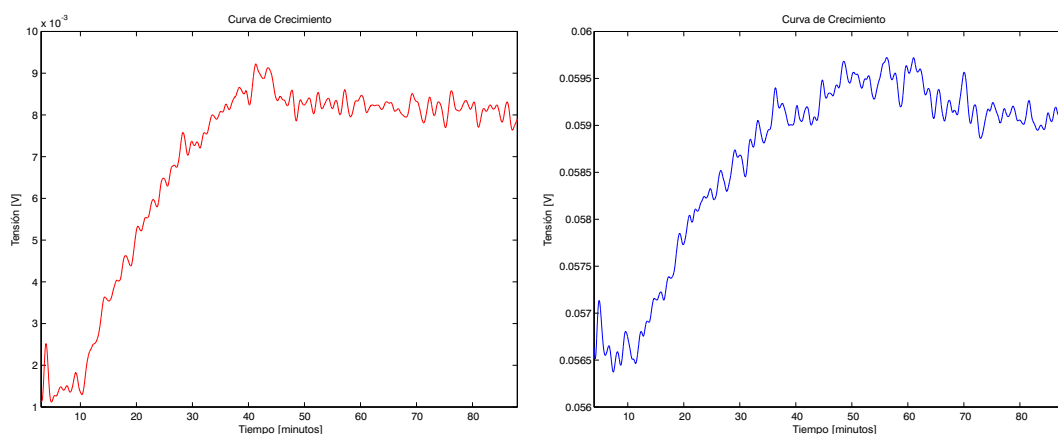


Figura 8.6: Clase 2 (contacto directo): Detección de tipo electrodo único (izquierda) y tipo electrodos múltiples (derecha).

8.2. Variación de la cantidad de levadura activa seca en el cultivo

Electrodos: *Clase 1 - Tipo Electrodo Único.*

En esta prueba la cantidad de levadura activa seca inicial varía, con el fin de comprobar el correcto funcionamiento del sistema al detectar su evolución en el medio. La figura 8.7 permite observar las diferencias de comportamiento del cultivo celular.

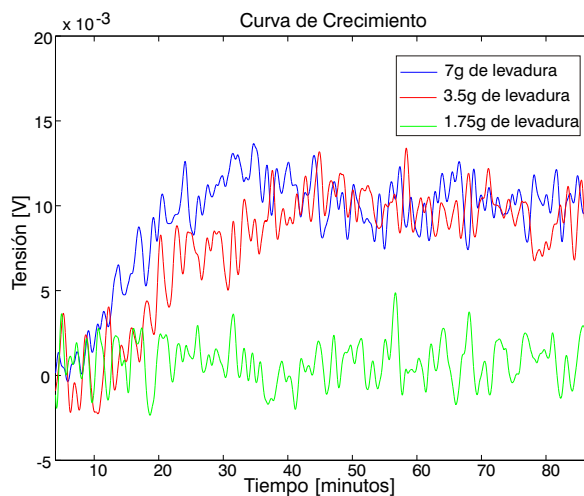


Figura 8.7: Curvas de Crecimiento al variar la cantidad de levadura activa seca.

Las curvas indican que cuando sólo se agregan 1.75g de levadura activa seca, el crecimiento es muy reducido y difícil de detectar a comparación de los otros dos casos. Los experimentos con 2.5g y 7g guardan la relación esperada, ya que al usar más levadura, de acuerdo a la progresión geométrica del crecimiento microbiano, se puede captar un aumento mayor y más rápido de la biomasa del cultivo en la fase exponencial.

8.3. Adición de metales al cultivo

Electrodos: *Clase 1 - Tipo Electrodo Único.*

Esta prueba pretende analizar el efecto de agregar un metal al medio de cultivo, que en este caso es estaño. La figura 8.8 muestra los cambios ocurridos.

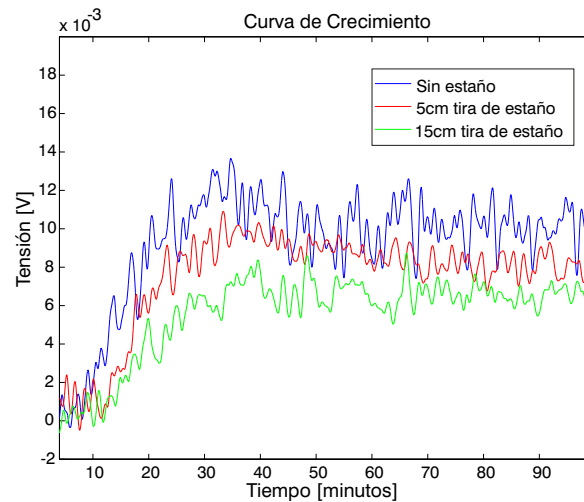


Figura 8.8: Curvas de Crecimiento al agregar metales al medio de cultivo.

Los resultados indican que la adición de metales al medio inhibe el crecimiento de la levadura, sin embargo, el aumento de la cantidad de estaño no siempre implica un fortalecimiento en la inhibición. Estos resultados se corroboran al observar la figura 8.9 tomada de [22], en la que se estudia el crecimiento de la levadura en presencia de plomo, y cuyos resultados confirman la inhibición, mas no la limitan a una relación lineal con la cantidad de metal.

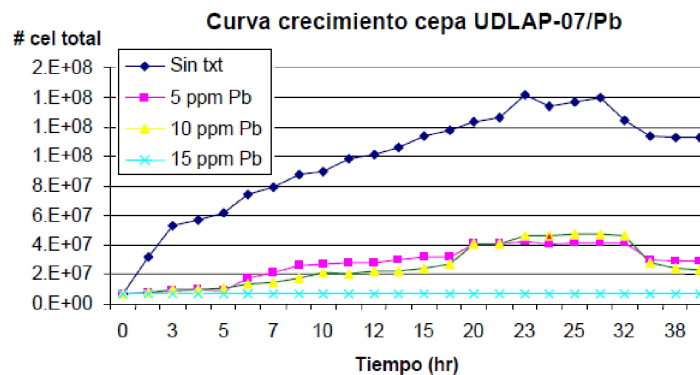


Figura 8.9: Curvas de Crecimiento al agregar plomo al medio de cultivo. Tomada de [22].

8.4. Variación de la temperatura del cultivo

Electrodos: *Clase 2 - Tipo Electrodo Único.*

La levadura tiene una temperatura óptima de crecimiento, por lo tanto, se pretende observar su comportamiento a diferentes valores de ésta para entender su efecto sobre el cultivo. La figura 8.10 muestra las señales de cada experimento.

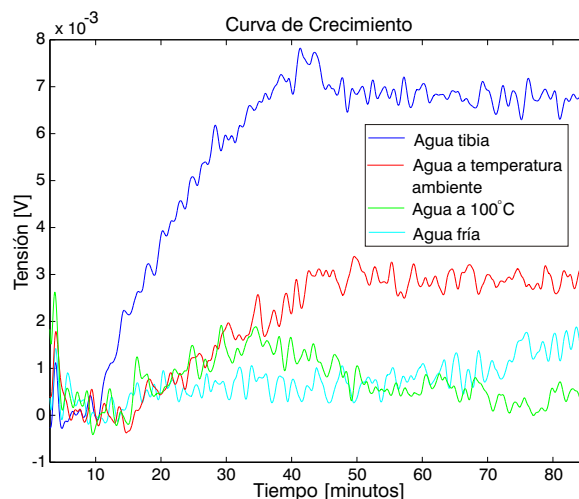


Figura 8.10: Curvas de Crecimiento al variar la temperatura del medio de cultivo.

De acuerdo a los resultados, el aumento de la temperatura parecería favorecer el crecimiento, sin embargo, existe una temperatura límite para hacerlo, después de la cual existe muerte térmica [21]. La curva verde indica la muerte de algunas células debido a la alta temperatura. En cambio, la celeste indica que las bajas temperaturas inhiben el crecimiento, sin embargo, no matan las células, ya que después de un tiempo se detecta el inicio del crecimiento.

Las pruebas realizadas en [21], corroboran las deducciones realizadas, ya que en este estudio se puede identificar la variación de la temperatura óptima de crecimiento; una representación de éste se muestra en la figura 8.11.

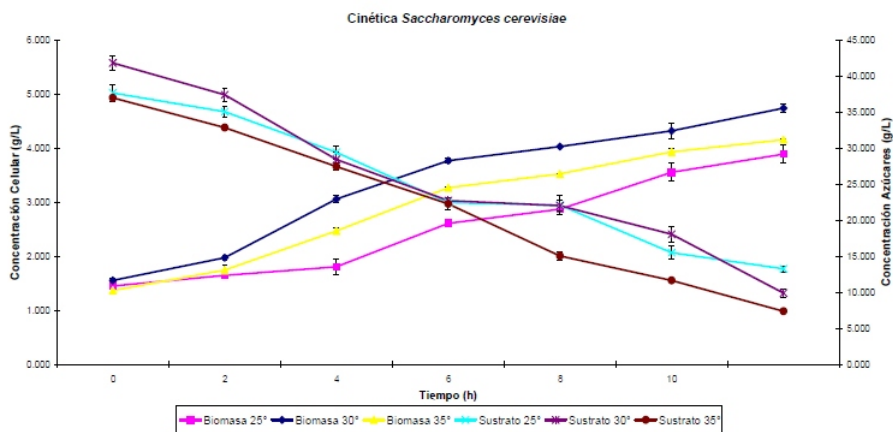


Figura 8.11: Curvas de Crecimiento al variar la temperatura del medio de cultivo. Tomada de [21].

8.5. Variación de la cantidad de sustrato del cultivo

Electrodos: *Clase 2 - Tipo Electrodo Múltiples.*

Esta prueba pretende mostrar la diferencia en la curva de crecimiento de 7 gramos de levadura activa seca que crece en un medio de 100 ml de agua y azúcar, esta última en porciones de 1.25, 2.5 y 5 gramos. La figura 8.12 muestra las curvas de crecimiento correspondientes, y además, una comparación entre sus velocidades de crecimiento.

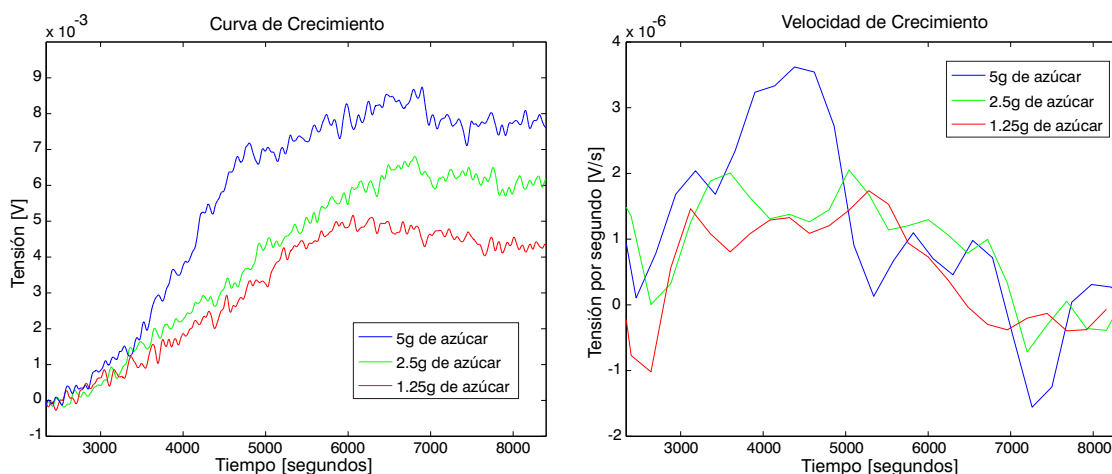


Figura 8.12: (a) Curva de Crecimiento al variar la cantidad de sustrato, (b) Velocidad de Crecimiento al variar la cantidad de sustrato.

Las referencias consultadas indican que con el aumento de la concentración de sustrato puede aumentarse la velocidad de crecimiento de *Saccharomyces Cerevisiae* [27], lo cual ocurre en las pruebas realizadas de acuerdo a la figura 8.12. Se observa que la velocidad de crecimiento máxima aumenta (y además se obtiene en menor tiempo) al incrementar la cantidad de sustrato.

En [27], también se indica que un aumento en la cantidad del sustrato puede reducir el rendimiento del cultivo ya que se favorece la fermentación alcohólica. El rendimiento de utilización del sustrato se define como “el valor que representa la cantidad de biomasa producida por unidad de sustrato consumido” [1]. Los resultados de esta prueba muestran que al duplicar la cantidad de sustrato, la cantidad de biomasa no se duplica, lo cual indicaría una reducción del rendimiento tal como lo expresan los estudios sobre *Saccharomyces Cerevisiae*.

8.6. Aceleración de la Fase de Muerte del Cultivo Celular

Se pretende mostrar la curva de crecimiento del cultivo celular, acelerando la fase de muerte de éste para observar la caída de tensión del sistema cuando ésta ocurre.

8.6.1. Aumento de la temperatura

Electrodos: *Clase 2 - Tipo Electrodo Múltiples.*

La temperatura afecta de forma radical el comportamiento del cultivo celular y su curva de crecimiento, tal como pudo comprobarse en experimentos anteriores. En esta prueba se aumentó progresivamente la temperatura del cultivo al calentar el recipiente por un tiempo considerable, acelerando la fase de crecimiento y muerte. La figura 8.13 muestra la curva y velocidad de crecimiento del cultivo.

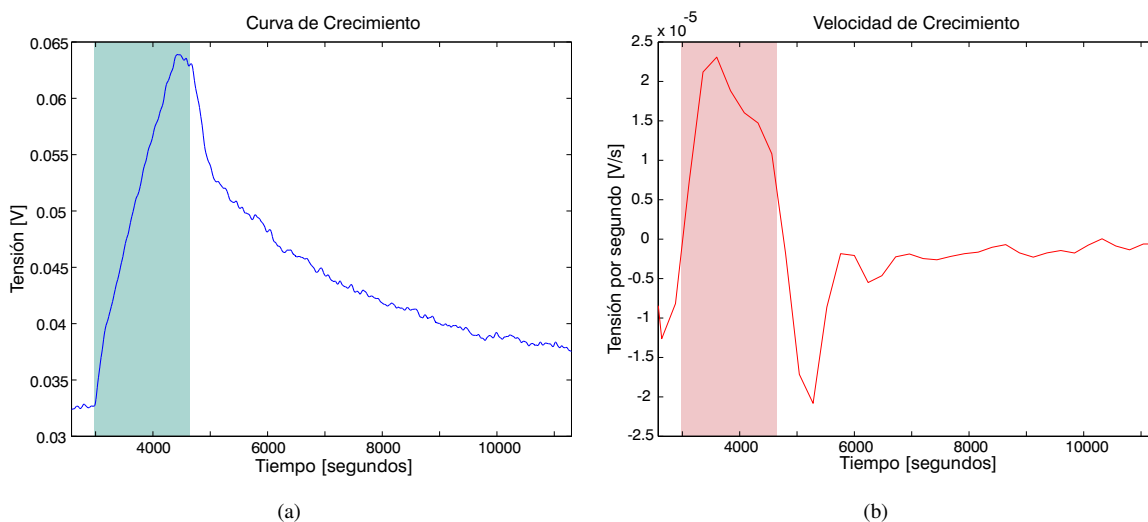


Figura 8.13: (a) Curva de Crecimiento al incrementar la temperatura, (b) Velocidad de Crecimiento al incrementar la temperatura.

Las pruebas realizadas y referencias consultadas han indicado que el aumento en la temperatura no beneficia ni perjudica el comportamiento del cultivo, sino que la levadura asume un comportamiento determinado dependiendo del valor de ésta. Para *Saccharomyces Cerevisiae*, la temperatura óptima de crecimiento está en el rango de 30 a 35 °C y la temperatura máxima es de 40 a 41 °C (temperaturas superiores pueden ocasionar su muerte) [21]. La prueba mostrada en esta sección inicia con un medio de cultivo a temperatura ambiente. Los recuadros azul y rojo de la figura 8.13, corresponden al tiempo que la llama estuvo encendida bajo el recipiente, y por lo tanto, la temperatura aumentó de forma progresiva.

Los resultados muestran que la temperatura ambiente inicial es propicia para el crecimiento, y además, que la velocidad de crecimiento aumenta en este periodo de tiempo. Cuando la temperatura comienza a aumentar, el cultivo celular continúa creciendo, sin embargo, su velocidad de crecimiento aumenta rápidamente y luego comienza a decrecer. Durante el tiempo de calentamiento del recipiente, la temperatura aumenta hasta valores en los que el crecimiento de la levadura aún es posible, pero también llega al punto en el que ésta es lo suficientemente alta para matar las células, acelerando la fase de muerte. Cuando la llama se apaga, la velocidad a la que la levadura muere comienza a decrecer, sin embargo, el cultivo se mantiene en fase de muerte.

8.6.2. Adición de Digluconato de Clorhexidina

Electrodos: *Clase 2 - Tipo Electrodo Múltiples*.

Para acelerar la fase de muerte se ha querido agregar al medio de cultivo una sustancia que pueda matar la levadura. La sustancia agregada es digluconato de clorhexidina. La figura 8.14 muestra los resultados obtenidos.

Los recuadros azul y rojo de la figura 8.14 señalan la sección de la gráfica que corresponde al tiempo en el cual el medio de cultivo contiene 10 ml de una solución de digluconato de clorhexidina de 0.002 g/ml. Se observa que la muerte del hongo no es inmediata, ya que aún en presencia de la sustancia continúa su crecimiento por cierto tiempo, sin embargo, su velocidad de crecimiento crece inicialmente y luego disminuye rápidamente hasta hacerse negativa, dando paso a la fase de muerte del cultivo celular. La curva de crecimiento indica que esta sustancia sí ataca las células del cultivo, lo cual se comprueba de forma visual, ya que se puede observar que el crecimiento se detiene, y además, al finalizar la prueba el medio parece contener cantidades mínimas de levadura. En la gráfica de la velocidad de crecimiento se observa la rápida disminución de ésta, sin embargo, una vez se hace negativa oscila alrededor de $-1 \mu\text{V/s}$.

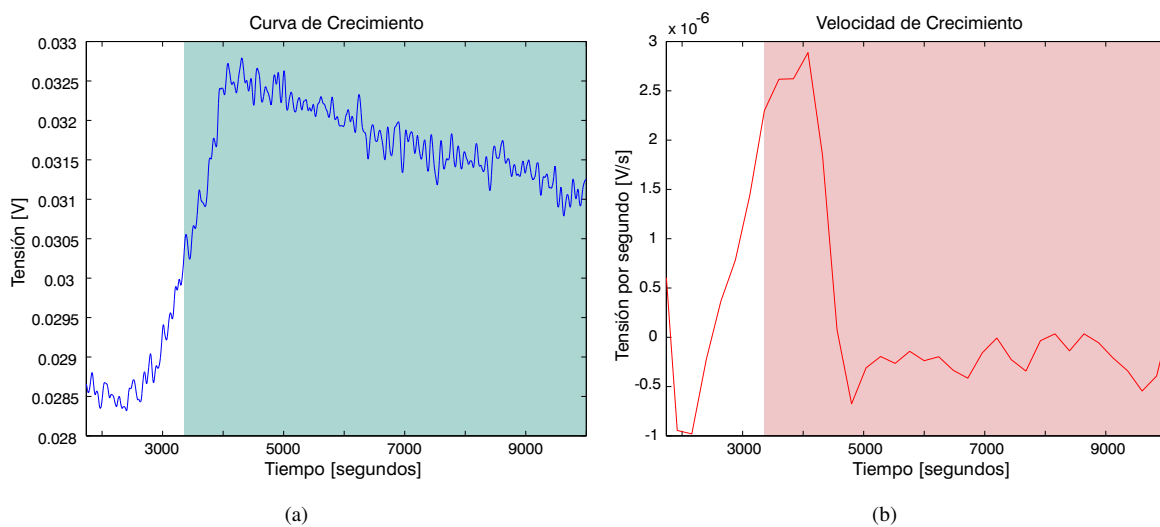


Figura 8.14: (a) Curva de Crecimiento al agregar digluconato de clorhexidina, (b) Velocidad de Crecimiento al agregar digluconato de clorhexidina.

Capítulo 9

CONCLUSIONES

- Se construyó un prototipo capaz de detectar la evolución de un cultivo celular en tiempo real, y de forma no invasiva, entregando curvas de crecimiento coherentes con el comportamiento del cultivo y calculando un parámetro de velocidad del crecimiento detectado.
- Se propuso un sistema que presenta una ventaja fundamental frente a varios métodos y equipos mencionados en este trabajo, al ser de tipo *on line*, lo cual indica que no es necesario extraer la muestra del cultivo para realizar la detección, realizando la medición en tiempo real y disminuyendo los riesgos de contaminación.
- Se propuso un sistema que resulta eficiente en cuanto a la ejecución de tareas, al brindar una excelente alternativa en cuanto a la recopilación y análisis de datos experimentales, facilitando el manejo de los datos y cálculo de parámetros como la velocidad de crecimiento.
- Se ejecutó una propuesta interesante en cuanto a la detección del comportamiento del cultivo, al utilizar la Medición por Campo Eléctrico como una tecnología que responde a su comportamiento, presentando ventajas de extrema importancia, como su penetración a través de los recipientes de cultivo.
- Se implementó un sistema muy fácil de usar, cuya transmisión de la información por el puerto USB y amigable interfaz de usuario desarrollada en LabVIEW, lo convierten en un sistema atractivo en cuanto a la simplicidad de su utilización.
- Se determinó la necesidad de procesar la información, y se propusieron filtros y ajustes de curvas que permitieron hacer una buena aproximación de los datos tomados, a pesar de la utilización de un principio de funcionamiento cuya naturaleza convierte al equipo en un sistema bastante sensible ante diferentes cambios del medio que lo rodea y a distintas fuentes de ruido.
- Se diseñaron electrodos teniendo en cuenta su importancia en la implementación, donde el análisis de las figuras de mérito de éstos a partir de simulaciones, constituyó un principio de diseño cuya pertinencia se transmitió en la variación de los resultados obtenidos al utilizarlos, concluyendo que los electrodos que adoptan la forma del recipiente son los que entregan los mejores resultados.
- Se comprobó la capacidad del sistema para detectar la evolución del cultivo celular, a pesar de la variación de las condiciones de operación, al obtener resultados cuyo comportamiento coincidía cualitativamente con los estudios realizados sobre *Saccharomyces Cerevisiae*, desarrollados con métodos comúnmente utilizados.

Recomendaciones

- Comprobada la detección de la evolución del cultivo de *Saccharomyces Cerevisiae*, sería de gran importancia en el área de biología experimentar con otros cultivos y escenarios, de forma que la aplicación de este sistema pueda extenderse a otras estructuras biológicas.
- La detección del crecimiento de los cultivos celulares es un punto de partida para sistemas de mayor complejidad en los que es necesario desarrollar sensores para la adquisición de la información, con el fin de implementar acciones de control y demás tareas.
- Las pruebas de funcionamiento desarrolladas en este proyecto arrojaron resultados bastante coherentes, por lo cual sería de gran importancia contar con el apoyo de personas que trabajen en el campo de la biología para examinar a fondo el funcionamiento del sistema, sus ventajas y desventajas como equipo, y su efecto sobre el cultivo.
- Para posteriores evaluaciones del equipo sería ideal contar con un diseño de experimentos claramente estructurado que permita dar continuidad a los avances realizados.

Bibliografía

- [1] Universidad Pública de Navarra, “Cultivo de microorganismos,” *Microbiología General*, 2005. [Online]. Disponible: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%2002.-%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>. [Acceso: Marzo, 2010].
- [2] Grupo de Investigación de Genética y Microbiología, Universidad Pública de Navarra, “Microbiología Industrial,” *Microbiología General*, 2008. [Online]. Disponible: <http://www.unavarra.es/genmic/micind-0.htm>. [Acceso: Marzo, 2010].
- [3] J. Black, “Chapter 6: Growth and Culturing Bacteria,” in *Microbiology : Principles and Explorations*, 5th ed. New York: John Wiley, 2002.
- [4] Grupo de Investigación de Genética y Microbiología, Universidad Pública de Navarra, “Métodos generales de análisis microbiológico de los alimentos,” *Microbiología de Alimentos*, 2008. [Online]. Disponible: <http://www.unavarra.es/genmic/recuento%20microorganismos.htm>. [Acceso: Marzo, 2010].
- [5] K. Park, J. Jang , D. Irimia , J. Sturgis, J. Lee, J. Robinson, M. Toner, R. Bashir. “Living cantilever arrays for characterization of mass of single live cells in fluids,” *Lab on a Chip*, vol. 8, no. 7, pp 993-1228, Jul. 2008.
- [6] Department of Biology & Microbiology, South Dakota State University, “Topic 9: Microbial Growth,” *General Microbiology*, 2006. [Online]. Available: <http://biomicro.sdstate.edu/Bleakleb/Micro231/notes/Fall04/topic9.pdf>. [Accessed: March, 2010].
- [7] K. Asami, E. Gheorghiu, and T. Yonezawa, “Real-Time Monitoring of Yeast Cell Division by Dielectric Spectroscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 76, 1999.
- [8] K.G. Ong, J. Wang, R.S. Singh, L.G. Bachas, C.A. Grimes, “Monitoring of bacteria growth using a wireless, remote query resonant-circuit sensor: application to environmental sensing,” *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 16, pp. 305-312, 2001.
- [9] C. Keese and I. Giaever, “A Biosensor that Monitors Cell Morphology with Electrical Fields,” *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1994.
- [10] V. Egorov, “Electrooptical apparatus and method for monitoring cell growth in microbiological culture,” US Patent 6232091, 2001.
- [11] G. Rao, “Bioreactor and bioprocessing technique,” US Patent 6673532 , 2004.
- [12] C. Michels, *Genetic Techniques for Biological Research*. New York: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.

- [13] Russell Bik Design Technical Staff, *Electric Field Proximity Sensor*, Russell Bik Design, 2000.
- [14] B. Osoinach, *Proximity Capacitive Sensor Technology for Touch Sensing Applications*, Freescale Semiconductor, Inc., 2008.
- [15] J. R. Smith, E. Garcia, R. Wistort, and G. Krishnamoorthy, "Electric field imaging pretouch for robotic graspers," in *International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS)*, 2007, pp.676-683.
- [16] Freescale Semiconductor, Inc. Technical Staff, *Electric Field Imaging Device*, Freescale Semiconductor, Inc., 2008.
- [17] Freescale Semiconductor, Inc., Appl. Note 1985, 2006.
- [18] X. Li, S. Larson, A. Zyuzin, and A. Mamishev. "Design Principles for Multichannel Fringing Electric Field Sensors," *IEEE Sensors Journal*, vol. 6, no. 2, pp. 434-440, April 2006.
- [19] A. Mamishev, S. Cantrell, Y. Du, B. Lesieutre, and M. Zahn. "Uncertainty in Multiple Penetration Depth Fringing Electric Field Sensor Measurements," *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, vol. 51, no. 6, pp. 1192-1199, December 2002.
- [20] X.B. Li, V.V. Inclan, G.I. Rowe, and A.V. Mamishev, "Parametric Modeling of Concentric Fringing Electric Field Sensors," in *Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena*, 2005, pp.617-620.
- [21] A. Llano, "Escalamiento del proceso de producción de un insecticida biológico a nivel piloto para la empresa Productos Naturales de la Sabana S.A., Alquería," Proyecto de Grado, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia, 2007.
- [22] E. Palacios y L. Villalobos, "Biosorción de Metales Pesados en Solución Acuosa Mediante Biomasa de *Saccharomyces Cerevisiae*," Proyecto de Grado, Universidad de las Américas Puebla, Cholula, México, 2007.
- [23] Analog Devices, Inc. Technical Staff, *Zero Drift, Digitally Programmable Instrumentation Amplifier*, Analog Devices, Inc., 2007.
- [24] Texas Instruments Incorporated Technical Staff, *2.7-V to 5.5-V low-power dual 12-bit digital-to-analog converter with power down*, Texas Instruments Incorporated, 2004.
- [25] Freescale Semiconductor, Inc. Technical Staff, *MC9S08JM60 HCS08 Microcontrollers*, Freescale Semiconductor, Inc., 2007.
- [26] Texas Instruments Incorporated Technical Staff, *1A Low-Dropout Regulator*, Texas Instruments Incorporated, 2005.
- [27] R. Ertola, O. Yantorno y C. Mignone, "Capítulo 8," en *Microbiología Industrial*, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Organización de Estados Americanos, 2008. [Online]. Disponible: http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/cap8_mi.pdf. [Acceso: Marzo, 2010].

Apéndice A

Componentes Seleccionados

En este apéndice se mencionan las referencias de los componentes utilizados en la tarjeta de adquisición de datos. Además, se incluyen las descripciones generales de los dispositivos, tomadas de las hojas de datos entregadas por cada uno de los fabricantes.

- *E-Field IC*: MC33941 de Freescale Semiconductor.
- Amplificador de Instrumentación: AD8231 de Analog Devices.
- Convertidor Digital-Analógico: TLV5638 de Texas Instruments.
- Microcontrolador: MC9S08JM60 de Freescale Semiconductor.
- Regulador de Tensión: REG104-5 de Texas Instruments.

Freescale Semiconductor
Technical Data

Document Number: MC33941
Rev. 4



Electric Field Imaging Device

The MC33941 is intended for cost-sensitive applications where non-contact sensing of objects is desired. When connected to external electrodes, an electric field is created. The MC33941 detects objects in this electric field. The IC generates a low-frequency sine wave, which is adjustable by using an external resistor and is optimized for 120 kHz. The sine wave has very low harmonic content to reduce harmonic interference. The MC33941 also contains support circuits for a microcontroller unit (MCU) to allow the construction of a two-chip E-field system.

Features

- Supports up to 7 Electrodes
- Shield Driver for Driving Remote Electrodes Through Coaxial
- High-Purity Sine Wave Generator Tunable with External Resistor
- Response Time Tunable with External Capacitor
- +5V Regulator to Power External Circuit
- Can support up to 28 touch pad sensors (2 way multiplexing)
- Extended Temperature Range -40° to 110°C
- Pb-Free and RoHS compliant

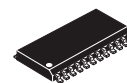
Typical Applications

- Appliance Control Panels and Touch Sensors
- Linear and Rotational Sliders
- Spill Over Flow Sensing Measurement
- Refrigeration Frost Sensing
- Industrial Control and Safety Systems Security
- Proximity Detection for Wake-Up Features
- Touch Screens
- Garage Door Safety Sensing
- PC Peripherals
- Patient Monitoring
- Point of Sale Terminals
- Size Detection
- Liquid Level Sensing

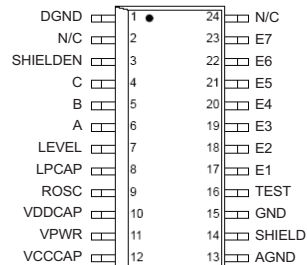
ORDERING INFORMATION			
Device Name	Temperature Range	Drawing	Package
MC33941EG/R2	-40° to 110°C	98ASB42564B	SOICW-24

MC33941

**ELECTRONIC FIELD
IMAGING DEVICE**



**EG SUFFIX (Pb-FREE)
24-TERMINAL SOICW
CASE 751E-05**



Pin Connections



Zero Drift, Digitally Programmable Instrumentation Amplifier

AD8231

FEATURES

- Digitally/pin-programmable gain**
G = 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, or 128
- Specified from -40°C to +125°C**
50 nV/°C maximum input offset drift
10 ppm/°C maximum gain drift
- Excellent dc performance**
80 dB minimum CMR, G = 1
15 μ V maximum input offset voltage
500 pA maximum bias current
0.7 μ V p-p noise (0.1 Hz to 10 Hz)
- Good ac performance**
2.7 MHz bandwidth, G = 1
1.1 V/ μ s slew rate
- Rail-to-rail output**
- Shutdown/multiplex**
- Extra op amp**
- Single-supply range: 3 V to 6 V**
- Dual-supply range: \pm 1.5 V to \pm 3 V**

APPLICATIONS

- Pressure and strain transducers
- Thermocouples and RTDs
- Programmable instrumentation
- Industrial controls
- Weigh scales

GENERAL DESCRIPTION

The AD8231 is a low drift, rail-to-rail, instrumentation amplifier with software-programmable gains of 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, or 128. The gains are programmed via digital logic or pin strapping.

The AD8231 is ideal for applications that require precision performance over a wide temperature range, such as industrial temperature sensing and data logging. Because the gain setting resistors are internal, maximum gain drift is only 10 ppm/°C for gains of 1 to 32. Because of the auto-zero input stage, maximum input offset is 15 μ V and maximum input offset drift is just 50 nV/°C. CMRR is 80 dB for G = 1, increasing to 110 dB at higher gains.

FUNCTIONAL BLOCK DIAGRAM

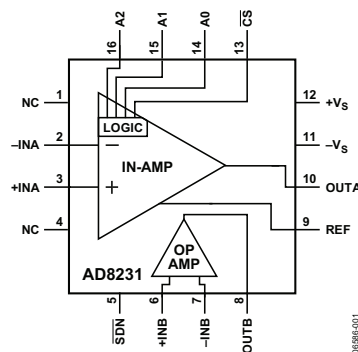


Figure 1.

Table 1. Instrumentation and Difference Amplifiers by Category

High Performance	Low Cost	High Voltage	Mil Grade	Low Power	Digital Gain
AD8221	AD623 ¹	AD628	AD620	AD627 ¹	AD8231 ¹
AD8220 ¹	AD8553 ¹	AD629	AD621		AD8250
AD8222			AD524		AD8251
AD8224 ¹			AD526		AD8555 ¹
			AD624		AD8556 ¹
					AD8557 ¹

¹ Rail-to-rail output.

The AD8231 also includes an uncommitted op amp that can be used for additional gain, differential signal driving, or filtering. Like the in-amp, the op amp has an auto-zero architecture, rail-to-rail input, and rail-to-rail output.

The AD8231 includes a shutdown feature that reduces current to a maximum of 1 μ A. In shutdown, both amplifiers also have a high output impedance, which allows easy multiplexing of multiple amplifiers without additional switches.

The AD8231 is specified over the extended industrial temperature range of -40°C to +125°C. It is available in a 4 mm \times 4 mm 16-lead LFCSP.

Rev. A

Information furnished by Analog Devices is believed to be accurate and reliable. However, no responsibility is assumed by Analog Devices for its use, nor for any infringements of patents or other rights of third parties that may result from its use. Specifications subject to change without notice. No license is granted by implication or otherwise under any patent or patent rights of Analog Devices. Trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

One Technology Way, P.O. Box 9106, Norwood, MA 02062-9106, U.S.A.
Tel: 781.329.4700 www.analog.com

Fax: 781.461.3113

©2007 Analog Devices, Inc. All rights reserved.



TLV5638

SLAS225C—JUNE 1999—REVISED JANUARY 2004

2.7-V TO 5.5-V LOW-POWER DUAL 12-BIT DIGITAL-TO-ANALOG CONVERTER WITH INTERNAL REFERENCE AND POWER DOWN

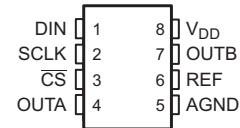
FEATURES

- Dual 12-Bit Voltage Output DAC
- Programmable Internal Reference
- Programmable Settling Time:
 - 1 μ s in Fast Mode,
 - 3.5 μ s in Slow Mode
- Compatible With TMS320 and SPI™ Serial Ports
- Differential Nonlinearity <0.5 LSB Typ
- Monotonic Over Temperature

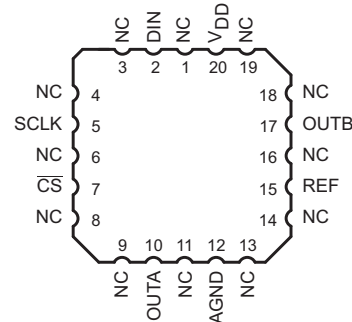
APPLICATIONS

- Digital Servo Control Loops
- Digital Offset and Gain Adjustment
- Industrial Process Control
- Machine and Motion Control Devices
- Mass Storage Devices

D, JG PACKAGE
(TOP VIEW)



FK PACKAGE
(TOP VIEW)



DESCRIPTION

The TLV5638 is a dual 12-bit voltage output DAC with a flexible 3-wire serial interface. The serial interface allows glueless interface to TMS320, SPI™, QSPI™, and Microwire™ serial ports. It is programmed with a 16-bit serial string containing 4 control and 12 data bits.

The resistor string output voltage is buffered by a x2 gain rail-to-rail output buffer. The buffer features a Class AB output stage to improve stability and reduce settling time. The programmable settling time of the DAC allows the designer to optimize speed vs power dissipation. With its on-chip programmable precision voltage reference, the TLV5638 simplifies overall system design.

Because of its ability to source up to 1 mA, the reference can also be used as a system reference. Implemented with a CMOS process, the device is designed for single supply operation from 2.7 V to 5.5 V. It is available in an 8-pin SOIC package to reduce board space in standard commercial, industrial, and automotive temperature ranges. It is also available in JG and FK packages in the military temperature range.



Please be aware that an important notice concerning availability, standard warranty, and use in critical applications of Texas Instruments semiconductor products and disclaimers thereto appears at the end of this data sheet.

SPI, QSPI are trademarks of Motorola, Inc.

Microwire is a trademark of National Semiconductor Corporation.

PRODUCTION DATA information is current as of publication date. Products conform to specifications per the terms of the Texas Instruments standard warranty. Production processing does not necessarily include testing of all parameters.

Copyright © 1999–2004, Texas Instruments Incorporated

MC9S08JM60 Series Features

8-Bit HCS08 Central Processor Unit (CPU)

- 48-MHz HCS08 CPU (central processor unit)
- 24-MHz internal bus frequency
- HC08 instruction set with added BGND instruction
- Background debugging system
- Breakpoint capability to allow single breakpoint setting during in-circuit debugging (plus two more breakpoints in on-chip debug module)
- In-circuit emulator (ICE) debug module containing two comparators and nine trigger modes. Eight deep FIFO for storing change-of-flow addresses and event-only data. Debug module supports both tag and force breakpoints.
- Support for up to 32 interrupt/reset sources

Memory Options

- Up to 60 KB of on-chip in-circuit programmable flash memory with block protection and security options
- Up to 4 KB of on-chip RAM
- 256 bytes of USB RAM

Clock Source Options

- Clock source options include crystal, resonator, external clock
- MCG (multi-purpose clock generator) — PLL and FLL; internal reference clock with trim adjustment

System Protection

- Optional computer operating properly (COP) reset with option to run from independent 1-kHz internal clock source or the bus clock
- Low-voltage detection with reset or interrupt
- Illegal opcode detection with reset
- Illegal address detection with reset

Power-Saving Modes

- Wait plus two stops

Package Options

- 64-pin quad flat package (QFP)
- 64-pin low-profile quad flat package (LQFP)
- 48-pin quad flat no-lead (QFN)
- 44-pin low-profile quad flat package (LQFP)

Peripherals

- **USB** — USB 2.0 full-speed (12 Mbps) device controller with dedicated on-chip USB transceiver, 3.3-V regulator and USBDP pull-up resistor; supports control, interrupt, isochronous, and bulk transfers; supports endpoint 0 and up to 6 additional endpoints; endpoints 5 and 6 can be combined to provide double buffering capability

- **ADC** — 12-channel, 12-bit analog-to-digital converter with automatic compare function; internal temperature sensor
- **ACMP** — Analog comparator with option to compare to internal reference; operation in stop3 mode
- **SCI** — Two serial communications interface modules with optional 13-bit break LIN extensions
- **SPI** — Two 8- or 16-bit selectable serial peripheral interface modules with a receive data buffer hardware match function
- **IIC** — Inter-integrated circuit bus module to operate at up to 100 kbps with maximum bus loading; multi-master operation; programmable slave address; interrupt-driven byte-by-byte data transfer; 10-bit addressing and broadcast modes support
- **Timers** — One 2-channel and one 6-channel 16-bit timer/pulse-width modulator (TPM) modules: Selectable input capture, output compare, and edge-aligned PWM capability on each channel. Each timer module may be configured for buffered, centered PWM (CPWM) on all channels
- **KBI** — 8-pin keyboard interrupt module
- **RTC** — Real-time counter with binary- or decimal-based prescaler

Input/Output

- Up to 51 general-purpose input/output pins
- Software selectable pullups on ports when used as inputs
- Software selectable slew rate control on ports when used as outputs
- Software selectable drive strength on ports when used as outputs
- Master reset pin and power-on reset (POR)
- Internal pullup on $\overline{\text{RESET}}$, IRQ, and BKGD/MS pins to reduce customer system cost



REG104



SBVS025G – SEPTEMBER 2001 – REVISED SEPTEMBER 2005

DMOS 1A Low-Dropout Regulator

FEATURES

- **NEW DMOS TOPOLOGY:**
Ultra Low Dropout Voltage:
230mV typ at 1A and 3.3V Output
Output Capacitor NOT Required for Stability
- **FAST TRANSIENT RESPONSE**
- **VERY LOW NOISE:** $33\mu\text{V}_{\text{RMS}}$
- **HIGH ACCURACY:** $\pm 2\%$ max
- **HIGH EFFICIENCY:**
 $I_{\text{GND}} = 1.7\text{mA}$ at $I_{\text{OUT}} = 1\text{A}$
Not Enabled: $I_{\text{GND}} = 0.5\mu\text{A}$
- **2.5V, 2.7V, 3.0V, 3.3V, 5.0V AND
ADJUSTABLE OUTPUT VERSIONS**
- **THERMAL PROTECTION**
- **SMALL SURFACE-MOUNT PACKAGES:**
SOT223-5, DDPK-5

APPLICATIONS

- **PORTABLE COMMUNICATION DEVICES**
- **BATTERY-POWERED EQUIPMENT**
- **MODEMS**
- **BAR-CODE SCANNERS**
- **BACKUP POWER SUPPLIES**

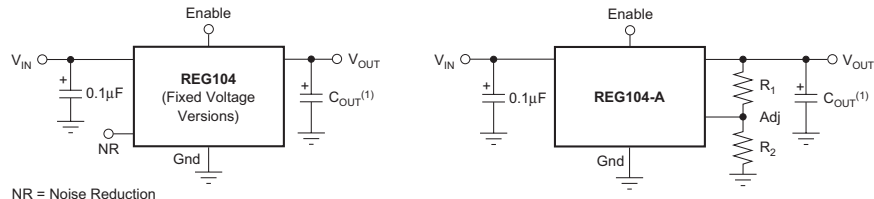
DESCRIPTION

The REG104 is a family of low-noise, low-dropout linear regulators with low ground pin current. Its new DMOS topology provides significant improvement over previous designs, including low dropout voltage (only 230mV typ at full load), and better transient performance. In addition, no output capacitor is required for stability, unlike conventional low dropout regulators that are difficult to compensate and require expensive low ESR capacitors greater than 1 μF .

Typical ground pin current is only 1.7mA (at $I_{\text{OUT}} = 1\text{A}$) and drops to 0.5 μA in *not enabled* mode. Unlike regulators with PNP pass devices, quiescent current remains relatively constant over load variations and under dropout conditions.

The REG104 has very low output noise (typically $33\mu\text{V}_{\text{RMS}}$ for $V_{\text{OUT}} = 3.3\text{V}$ with $C_{\text{NR}} = 0.01\mu\text{F}$), making it ideal for use in portable communications equipment. On-chip trimming results in high output voltage accuracy. Accuracy is maintained over temperature, line, and load variations. Key parameters are tested over the specified temperature range (-40°C to $+85^{\circ}\text{C}$).

The REG104 is well protected—internal circuitry provides a current limit which protects the load from damage. Thermal protection circuitry keeps the chip from being damaged by excessive temperature. The REG104 is available in the DDPK-5 and the SOT223-5.



NR = Noise Reduction

NOTE: (1) Optional.



Please be aware that an important notice concerning availability, standard warranty, and use in critical applications of Texas Instruments semiconductor products and disclaimers thereto appears at the end of this data sheet.

All trademarks are the property of their respective owners.

PRODUCTION DATA information is current as of publication date. Products conform to specifications per the terms of Texas Instruments standard warranty. Production processing does not necessarily include testing of all parameters.



Copyright © 2001-2005, Texas Instruments Incorporated

Apéndice B

Circuito Impreso

En este apéndice se muestran las figuras correspondientes al circuito impreso o PCB (*Printed Circuit Board*) elaborado para este proyecto.

En la figura B.1 se muestra el esquemático del PCB.

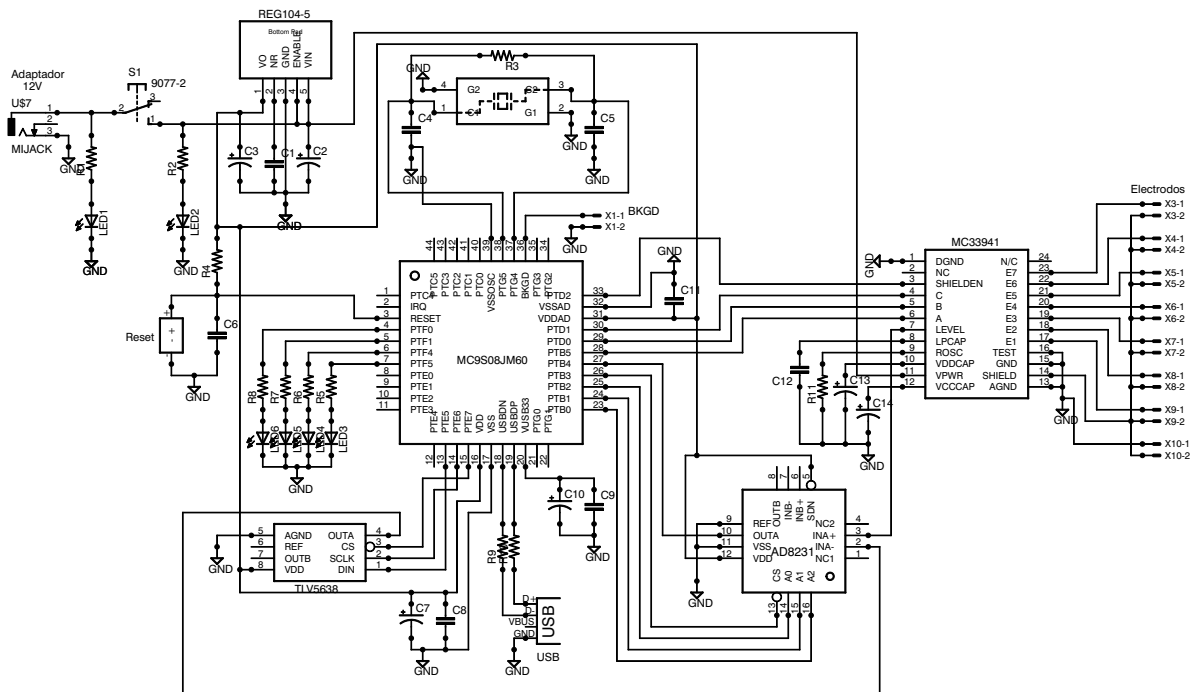


Figura B.1: Esquemático del PCB.

La cara superior del PCB se muestra en la figura B.2, y la inferior, en la figura B.3.

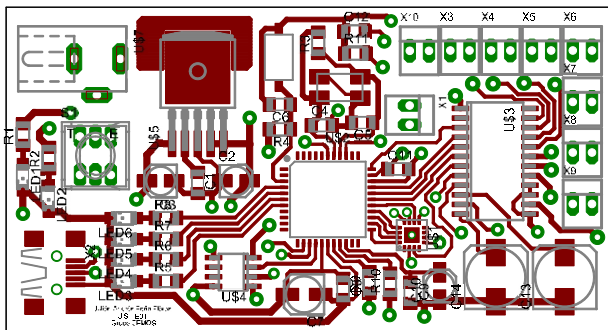


Figura B.2: Cara superior del PCB.

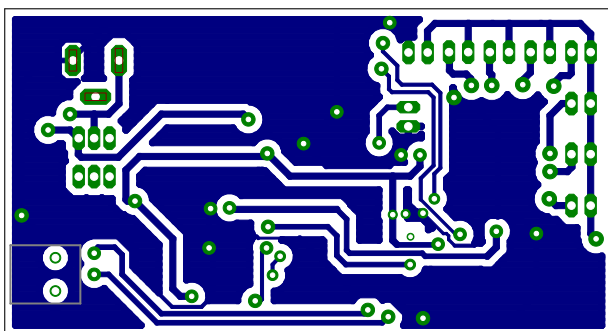


Figura B.3: Cara inferior del PCB.

Apéndice C

Código de Programación

En este apéndice se incluye la rutina principal programada en el microcontrolador.

```
void Init_Sys(void); //Initialization

void main(void)
{
    /* Variables */
    float RealTs=0;
    UINT8 EChosen[2];
    UINT8 ConfigReady=0,MeasureReady=0;

    /* System Initalization */
    Init_Sys();

    /* Enable Interrupts Macro */
    EnableInterrupts;

    /* Basic Initial Conditions */
    GainINA(1); //INA Gain =1

    for(;;)
    {
        /* USB Manager, please keep it in main Loop */
        Check_USBBus_Status();

        if (CheckEndPointOUT(EP3))
        {
            /* SYSTEM CONFIGURATION */

            if (EP3_Buffer[0] == 5)
            {
                /* Sample Time Configuration */

                RealTs = (float)(EP3_Buffer[1]);
                RealTs = RealTs / 1000;
                Timer_Init(RealTs);

                /* Electrodes Configuration */

                EChosen[0] = EP3_Buffer[2]; //Reference Electrode
                EChosen[1] = EP3_Buffer[3]; //Measure Electrode

                ConfigReady = 1;
            }
        }
    }
}
```

```
/* DATA ACQUISITION */

if (ConfigReady == 1)
{
    if (intsample==1)
    {
        LED2 = 1;
        ElectrodeSel(EChosen[0]);

        miliseg(3);

        ReadADC();
        EP4_Buffer[0] = ReadHigh;
        EP4_Buffer[1] = ReadLow;

        LED2 = 0;
        ElectrodeSel(EChosen[1]);

        miliseg(3);

        ReadADC();
        EP4_Buffer[2] = ReadHigh;
        EP4_Buffer[3] = ReadLow;

        EndPoint_IN(EP4,8);

        intsample=0;
        contcal=contcal+1;
        MeasureReady=1;

    }
}

/* OFFSET AND GAIN CALIBRATION */

if(contcal <= 1000 && MeasureReady == 1)
{
    Calibrate(); // Calibration Function.
}
else if(MeasureReady == 1)
{
    contcal=1001;
}
}
}
```


Apéndice D

Diagrama de Bloques en LabVIEW

Este apéndice muestra el diagrama de bloques del VI de LabVIEW para cada uno de los eventos programados.

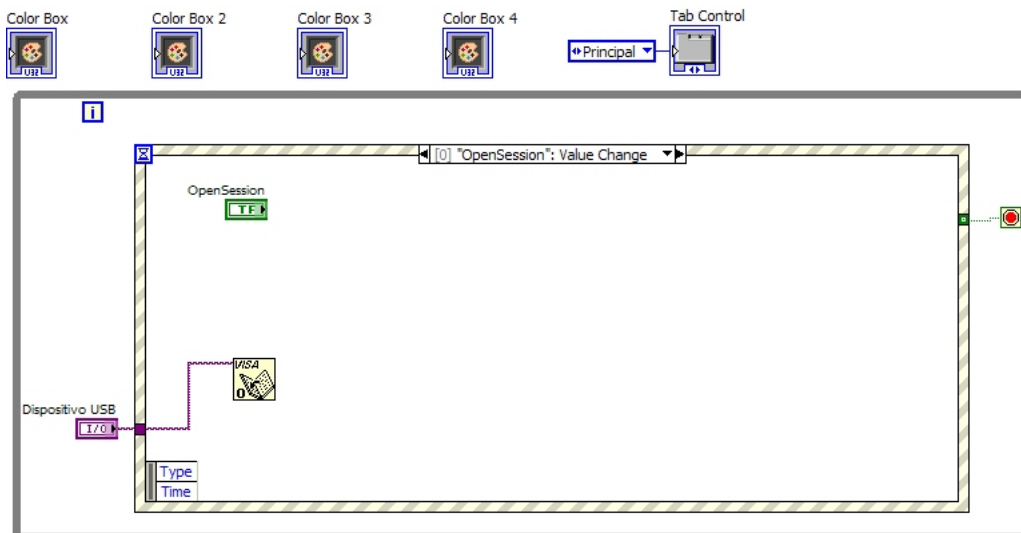


Figura D.1: Evento "OpenSession".

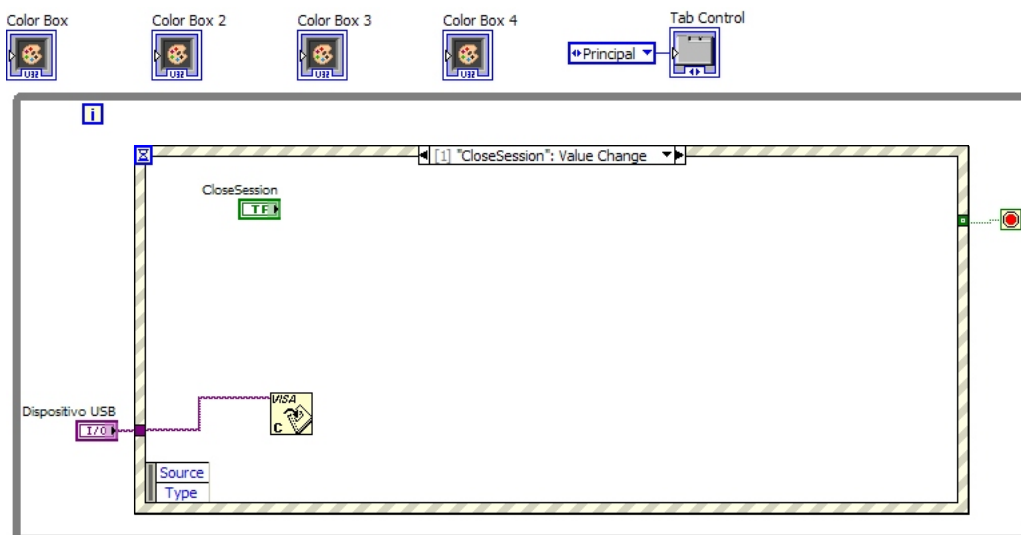


Figura D.2: Evento "CloseSession".

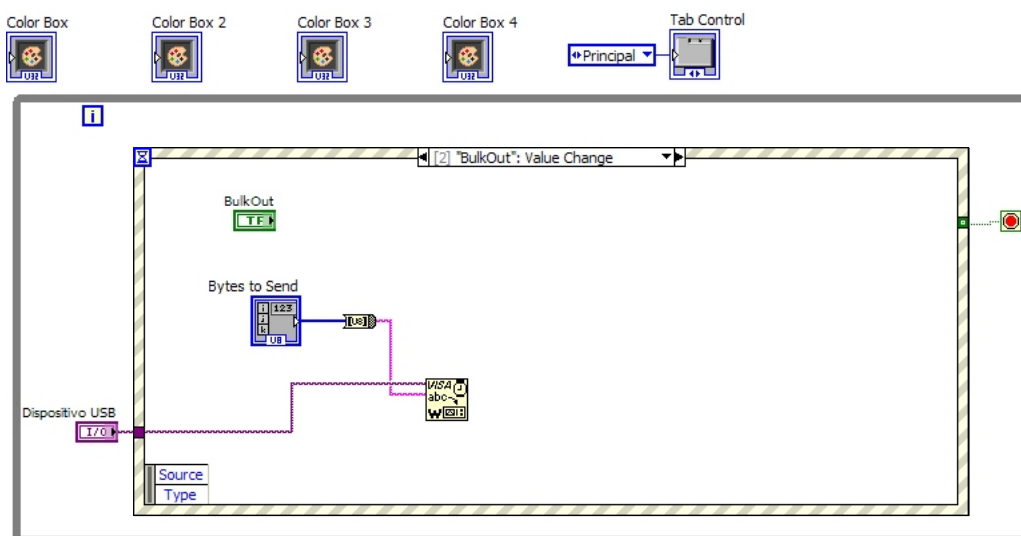


Figura D.3: Evento "BulkOut".

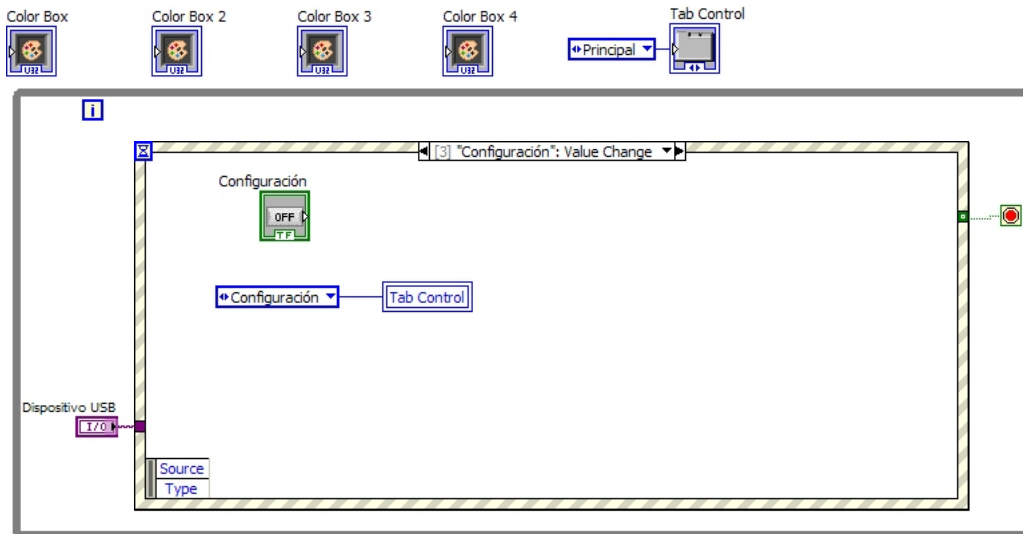


Figura D.4: Evento “Configuración”.

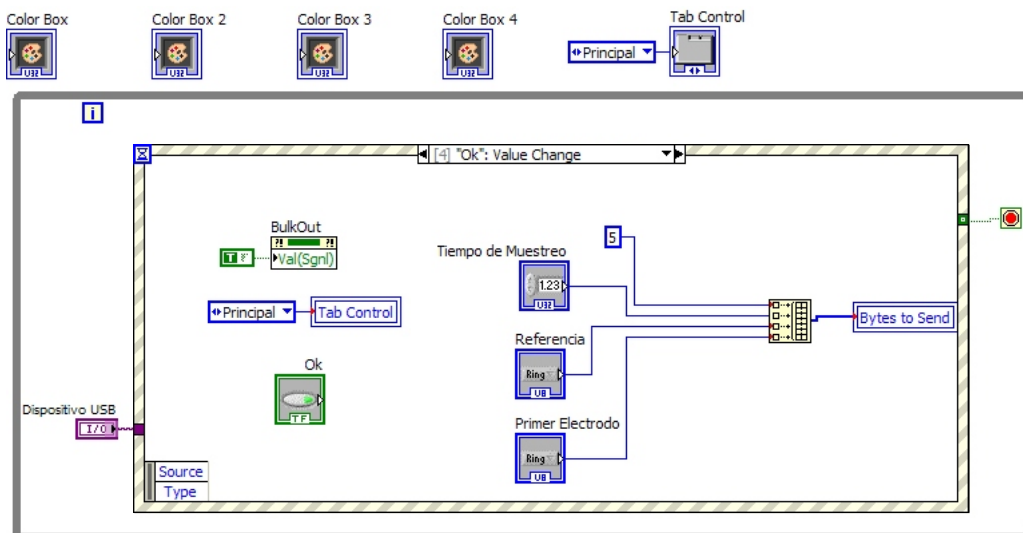


Figura D.5: Evento “Ok”.

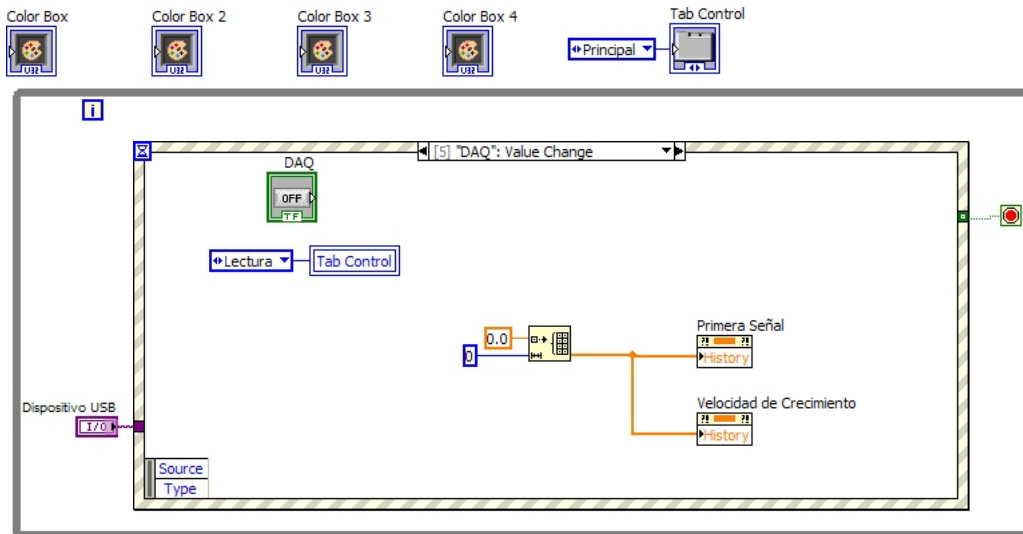


Figura D.6: Evento “DAQ”.

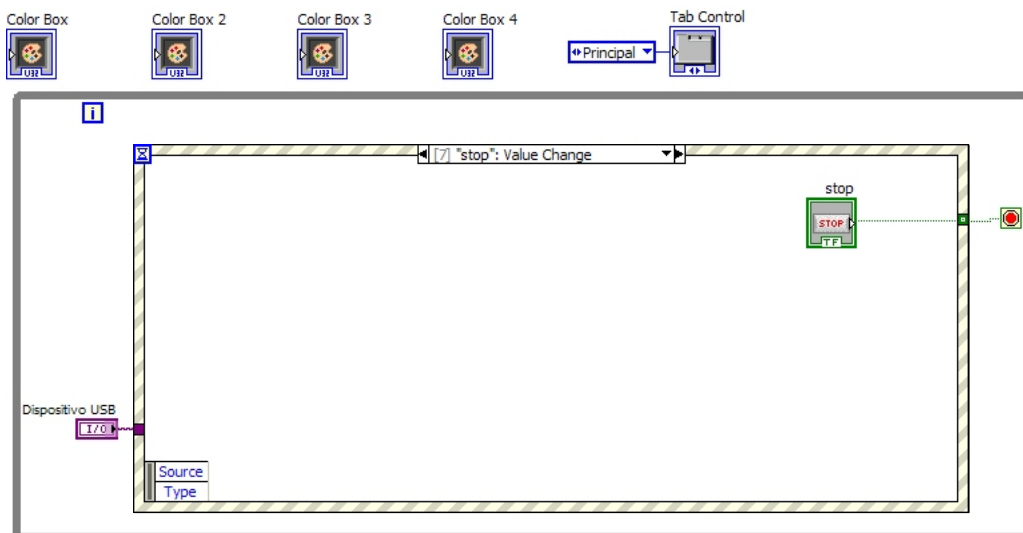


Figura D.7: Evento “Stop”.

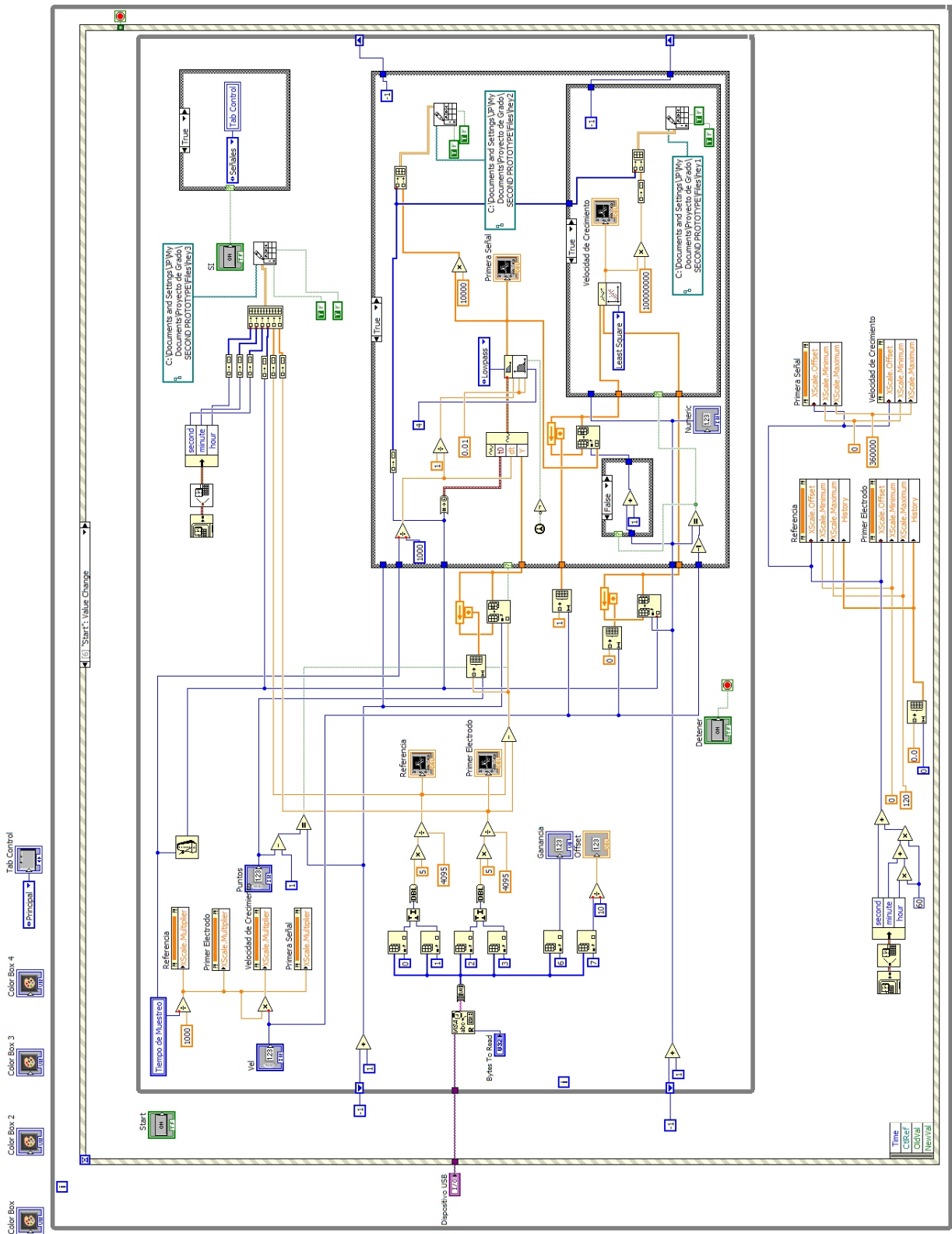


Figura D.8: Evento “Start”.

Apéndice E

Manual de Usuario

Este manual permite utilizar el Sistema Prototipo de Detección de Crecimiento de Cultivos Celulares. La primera vez que use el dispositivo en su computador, siga los pasos que se presentan a continuación.

1. Conecte el dispositivo al puerto USB del computador.
2. Encienda el dispositivo.
3. Cuando Windows se prepare a instalar el hardware reconocido, indique en la ventana de instalación que no desea buscar el *driver* en internet.
4. Luego señale la opción que le permite escoger el *driver* desde la ubicación que usted especifique.
5. Seleccione el archivo *GrowthDetector.inf* como controlador.
6. Windows instalará el hardware con el controlador seleccionado.

Para el uso del sistema cuando el controlador ya se ha instalado, siga los siguientes pasos.

1. Abra el VI *GrowthDetector* en LabVIEW.
2. Haga click en *Run*.
3. En la pantalla principal, seleccione de la lista desplegable el dispositivo USB a utilizar.
4. Haga click en *Abrir Sesión*.
5. Haga click en *Configuración*.
6. Escoja el nombre del archivo en el que guardará los datos, y seleccione el electrodo encargado de la medición y el de referencia, luego haga click en *Ok*.
7. Haga click en *DAQ* para iniciar la adquisición de datos.
8. Haga click en *Iniciar* para observar la curva de crecimiento y velocidad de crecimiento en tiempo real.
9. Cuando desee observar las señales de los electrodos, haga click en *Señales Internas*.
10. Si desea detener el almacenamiento de los datos haga click en *Detener*. Puede volver a almacenar haciendo click en *Iniciar*.
11. Si desea detener la ejecución del VI haga click en *STOP*.