

Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería de las Tecnologías de
Telecomunicación

Dispositivo electrónico para la preparación de gel de
agarosa y realización de electroforesis

Autor: Juan Antonio Ocaña Guerrero.

Tutor: Francisco Antonio Perdigones Sánchez.

Dpto. Ingeniería Electrónica y Microsistemas
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2022



Trabajo de Fin de Grado
Grado en Ingeniería de las Tecnologías de Telecomunicación

Dispositivo electrónico para la preparación de gel de agarosa y realización de electroforesis.

Autor:

Juan Antonio Ocaña Guerrero

Tutor:

Francisco Antonio Perdigones Sánchez

Profesor titular

Dpto. Ingeniería Electrónica y Microsistemas

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2022

Trabajo Fin de Grado: Dispositivo electrónico para la preparación de gel de agarosa y realización de electroforesis.

Autor: Juan Antonio Ocaña Guerrero.

Tutor: Francisco Antonio Perdigones Sánchez.

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2022

El Secretario del Tribunal

Agradecimientos

Llegados a este punto, voy a dar por concluida una de las etapas más duras de mi vida, a la vez que una de las más felices y gratificantes vividas hasta el día de hoy. Principalmente porque me doy cuenta que todo esfuerzo y dedicación acaba teniendo su recompensa tarde o temprano y la mía gracias a Dios me va a permitir alcanzar uno de mis sueños de pequeño y una de mis metas de presente, como es ser Ingeniero.

En este punto, me acuerdo de todas aquellas personas que en algún momento me han acompañado a lo largo del camino, algunas siguen presentes a día de hoy y otra por cosas de la vida a día de hoy ya no están, pero me han ayudado a seguir adelante en los momentos más duros de la carrera y me han acompañado en los momentos más felices de la misma. Me considero una persona muy agradecida con todo lo que me ocurre en la vida y aquí no iba a ser menos con todos aquellas personas que en algún momento me han apoyado. Con todo esto, GRACIAS a todos por confiar en mí y ser pilares sobre los que se ha conseguido sustentar uno de mis sueños.

Me gustaría agradecer de manera más personal a algunas de esas personas que han hecho posible todo esto:

A Francisco, mi tutor del TFG. Gracias por haber hecho posible este proyecto, ha sido un proyecto bastante entretenido, en el cual he podido poner en práctica todos aquellos conocimientos que he ido adquiriendo a lo largo de la carrera. No han sido pocas las horas dedicadas en el laboratorio a desarrollar el dispositivo y los problemas que han ido surgiendo a lo largo del mismo, pero gracias a su ayuda y dedicación hemos podido sacar adelante el proyecto y cumplir con los objetivos que nos marcamos al comienzo.

A mis padres, sin su sacrificio y su apoyo a lo largo de este duro camino nada de esto habría sido posible. Ellos han sido siempre los primeros que han estado ahí en los momentos más duros, en los que pierdes la confianza en ti mismo y no te vez capaz de lograrlo, los que conseguían que me volviese a levantar y no me diese por vencido nunca. Gracias mamá por estar ahí cuando te necesitaba, apoyándome y confiando siempre en que alcanzaría mi sueño. Gracias papá por escucharme siempre fuese la hora que fuese y creer en mí sin ninguna duda, sin tu apoyo no lo hubiera conseguido. Soy un afortunado de tener los padres que tengo y de ser vuestro hijo, os quiero mucho.

A mi hermano, por estar ahí en los momentos complicados, escuchándome, apoyándome y alegrándote de mis éxitos. Se que te sientes orgulloso de poder ver a tu hermano conseguir aquello que tanto le ha costado. Gracias de corazón, te quiero mucho.

A toda mi familia en general, por los consejos que me habéis dado a lo largo de estos años. Sé que os sentís orgullosos de ver que uno de mis objetivos en la vida se ha cumplido.

A mis amigos, por estar siempre. Fernando Jesús (Ferchu) desde pequeños nos conocemos y los dos a día de hoy podemos decir que somos Ingenieros de Telecomunicaciones, más que un amigo eres un hermano para mí. Gracias por tu ayuda, tus consejos y tu compañía a lo largo de la carrera, sin ti todo hubiese sido mucho más duro. Jose Ramón (Serra) llegaste sin esperarlo a lo largo de la carrera y a día de hoy eres un hermano más para mí, me aportaste el punto de diversión a mi vida y gracias a tu compañía y amistad el camino ha sido mucho más ameno y divertido. Gracias por estar siempre que se te necesita, eres un pilar importante para mí. Y por último agradecer a Fernando, otro amigo que me ha dado la carrera, su ayuda, compañía y amistad a lo largo de la carrera, en la cual ayudándonos mutuamente en la especialidad hemos conseguido hacer lo complicado mucho más ameno.

Juan Antonio Ocaña Guerrero

Sevilla, 2022

Como todos conocemos, la reciente pandemia provocada por el SARS-CoV-2 ha dado lugar a que la población en su mayoría conozca o haya escuchado alguna vez a lo largo de la pandemia el término PCR (reacción en cadena de polimerasa), hasta entonces desconocido para la gran mayoría. Esta situación ha mostrado a la sociedad española la importancia de la investigación y como el campo de la medicina junto con la biología está íntimamente relacionado con la electrónica, concretamente con el desarrollo de tecnologías para el diagnóstico de enfermedades víricas a nivel mundial.

Este proyecto abarca todo lo relacionado con la detección de PCR, desde los conceptos más básicos como en que consiste la propia PCR hasta el método de detección, en el cual se va a centrar todo el proyecto, la electroforesis. Posteriormente, se diseña y se fabrica un dispositivo capaz de realizar la detección del resultado de la PCR unificando todos los procesos en un solo dispositivo. La finalidad de este proyecto es la fabricación de un dispositivo compacto y modular con facilidad para su montaje y que permita ser transportado de forma sencilla.

Abstract

As we all know, the recent pandemic caused by SARS-CoV-2 has led to the majority of the population being familiar with or having heard the term PCR (polymerase chain reaction) during the pandemic, until then unknown to the vast majority. This situation has shown Spanish society the importance of research and how the field of medicine, together with biology, is closely related to electronics, specifically with the development of technologies for the diagnosis of viral diseases worldwide.

This project covers everything related to PCR detection, from the most basic concepts such as what PCR itself consists of to the detection method on which the entire project will focus, electrophoresis. Subsequently, a device capable of detecting the PCR result is designed and manufactured, unifying all the processes in a single device. The purpose of this project is to manufacture a compact and modular device that is easy to assemble and easy to transport.

Agradecimientos	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Índice de Tablas	xv
Índice de Anexos	xvii
Índice de Figuras	xix
1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DEL TFG	1
1.1 <i>Introducción</i>	1
1.2 <i>Conceptos fundamentales</i>	2
1.2.1 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	2
1.2.2 Electroforesis	5
1.2.3 Proceso de la electroforesis	11
2 Estado del arte	15
2.1 <i>Investigaciones relacionadas con el proceso de electroforesis en gel de agarosa</i>	15
2.2 <i>Dispositivos comerciales</i>	18
3 Esquema general	11
3.1 <i>Objetivo del Proyecto</i>	11
3.2 <i>Esquema general del proyecto</i>	12
3.2.1 Detección de Líquido (TAE)	12
3.2.2 Agarosa	13
3.2.3 Control de Temperatura	13
3.2.4 Electroforesis	13
3.2.5 Funcionamiento del Proyecto a desarrollar	13
4 Sensor de conductividad	15
4.1 <i>Fabricación del sensor de conductividad</i>	15
4.2 <i>Procedimiento a seguir para la toma de muestras</i>	17
4.3 <i>Resultados de las pruebas para los distintos sensores de conductividad</i>	20
4.3.1 Resultados sensor tamaño 1cmX1cm	20
4.3.2 Resultados sensor tamaño 5mmX5mm	21
4.3.3 Resultados sensor tamaño 4mmX4mm	22
4.3.4 Resultados sensor tamaño 2mmX2mm	23
4.3.5 Resultados sensor tamaño 1mmX1mm	24
4.4 <i>Solución final</i>	24
5 Sensor de temperatura y calentador	26
5.1 <i>Empleo de un NTC como sensor de temperatura</i>	26
5.2 <i>Empleo de un microcalentador</i>	28
5.2.1 Fabricación del microcalentador	28
6 Control de temperatura	30

6.1	<i>Circuito eléctrico del control de temperatura</i>	30
6.1.1	Driver TC4427	31
6.1.2	Transistor mosfet tipo N	31
6.2	<i>Esquema general del control de temperatura</i>	32
6.3	<i>Explicación detallada de cada una de las partes del control de temperatura</i>	33
6.3.1	NTC como sensor de temperatura	33
6.3.2	Encendido del microcalentador	33
6.3.3	Temperatura máxima de calentado de la mezcla	33
6.3.4	Empleo de un controlador PID	34
6.3.5	Definición de los intervalos de funcionamiento del microcalentador	35
6.3.6	Señalización de la temperatura alcanzada mediante LEDS	36
6.3.7	Arduino como cerebro electrónico de la placa	37
6.3.8	Resultado de la muestra obtenida	38
7	Fabricación del sistema completo	39
7.1	<i>Estructuras de metacrilato</i>	39
7.2	<i>Sensor de conductividad</i>	40
7.3	<i>Microcalentador</i>	42
7.4	<i>Montaje del sistema completo sin electrónica (Microcalentador + sensores)</i>	43
7.5	<i>Problema presentado con el montaje anterior</i>	44
7.6	<i>Montaje alternativo del sistema completo sin electrónica (Microcalentador + sensores)</i>	46
8	Circuitos electrónicos	49
8.1	<i>Selección de Agarosa/Electroforesis</i>	49
8.1.1	Esquemático del circuito completo	49
8.1.2	Elementos empleados en el circuito	50
8.1.3	Prototipo final de la placa fabricado	51
9	Montaje experimental y resultados	52
10	Conclusiones	63
11	Trabajos futuros-mejoras	65
	Referencias	67
	Anexos	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración recomendada en gel de agarosa para separar moléculas de ADN lineales.	8
Tabla 2: Diferencias entre LAB-ON-PCB y LAB-ON-CHIP.	16
Tabla 3: Valores de resistencia para cada sensor.	18

ÍNDICE DE ANEXOS

<u>Anexo A: Pruebas realizadas para los distintos sensores de conductividad:</u>	69
<u>Anexo B: Microcalentador previo al definitivo:</u>	81
<u>Anexo C: Programación de Arduino UNO:</u>	83
<u>Anexo D: Proceso fotolitográfico para la fabricación de las placas electrónicas del proyecto:</u>	87
<u>Anexo E: Pruebas realizadas con ADN:</u>	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1: Proceso de replicación del ADN.	2
Ilustración 2: Componentes de la reacción de PCR.	3
Ilustración 3: Elementos empleados en el proceso de la electroforesis.	6
Ilustración 4: Cámaras de electroforesis.	7
Ilustración 5: Preparación de un gel de agarosa.	8
Ilustración 6: Transiluminador ultravioleta (UV)	10
Ilustración 7: Fuente de tensión.	10
Ilustración 8: Buffer de corrimiento y buffer de carga.	11
Ilustración 9: Movilidad de fragmentos de ADN.	11
Ilustración 10: LAB-ON-PCB en el que se muestra el resultado del amasado y curado después de retirar la estructura.	17
Ilustración 11: Sistema típico para realizar la electroforesis.	18
Ilustración 12: Invitrogen E-Gel Power Snap.	18
Ilustración 13: MyGel Instaview.	19
Ilustración 14: MyGel Mini.	20
Ilustración 15: MBE-150.	21
Ilustración 16: Mupid One.	21
Ilustración 17: Rotiphorese Proffesional RunView.	22
Ilustración 18: Diseño máscara sensor de conductividad Klayout.	15
Ilustración 19: Máscaras de los diversos sensores de conductividad.	16
Ilustración 20: Placa de los sensores de conductividad.	17
Ilustración 21: Montaje definitivo en PCB, para el sensor de conductividad.	18
Ilustración 22: Montaje real, basado en el esquemático, llevado a cabo para realizar las pruebas.	19
Ilustración 23: Montaje sensor 1cmX1cm.	20
Ilustración 24: Resultado sensor 1cmX1cm	20
Ilustración 25: Montaje sensor 5mmX5mm	21
Ilustración 26: Resultado sensor 5mmX5mm	21
Ilustración 27: Montaje sensor 4mmX4mm	22
Ilustración 28: Resultado sensor 4mmX4mm	22
Ilustración 29: Montaje sensor 2mmX2mm	23
Ilustración 30: Resultado sensor 2mmX2mm	23
Ilustración 31: Sensor de conductividad fabricado en PCB.	24
Ilustración 32: Resultado sensor 2mmX2mm.	25
Ilustración 33: Curva característica NTC.	26

Ilustración 34: NTC en la misma placa que el microcalentador.	27
Ilustración 35: Microcalentador fabricado.	28
Ilustración 36: Máscara microcalentador.	28
Ilustración 37: Esquema eléctrico control de temperatura.	30
Ilustración 38: Temperatura de la mezcla intentando alcanzar la temperatura de referencia establecida en 100°.	34
Ilustración 39: Temperatura de la mezcla controlada en 100° por el controlador PID.	34
Ilustración 40: Temperatura de la mezcla inferior a los 100°, porque ha terminado el periodo de calentado y la muestra se comienza a enfriar.	35
Ilustración 41: Esquema eléctrico LEDS.	37
Ilustración 42: Arduino UNO empleado en el proyecto.	38
Ilustración 43: Gel de agarosa fabricado para prueba.	38
Ilustración 44: Molde metacrilato (Vista lateral).	39
Ilustración 45: Molde metacrilato (Vista frontal).	39
Ilustración 46: Molde metacrilato (Vista superior).	39
Ilustración 47: Molde metacrilato peine (Vista frontal).	40
Ilustración 48: Molde metacrilato peine (Vista lateral).	40
Ilustración 49: Molde metacrilato peine (Vista superior).	40
Ilustración 50: Diseño máscara 2mmX2mm Klayout.	40
Ilustración 51: Máscara para fabricar sensor de conductividad más marco metacrilato.	41
Ilustración 52: Diseño del sensor de conductividad en KICAD más marco metacrilato.	41
Ilustración 53: Resultado sensor de conductividad en PCB.	41
Ilustración 54: Diseño microcalentador en KICAD más NTC.	42
Ilustración 55: Máscara fabricada del microcalentador más NTC.	42
Ilustración 56: Máscara para fabricar microcalentador más NTC.	42
Ilustración 57: Microcalentador fabricado más NTC (Primer plano).	43
Ilustración 58: Sensor de conductividad con marco de metacrilato sobre microcalentador. Molde con peines sin colocar aún.	43
Ilustración 59: Sensor de conductividad con marco de metacrilato sobre microcalentador. Molde con peines colocado en la parte superior del otro marco. (Vista lateral).	44
Ilustración 60: Sensor de conductividad con marco de metacrilato sobre microcalentador. Molde con peines colocado en la parte superior del otro marco. (Vista superior).	44
Ilustración 61: Sensor de conductividad con molde pegado solo con pegamento.	45
Ilustración 62: Sensor de conductividad con molde pegado con pegamento y silicona.	45
Ilustración 63: Sensor de conductividad con el que vamos a trabajar.	46
Ilustración 64: Placa del sensor de conductividad cortada.	46
Ilustración 65: Nuevo molde más molde para peines.	47
Ilustración 66: Nuevo molde fabricado.	47
Ilustración 67: Unión de los moldes en una misma estructura.	47
Ilustración 68: Montaje alternativo completo. (Vista lateral).	47
Ilustración 69: Montaje alternativo completo. (Vista superior).	48

Ilustración 70: Esquema eléctrico selección de agarosa/electroforesis.	49
Ilustración 71: Resultado circuito final para la selección de agarosa/electroforesis.	51
Ilustración 72: Dispositivo preparado para comenzar a funcionar.	52
Ilustración 73: Interruptor hacia la derecha.	53
Ilustración 74: Todos los LEDS se apagan porque comienza a funcionar el microcalentador.	53
Ilustración 75: Vertimos TAE sobre el molde. Sensor de conductividad, detecta la presencia de líquido.	53
Ilustración 76: LED rojo encendido, se ha alcanzado una temperatura de calentado muy elevada.	54
Ilustración 77: Burbujas en la mezcla cuando se alcanzan temperaturas cercanas a la de referencia.	54
Ilustración 78: LED amarillo encendido, el microcalentador se ha apagado, pero la mezcla sigue estando muy caliente.	55
Ilustración 79: LED verde encendido, la temperatura de la mezcla ha alcanzado los 35°C.	55
Ilustración 80: Pocillos creados en el proceso de fabricación del gel de agarosa.	56
Ilustración 81: Electrodo introducidos en el gel de agarosa.	56
Ilustración 82: TAE sobre gel de agarosa para llevar a cabo la electroforesis.	57
Ilustración 83: Tinta recién vertida en los pocillos.	57
Ilustración 84: Interruptor hacia la izquierda.	58
Ilustración 85: Después de 2 minutos del proceso de electroforesis.	58
Ilustración 86: Después de 4 minutos del proceso de electroforesis.	59
Ilustración 87: Después de 6 minutos del proceso de electroforesis.	59
Ilustración 88: Después de 8 minutos del proceso de electroforesis.	60
Ilustración 89: Después de 10 minutos del proceso de electroforesis.	60
Ilustración 90: Después de 12 minutos del proceso de electroforesis.	61
Ilustración 91: Imagen del proceso de migración de ADN después de aplicarle luz ultravioleta.	62

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DEL TFG

El presente documento con título “Dispositivo electrónico para la preparación de gel de agarosa y realización de electroforesis.” se encuentra dentro de la normativa referente al Trabajo Fin de Grado de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Sevilla para la obtención de los créditos ECTS de la asignatura Trabajo Fin de Grado, y así conseguir el título de Ingeniero de las Tecnologías de Telecomunicación.

Dicho trabajo de fin de Grado se ha llevado a cabo en el Departamento de Ingeniería Electrónica y Microsistemas, tutelado por el profesor D. Francisco Antonio Perdignes Sánchez.

El desarrollo de nuestro trabajo se ha centrado en el proceso de la detección del resultado de la PCR (reacción en cadena de polimerasa) que actualmente tiene un gran peso en nuestra sociedad debido a la gran pandemia que está afrontando el mundo. Investigaremos como podremos integrar todos los componentes necesarios para realizar la detección de ADN resultado de una PCR en un solo dispositivos lo más compacto posible.

En definitiva, con este trabajo, lo que se busca es facilitar el proceso para preparar la agarosa y realizar la electroforesis con un dispositivo compacto como se detallará en este documento.

1.1 Introducción

El Desarrollo de este trabajo se encuentra dentro del grupo de investigación (Grupo de Dispositivos y Sistemas Electrónicos) TIC:267 perteneciente al Departamento de Ingeniería Electrónica y que trata varias líneas de investigación como:

- Diseño de Dispositivos y Sistemas Electrónicos para su Aplicación en Telemedicina
- Microsistemas Sensoriales, Microfluidicos, Rf-MEMS y Microópticos.

En particular nuestro Trabajo fin de Grado se encuentra dentro de la línea de investigación de “diseño de sistemas electrónicos para su aplicación en la biomedicina” particularizando este proyecto en la detección de los resultados de la PCR.

Como introducción para este proyecto es importante destacar las numerosas aplicaciones que tiene la PCR que van desde la arqueología, la medicina forense hasta la medicina clínica. Para este trabajo se va a utilizar la PCR con fines médicos clínicos, pero no se va a centrar en el proceso de realización de la PCR sino en la detección y es en estos momentos donde entra en acción la electroforesis.

Las circunstancias actuales producidas por la pandemia han provocado que la sociedad al completo o al menos en su gran mayoría hayan escuchado el término PCR y todo lo que eso conlleva.

Este proyecto comprende todo lo relacionado con la detección de los resultados de la PCR, desde los conceptos más básicos, para una correcta comprensión, hasta el diseño y la fabricación de un dispositivo compacto donde se integran todos los procesos necesarios para la realización de la detección.

1.2 Conceptos fundamentales

Para poder tener una visión mucho más completa del proyecto y facilitar así la comprensión del objetivo final se van a definir detalladamente los conceptos más importantes y esenciales como es el propio concepto de la PCR y el método de detección que se va a utilizar para observar los resultados.

1.2.1 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, ya que permite obtener millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula.

La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. Estas proteínas actúan en diferentes actividades como:

- La identificación del sitio de origen de la replicación.
- El desenrollamiento de la doble hélice.
- La estabilización de la estructura desenrollada.

En la ilustración 1, podemos apreciar el proceso de replicación del ADN donde la enzima más importante en la replicación es la polimerasa, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN.

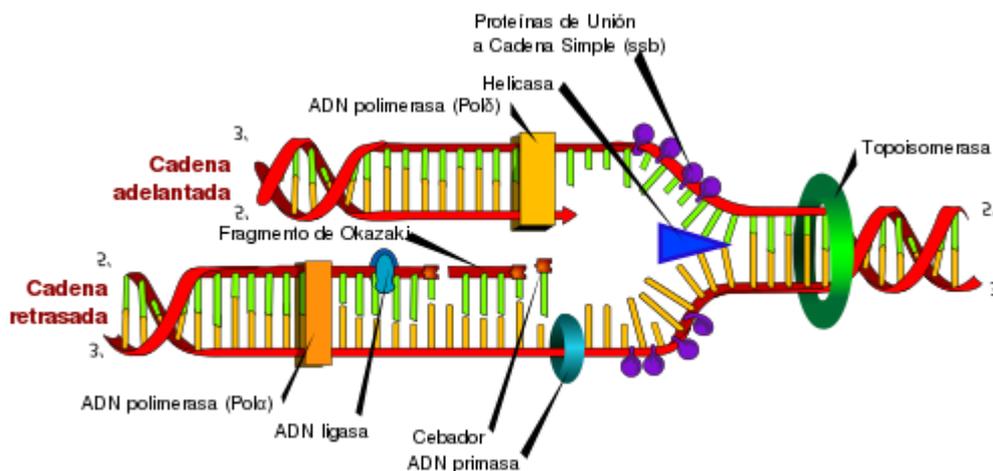


Ilustración 1: Proceso de replicación del ADN.

En la PCR, se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando:

1. El ADN que contiene el fragmento ó los fragmentos que se van a amplificar.
2. La polimerasa.
3. Los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar).
4. Desoxinucleótidos.
5. Cloruro de magnesio u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa.

Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular.

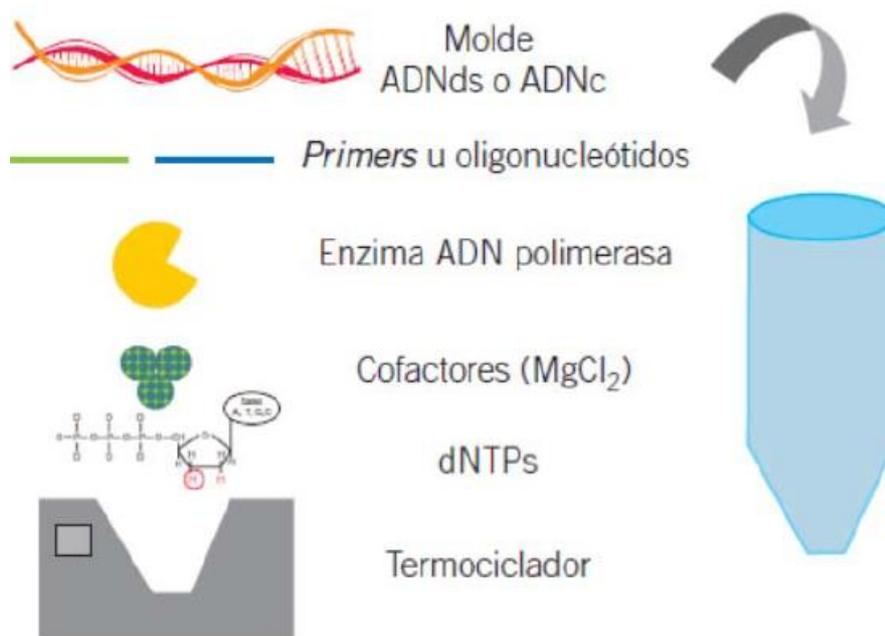


Ilustración 2: Componentes de la reacción de PCR.

La realización de la PCR contiene los siguientes pasos:

1. Inicio de desnaturalización.
2. Ciclos de amplificación.
 - a. Temperatura de desnaturalización.
 - b. Temperatura de alineamiento.
 - c. Temperatura de extensión.
3. Amplificación final.
4. Almacenamiento temporal.

Estos pasos se llevan a cabo mediante el cambio automático de temperaturas en un equipo diseñado para este fin, denominado termociclador.

Pasamos a explicar más detalladamente los pasos de la PCR:

- Comenzamos con la desnaturalización, este proceso comienza aplicando 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de ADN (separación inicial de las hebras). Esta temperatura se mantiene durante 5 minutos al inicio de la PCR.
- Pasamos a los ciclos de amplificación (este ciclaje de temperatura se repite continuamente de 30 a 35 veces), los cuales consta de las tres temperaturas siguientes:
 - 95°C: desnaturalización por unos 30 segundos.
 - 55 a 60°C: alineación por 30 a 40 segundos.
 - 72°C extensión.
- Una vez terminados los ciclos designados para la PCR pasamos a la amplificación final. La temperatura de extensión (72°C) se mantiene por cinco minutos, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida.
- Finalmente pasamos al almacenamiento temporal. Durante la programación de los ciclos de la PCR se programa también un ciclo final de 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR hasta que se retiren los tubos de reacción del equipo. La técnica de PCR ha evolucionado desde su invención. En la actualidad, gracias a los múltiples sistemas de detección se dispone de diversas variantes de la técnica, las cuales se enumeran a continuación:
 - a. PCR convencional. Se basa en la detección del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. Es la técnica que vamos a utilizar en nuestro proyecto.
 - b. PCR cualitativa. Esta modalidad de PCR permite detectar la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado.
 - c. PCR semicuantitativa. Permite conocer la expresión de un gen (ARNm) en particular que se expresa de manera constante en la célula.
 - d. PCR cuantitativa. En esta modalidad de PCR, el producto de PCR es cuantificable, lo que permite reportar en números absolutos la cantidad de un microorganismo o el ARNm de un gen en una muestra.
 - e. PCR múltiple. En este tipo de PCR se realiza la amplificación de más de un fragmento de ADN en una sola reacción de PCR.
 - f. PCR selectiva. Para la PCR selectiva se diseñan cebadores capaces de hibridar solamente en secuencias con presencia de una mutación.
 - g. PCR in situ. Esta modalidad de PCR permite saber que tipo celular presente en un tejido expresa un determinado gen o qué célula está infectada por un patógeno.

- h. PCR en punto final. Es aquella en la que el producto de PCR se analiza después de 25 a 35 ciclos, en el punto previo a la saturación de la reacción, mediante una electroforesis en gel. Presenta una precisión pobre y una sensibilidad menor que la PCR en tiempo real.
- i. PCR en tiempo real. La reacción de amplificación es la misma que la empleada en la PCR en punto final, lo que cambia es el método de detección del producto amplificado y su temporalidad. La detección de las copias del producto de PCR se realiza al mismo tiempo que sucede la amplificación.

Para finalizar este apartado es importante comentar las aplicaciones de la PCR, las cuales van desde la detección de patógenos infecciosos (virus, bacterias, hongos), pasando por las aplicaciones en la medicina forense y la detección de mutaciones, hasta la detección de carga viral, entre otras muchas aplicaciones.

1.2.2 Electroforesis

En biología molecular, una gran cantidad de técnicas que se realizan comúnmente requieren el uso de electroforesis. Por tanto, ésta supone una parte importante del procedimiento sistemático del análisis (separación, preparación...) de los ácidos nucleicos y las proteínas.

La mayoría de las biómoleculas poseen una carga eléctrica cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran, por lo que pueden desplazarse cuando se ven sometidas a un campo eléctrico hacia el polo de carga opuesta al de la molécula. [1]

El principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz porosa, que se desplazará en función del peso molecular o tamaño. El movimiento de las moléculas es generado por el campo eléctrico.

Nuestro proyecto de detección de PCR esta basado en la electroforesis y es por ello por lo que este apartado tiene bastante importancia en nuestro documento.

Se va a explicar de forma general en que consiste el proceso y los elementos que se necesita para llevarlo a cabo. Una vez entendido el concepto lo adaptaremos a nuestras necesidades.

1.2.2.1 Elementos de la electroforesis

Comenzaremos nombrando los elementos necesarios para realizar el proceso de la electroforesis y después detallaremos los mismos con mayor precisión. Estos elementos son:

- Cámara de electroforesis.
- Peine para pocillos.
- Gel.
- Transiluminador.
- Fuente de poder (Fuente de tensión).
- Buffer de corrimiento.
- Buffer de carga.

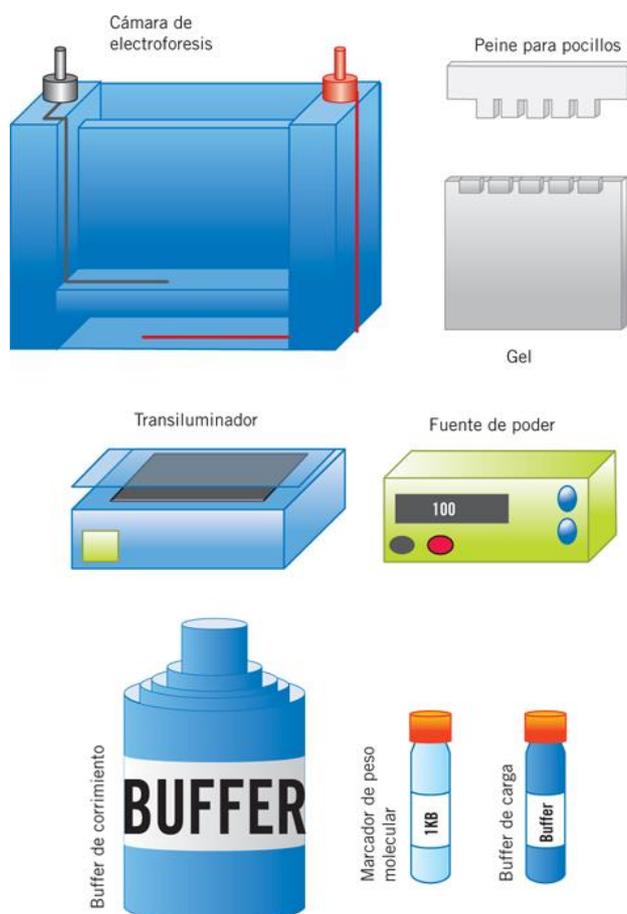


Ilustración 3: Elementos empleados en el proceso de la electroforesis.

A continuación, vamos a detallar cada uno de los elementos mostrados en la imagen anterior con una mayor precisión para facilitar su comprensión en el proceso de la electroforesis.

1.2.2.1.1 Cámara de electroforesis

La cámara de electroforesis es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor de un gel donde se depositan las muestras. Este campo se genera dentro de una solución amortiguadora en la que se encuentra sumergido el gel que contiene las muestras; el alto contenido de electrolitos permite la transmisión de la corriente eléctrica, manteniendo el pH estable al paso de la corriente. La cámara cuenta con dos polos que se conectan a una fuente de tensión. En las cámaras de electroforesis vertical el polo positivo se encuentra en la parte inferior de la cámara y en las horizontales, en uno de los extremos. En ambos tipos de cámaras el polo positivo se distingue con color rojo y el negativo con negro.

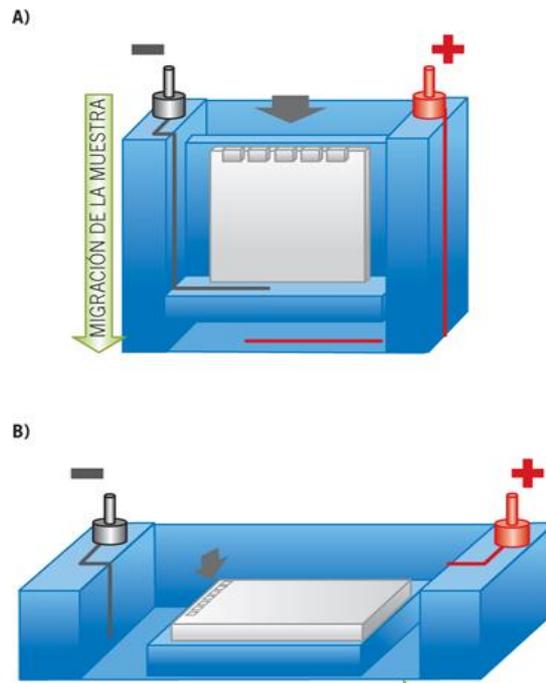


Ilustración 4: Cámaras de electroforesis.

- A) En las cámaras de electroforesis vertical el corrimiento de la muestra sigue la gravedad, ya que el polo positivo se encuentra en la parte inferior de la cámara.
- B) En la electroforesis horizontal debe cuidarse que el ánodo se coloque hacia el extremo del gel donde corren las muestras, de lo contrario las muestras se salen del gel.

1.2.2.1.2 Gel

Las muestras destinadas a llevar a cabo el proceso de la electroforesis deben colocarse sobre un medio de soporte, con la finalidad de evitar perturbaciones mecánicas durante la separación. El soporte idóneo es un gel semisólido o gelatinoso, compuesto por polímeros que forman una especie de malla o microporos tridimensionales a través de los cuales avanzan las moléculas, según el peso molecular, lo que permite la separación por tamaño de los diferentes componentes de la muestra. Los geles pueden ser de agarosa o poliacrilamida. Para la separación de ácidos nucleicos se usan geles de agarosa o acrilamida y para proteínas, sólo de acrilamida.

1.2.2.1.3 Geles de agarosa

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente y que a su vez, se disuelve fácilmente en temperatura de 50 a 60°C. Una vez se encuentra en estado líquido, se solidifica cuando se enfría formando un gel altamente poroso.

Para elaborar el gel se pesa la cantidad de agarosa requerida, se disuelve en una solución amortiguadora adecuada de la misma composición y concentración que el *buffer* de corrimiento y se calienta hasta formar una solución. El gel está formado por agarosa en polvo y TAE *buffer* (Tris- Acetate-EDTA *buffer*), que una vez mezclados, solidifica a temperatura ambiente.

Sin dejar enfriar se vacía inmediatamente sobre un molde de forma rectangular y en uno de los extremos se coloca un aditamento en forma de peine con la finalidad de generar los pocillos u orificios donde se colocarán las muestras.

La agarosa posee ventajas sobre la acrilamida, ya que no es un compuesto tóxico y permite realizar el análisis de ácidos nucleicos con pesos moleculares variados, según la concentración de agarosa que se emplee. Sin embargo, su poder de resolución es menor que el de los geles de poliacrilamida.

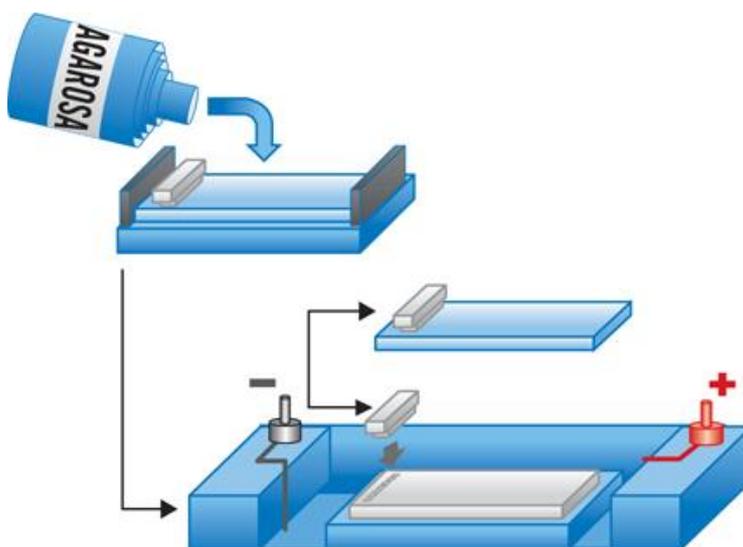


Ilustración 5: Preparación de un gel de agarosa.

La agarosa es un polvo que para disolverse requiere calentarse hasta la ebullición del solvente. Una vez obtenido el líquido de agarosa, antes de que se enfríe a menos de 50°C se coloca en una cámara para formar el gel. El gel se coloca de manera que los pocillos queden en el extremo donde se localiza en polo negativo de la cámara de electroforesis, para permitir que la muestra corra a lo largo del gel.

Antes de una electroforesis es importante la linearización y la eliminación de estructuras secundarias por desnaturalización de la muestra. La concentración de agarosa más utilizada para electroforesis de ácidos nucleicos es de 0.5 a 2%. [2] (Véase Tabla 1).

Tabla 1: Concentración recomendada en gel de agarosa para separar moléculas de ADN lineales.

Concentración de agarosa	Tamaño de los fragmentos de ADN separados
0.3%	5-60 kpb
0.5%	1-30 kpb
0.7%	0'8-12 kpb
1.0%	0'5-10 kpb
1.2%	0'4-7 kpb
1.5%	0'2-3 kpb
2.0%	0'05-2 kpb

La concentración de agarosa se escoge según el tamaño del ácido nucleico que se vaya a analizar. Dicha concentración, tal y como se puede apreciar en la tabla se mide en “kpb” que viene a significar “kilo-pares de bases”.

El tamaño de los poros de la matriz del gel depende de la concentración de agarosa utilizada y la concentración de agarosa es inversamente proporcional al tamaño del poro obtenido; esto es, a mayor concentración, menor tamaño de los poros, y viceversa, si los poros son pequeños la migración del ácido nucleico es más lenta. La representa la migración de las moléculas de ADN en un gel de agarosa.

Durante la electroforesis, los ácidos nucleicos lineales con un peso molecular alto migran al ánodo más lentamente que los de menor peso molecular. Esto se debe a que los ácidos nucleicos de peso elevado tardan más tiempo en atravesar los poros de agarosa. En el caso de ácidos nucleicos no linearizados, como plásmidos circulares (conformación nativa), ARN con estructuras secundarias o ADN de gran longitud, la migración no sólo depende del peso molecular sino también del grado de empaquetamiento que presenten.

1.2.2.1.4 Geles de acrilamida

La acrilamida es un polímero sintético, termoestable, incoloro y químicamente inerte, con el que se pueden generar geles con un amplio intervalo de tamaños de poro. El gel de poliacrilamida es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. El tamaño de poro de un gel de acrilamida está determinado por la concentración total de acrilamida presente (acrilamida + bisacrilamida), que generalmente se maneja en proporción de 19:1. Regulando la concentración de ambas y su proporción se consiguen distintas porosidades, siempre menores que la de los geles de agarosa.

La bisacrilamida, o N, N'-metilenbisacrilamida, está compuesta por dos moléculas de poliacrilamida enlazadas por sus grupos amino, no reactivos. Este compuesto polimeriza conjuntamente con la acrilamida y establece puentes entre las cadenas lineales de poliacrilamida, con lo que se evita su deslizamiento y conduce a la formación del gel.

El gel de acrilamida es capaz de soportar mayores voltajes que la agarosa y es susceptible de teñirse por varios procedimientos, y también puede desteñirse en caso necesario. La electroforesis con geles de acrilamida siempre se realiza en cámaras verticales.

1.2.2.1.5 Transiluminador ultravioleta

El transiluminador transmite luz del espectro ultravioleta a través de la muestra, excitando la molécula cromogénica que emite energía fluorescente que permite visualizarla. El transiluminador es el sistema empleado con más frecuencia por ser simple y efectivo. En general emiten energía a una longitud de onda a 302 nm, aunque también existen para 254 y 365 nm; y suelen contar con un botón para baja/alta intensidades por si se requiere una menor exposición de la muestra a la luz ultravioleta. Algunos también permiten la selección de entre dos longitudes de onda, lo que los hace más flexibles.

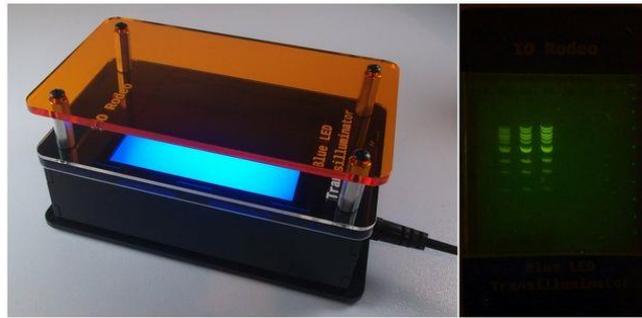


Ilustración 6: Transiluminador ultravioleta (UV)

1.2.2.1.6 Fuente de tensión

Nos encontramos ante uno de los componentes más importante en el proceso de la electroforesis. Gracias a la fuente de tensión conseguimos que las moléculas del ADN se desplacen del cátodo al ánodo.

Esta fuente de tensión debe ser capaz de dar una tensión de salida constante cuyo rango de valor recomendado oscila entre los 75V y 100V. Este rango de tensión está determinado para el caso concreto que nos vamos a encontrar en el proyecto, el cual es la detección de PCR utilizando gel de agarosa, ya que el voltaje aplicado viene determinado por el peso molecular de las moléculas de ADN que se van a separar; para el caso de productos de PCR el peso molecular se encuentra entre 100pb y 1.5kpb.



Ilustración 7: Fuente de tensión.

1.2.2.1.7 Buffer de corrimiento y buffer de carga

El buffer de corrimiento proporciona el medio para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza el corrimiento.

El buffer de carga tiene como objetivo brindar peso, densidad y color a la muestra, lo que facilita su depósito en el pocillo y evita su salida del gel. Se emplean en relación 1:3 para ácidos nucleicos.

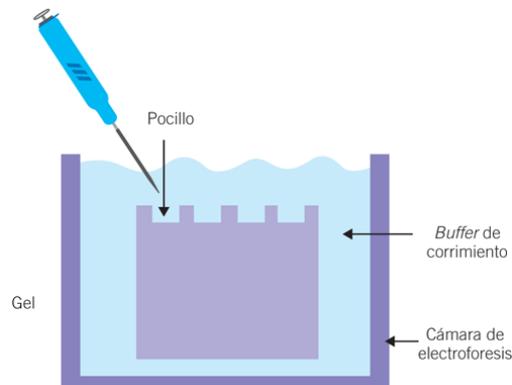


Ilustración 8: Buffer de corrimiento y buffer de carga.

1.2.3 Proceso de la electroforesis

El método más común para la electroforesis de ADN es elaborar un gel horizontal de agarosa, con una concentración de 0.5 a 2%. La carga eléctrica de la molécula de ADN la otorgan sus grupos fosfato, de carga negativa, y cuyo número es igual al doble del número de pares de bases. Dado que la forma de la molécula de ADN siempre es la misma, la movilidad de la electroforesis dependerá únicamente de la longitud del ADN (pb) y se representará en bandas (Ilustración 9).

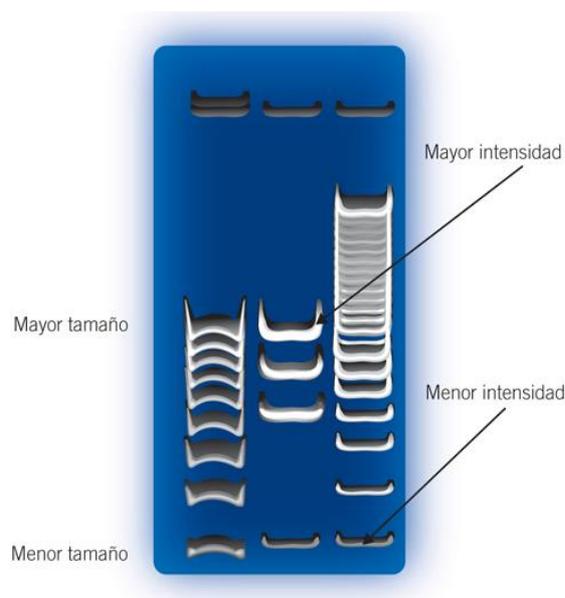


Ilustración 9: Movilidad de fragmentos de ADN.

El corrimiento se realiza a voltajes de entre 25V y 100 V; a mayor voltaje mayor velocidad de corrimiento. El avance electroforético se monitorea a través de la visualización de los colorantes contenidos en el *buffer* de carga con el que se mezcló con la muestra previa a su colocación en el pocillo.

Como se ha comentado con anterioridad, la agarosa es ideal para preparar geles analíticos de productos procedentes de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen de agarosa depende del tamaño de la cámara de electroforesis.

Inmediatamente después de vaciar la agarosa a la cámara, debe insertarse el o los peines necesarios. La agarosa tarda en solidificar alrededor de 20 minutos. Una vez solidificado el gel, se añade el *buffer* de corrimiento (TAE o TBE), cubriendo perfectamente el gel y se retiran los peines.

Las muestras se mezclan con el *buffer* de carga y se depositan cuidadosamente en los pocillos, evitando que se salgan y puedan entrar en otros pozos contaminando el pocillo contiguo.

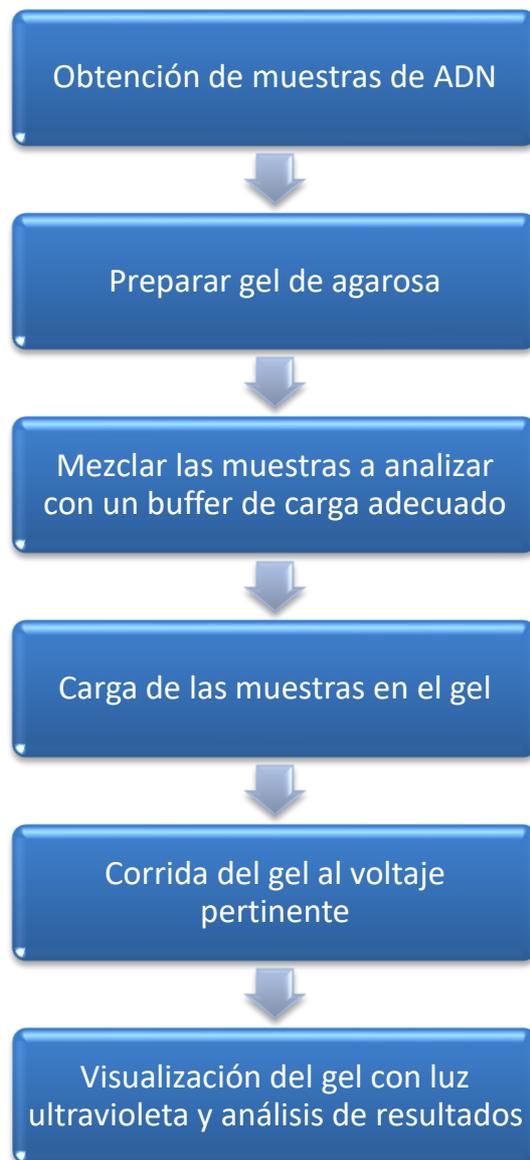
Una vez depositadas las muestras en los pocillos se procede a la transmisión de la corriente eléctrica. Se conectan los cables de la fuente de energía de cada polo eléctrico a la cámara de electroforesis en el electrodo que le corresponda y se aplica un voltaje de acuerdo con el peso molecular de las moléculas de ADN que se va a separar. Para el caso de productos de PCR se recomienda usar voltajes comprendidos entre 75 y 100 V.

Durante el corrimiento se monitorea la migración de la muestra con colores que contiene el *buffer* de carga. La electroforesis se detiene cuando se considera que la muestra se localiza en la posición deseada, o bien cuando la muestra ha corrido por lo menos tres cuartas partes del gel.

Hay múltiples factores que pueden afectar la migración del ADN, como la concentración del gel utilizado, el tamaño de la molécula de ADN muestra, el empaquetamiento del ADN, el voltaje, la temperatura del *buffer* de corrimiento (que puede aumentar demasiado si el voltaje es muy alto), la contaminación con agentes intercalantes en la muestra, la composición del *buffer* de corrimiento, etcétera.

Una vez finalizada la etapa de aplicación del campo eléctrico, se debe colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda = 300nm$). Al aplicar la luz ultravioleta el ADN se visualizará como banda de color anaranjado. [3]

Para finalizar este apartado se incluye un esquema a modo de resumen con el único objetivo de facilitar la comprensión de las diferentes etapas que se realizan en la electroforesis:



2 ESTADO DEL ARTE

En este capítulo vamos a tratar algunas de las investigaciones relacionadas con el proceso de la electroforesis en gel de agarosa, con el objetivo de tener una visión más amplia del desarrollo tecnológico que se está experimentando en todo lo relacionado con la unión de la biomedicina y la electrónica.

Además, detallaremos cuales son los dispositivos comerciales que actualmente más se asemejan en funcionalidad al dispositivo que estamos desarrollando en nuestro proyecto. Y finalmente, se comentarán las características básicas de estos dispositivos y sus componentes con el objetivo de poder visualizar las diferentes opciones que existen en la actualidad.

2.1 Investigaciones relacionadas con el proceso de electroforesis en gel de agarosa

Debido a la situación sanitaria que ha estado golpeando a la sociedad durante los últimos años, provocada por la pandemia COVID-19 se ha desarrollado de forma rápida y sorprendente el campo de la investigación, dando lugar a nuevas soluciones y mejoras de aquellas que ya existían.

Para este apartado vamos a tratar un artículo científico, desarrollado por la Universidad de Sevilla concretamente en el Departamento de Ingeniería Electrónica titulado “Semi-Automatic Lab-on-PCB System for Agarose Gel Preparation and Electrophoresis for Biomedical Applications”. [4]

Antes de entrar a detallar el artículo científico, es necesario explicar brevemente en que consiste un Lab-on-PCB para poder comprender por completo el documento.

Los Lab-on-PCB han sido objeto de una creciente investigación en los últimos años. Estos dispositivos surgieron como una evolución prometedora de los dispositivos lab-on-chip y la tecnología PCB-MEMS. Comparten propiedades importantes con los dispositivos de laboratorio en chip, por ejemplo, un volumen de líquido pequeño y un tiempo de respuesta rápido. En particular, el núcleo de estos dispositivos es la integración de sensores para medir los resultados de una reacción y para controlar los parámetros de las muestras; y la integración de actuadores para acondicionar las muestras y para mover esas muestras a través de la plataforma microfluídica.

La necesidad de micromezclado, microcalentamiento y detección en diferentes partes de las plataformas de microfluidos hace que el control de líquidos sea obligatorio. Por esta razón, la conducción de flujo y la manipulación de fluidos en una red de microcanales es uno de los temas más importantes para los dispositivos y plataformas de laboratorio en chip (LoC), y particularmente para laboratorio en PCB.

Aunque lab-on-chip y lab-on-PCB tienen características en común, y lab-on-PCB puede considerarse como una especie de lab-on-chip, son plataformas diferentes. Por ejemplo, a diferencia de los laboratorios en chips, los laboratorios en PCB son interesantes debido a la fácil integración de la microfluídica y la electrónica en la misma plataforma, hacia sistemas autónomos para aplicaciones microfluídicas. Además de la integración, el interés en los dispositivos lab-on-PCB radica en la disponibilidad comercial del sustrato de PCB con dimensiones muy razonables a bajo costo. Gracias a esta característica, los dispositivos lab-on-PCB pueden ser desechables a bajo costo.

Como se ha dicho anteriormente, los dispositivos lab-on-PCB son una opción muy interesante por su bajo coste. Esta es una diferencia importante con respecto a los dispositivos lab-on-chip, y hace que los dispositivos lab-on-PCB sean una opción atractiva desde el punto de vista del mercado.

Las principales características que diferencian los lab-on-chip de los lab-on-PCB se resumen en: [5]

Tabla 2: Diferencias entre LAB-ON-PCB y LAB-ON-CHIP.

Característica	laboratorio en chip	Laboratorio en PCB
Materiales para microfluídica	Silicio, vidrio, plástico	placa de circuito impreso, plástico
Materiales de sustrato	Silicio, vidrio, plástico	PCB (rígido/flexible)
Número máximo de capas de metal	2 (excepto silicio)	30 [15]
Fabricación de pistas electrónicas.	Sí	Sí (bajo costo)
Sustrato disponible comercialmente	Sí	Sí (bajo costo/electrónica integrada)
Virutas resistentes a impactos	Frágil (silicio, vidrio)	Robusto
Transparencia	Sí	No
Electrónica altamente integrada	Sí (silicio)	No
Componentes electrónicos discretos	SMD	SMD y orificio pasante
Integración de sensores/actuadores	Sí	Sí (bajo costo)
Rendimiento de detección	Alto	Medio
biocompatibilidad	Sí	Sí (capa aislante)
Mejor escenario de aplicación	Óptica y/o alta sensibilidad	El resto de las aplicaciones
Desechable a bajo costo	Sí (plástico)	Sí
Potencial de comercialización	Bajo	Muy alto

Una vez detallado en que consiste un lab-on-PCB y sus diferencias pertinentes con los lab-on-chip, vamos a continuar con la explicación del artículo mencionado previamente, para que se pueda llegar a

comprender de una manera más eficiente las investigaciones que se llevan hoy en día a cabo en materia de electroforesis en gel de agarosa.

En el artículo se desarrolla un prototipo de laboratorio semiautomático en PCB para la preparación de gel de agarosa y electroforesis. El prototipo incluye un sensor de conductividad para detectar el tampón TAE, un microcalentador para aumentar la solubilidad de la agarosa, un termistor de coeficiente de temperatura negativo (NTC) para controlar la temperatura, un sensor de resistencia dependiente de la luz (LDR) para medir la transparencia de la mezcla y dos electrodos para realizar la electroforesis. Las funciones de preparación de agarosa están gobernadas por un microcontrolador.

Este dispositivo está diseñado para integrarse como parte de un sistema de laboratorio en PCB más grande para la amplificación y detección de ADN. Sin embargo, puede usarse para migrar ADN amplificado en termocicladores convencionales. Además, el dispositivo se puede modificar para preparar geles de agarosa más grandes y realizar electroforesis.

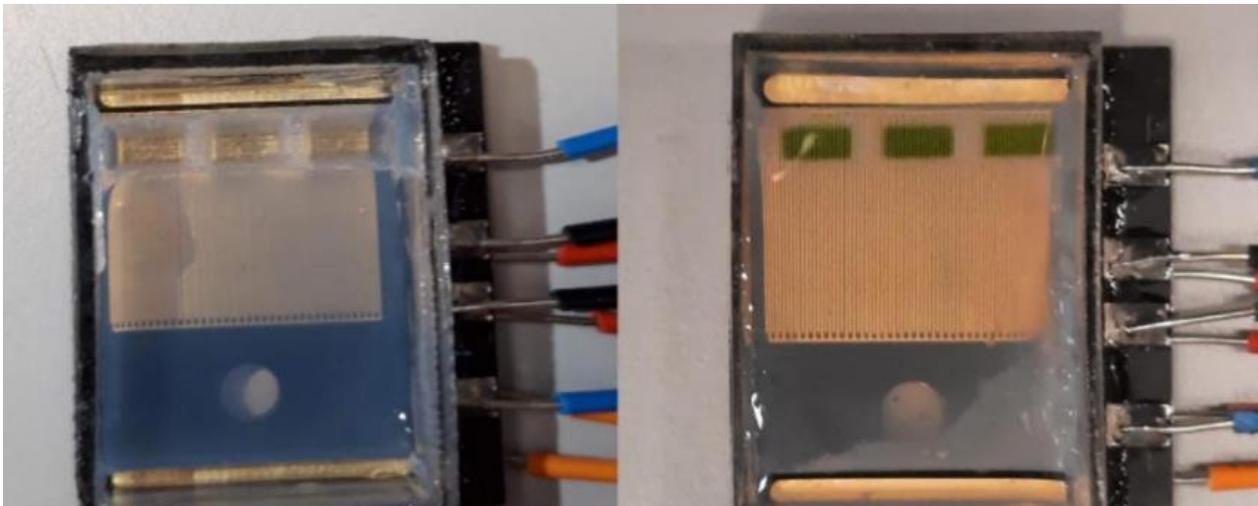


Ilustración 10: LAB-ON-PCB en el que se muestra el resultado del amasado y curado después de retirar la estructura.

Hemos elegido este artículo científico porque al igual que en nuestro proyecto, en él se realiza la electroforesis en gel de agarosa. Básicamente, el artículo que estamos detallando es la base sobre la que se va a sustentar nuestro proyecto, ya que el objetivo es mejorar los resultados conseguidos en dicha investigación.

El objetivo fundamental de este apartado es mostrar el proyecto inicial sobre el que se basa nuestro proyecto y demostrar que la ciencia avanza a pasos agigantados y de una forma muy rápida, gracias a la cual se pueden desarrollar proyectos que mejoren de manera eficiente a los primeros prototipos que fueron creados.

Gran parte del desarrollo tecnológico basado en este campo vino propiciado por la pandemia que ha azotado al mundo durante este tiempo.

2.2 Dispositivos comerciales

A continuación, vamos a hablar de los distintos dispositivos comerciales que tienen una funcionalidad parecida al proyecto que nosotros estamos desarrollando.

Actualmente, en los laboratorios se suelen utilizar sistemas formados por una fuente de alimentación, junto con una cámara de electroforesis y un sistema de iluminación (para observar los resultados), todos ellos independientes entre sí y que no están integrados en un mismo dispositivo.



Ilustración 11: Sistema típico para realizar la electroforesis.

En la ilustración anterior, podemos observar un sistema típico en el que se suele realizar la electroforesis y que suele estar presente en la mayoría de laboratorios de las universidades.

En la actualidad, debido al gran auge tecnológico que estamos viviendo en la sociedad, ya que estamos en constante desarrollo de productos y dispositivos electrónicos, se están llevando a cabo la creación de nuevos instrumentos que integran todos los procesos necesarios para obtener los resultados de la detección de la PCR. El objetivo es tener en un solo dispositivo todo lo necesario para ello, permitiendo así una manejabilidad más simple.

A continuación, se van a mostrar una serie de dispositivos comerciales que realizan funciones similares a la que vamos a desarrollar en nuestro proyecto.

1. Invitrogen E-Gel Power Snap Electrophoresys System



Ilustración 12: Invitrogen E-Gel Power Snap.

El dispositivo “Invitrogen E-Gel Power Snap Electrophoresys System” es un sistema todo en uno diseñado para realizar electroforesis en gel de agarosa E-Gel™ rápidas y cómodas, desde la carga de muestras de ADN hasta la captura de imagen del gel. La agarosa debe ser previamente fabricada, ya que el propio sistema no es capaz de realizarla.

El sistema de electroforesis integral “Invitrogen E-Gel Power Snap” está diseñado para realizar electroforesis en gel de agarosa E-Gel rápidas y cómodas, desde la carga de muestras de ADN hasta las imágenes de gel. Gracias a la tecnología de gel de agarosa prefabricado en seco E-Gel, podrá procesar muestras de ADN en tan solo 10 minutos y observar la separación de muestras en tiempo real. Es el único sistema de sobremesa que integra a la perfección la separación de muestras de ADN y la adquisición de imágenes de gel en un mismo flujo de trabajo. [6]

El precio de este dispositivo electrónico es de 2700 €.

2. MyGel Instaview

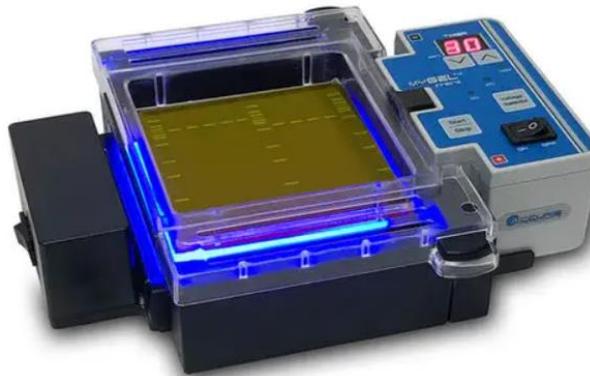


Ilustración 13: MyGel Instaview.

El sistema “myGel InstaView” viene completo con todo lo necesario para moldear, ejecutar y visualizar mini geles de electroforesis, incluyendo una fuente de alimentación integrada. El dispositivo se encarga de realizar la agarosa, por tanto, no es necesario tenerla fabricada previamente, a su vez, el depósito de gel tiene capacidad para un gel grande o pequeño. Los geles se vierten fácilmente utilizando las bandejas, los peines y el soporte de vaciado a prueba de fugas suministrados. La fuente de alimentación se conecta directamente al depósito de gel, sin necesidad de cables. Se garantiza que la conexión es correcta, siempre. La tensión de salida puede ajustarse a 35V, 50V o 100V y el tiempo de funcionamiento puede ajustarse hasta 99 minutos. Un enclavamiento magnético entre el depósito de gel y la tapa impide que la corriente circule por el sistema cuando la tapa no está bien colocada.

Una vez que el sistema “myGel InstaView” está configurado, basta con deslizar el mini transiluminador LED en su lugar bajo el tanque y en cualquier momento encenderlo para ver la ejecución en tiempo real. Un conjunto de LEDs azules emite luz azul brillante a una longitud de onda de 465 nm para una excitación óptima de las tinciones fluorescentes verdes más comunes, como SmartGlow™, SYBYR™ Green y Gel Green, sin dañar el ADN. [7]

El precio de este dispositivo electrónico es de 950 €.

3. MyGel Mini



Ilustración 14: MyGel Mini.

El sistema de electroforesis “Accuris myGel Mini” incluye todo el equipo que necesita para ponerse en marcha: depósito de gel, fuente de alimentación y dos juegos de colada. Hay que tener en cuenta que se debe fabricar previamente la agarosa, ya que el propio sistema no la hace. Dicho sistema es ideal para uso personal, pequeños laboratorios o el aula, esta combinación de caja de gel y fuente de alimentación es compacta y fácil de usar.

La caja de gel “myGel mini” se conecta directamente a la fuente de alimentación para una conexión segura en todo momento. Los parámetros seleccionables incluyen 3 voltajes preestablecidos - 35V, 50V o 100V - y un temporizador de 99 minutos. Todos se ajustan mediante el teclado de membrana. La tapa de seguridad está ventilada para ayudar a disipar el calor generado durante la electroforesis, y cuenta con un área de visualización por encima del gel. La corriente sólo circulará por el sistema cuando la tapa esté bien colocada sobre la caja de gel.

El colado es rápido y sencillo: basta con colocar la bandeja en el soporte de colado y verter. Las bandejas cuentan con una tira de contraste oscura para ayudar a visualizar los pozos mientras se cargan y con líneas que se vuelven fluorescentes bajo la luz UV y azul para seguir el progreso de la colada. [8]

El precio de este dispositivo electrónico es de 890 €.

4. MBE-150



Ilustración 15: MBE-150.

El sistema de electroforesis de “MBE-150” es reconocido como el único sistema de electroforesis en gel de agarosa en el mercado que está equipado con especificaciones muy potentes que cubren con la mayoría de las demandas en electroforesis y fuentes eléctricas. Los sistemas de electroforesis “MBE-150” usan luz azul LED para permitir la visualización inmediata de bandas de ADN/ARN durante la ejecución de electroforesis en gel de agarosa. El dispositivo hace la agarosa, por tanto, no es necesario fabricarla previamente, la unidad completa viene con bandejas de gel de tres tamaños diferentes, 15 x 7cm, 15 x 10cm, y 15 x 15cm. El sistema cuenta con certificados de conformidad RoHS y CE por razones ambientales y de seguridad. [9]

El precio de este dispositivo electrónico es de 1235 €.

5. Mupid One



Ilustración 16: Mupid One.

El sistema “Mupid One” es un equipo de electroforesis en gel de agarosa que ofrece muchas características convenientes para el análisis de geles mediante electroforesis. El sistema “Mupid One” cuenta con los siguientes componentes: una unidad de alimentación independiente, drenaje de tampón lateral, soporte de multipipetores, 7 ajustes de salida de voltaje (18, 25, 35, 50, 70, 100 y 135V) y un temporizador incorporado. El sistema Mupid One tiene la marca CE. [10]

El único inconveniente de este dispositivo es que necesita que la agarosa esté fabricada previamente, ya que es incapaz de hacerla por si mismo.

Características básicas:

- Compatible con pipetas multicanal.
- Alto rendimiento.
- Selección de voltaje.
- La limpieza puede realizarse con agua hirviendo.
- Capacidad de electroforesis prolongada.
- Componentes separados.

El precio de este dispositivo electrónico es de 622 €.

6. Rotiphorese Proffesional RunView



Ilustración 17: Rotiphorese Proffesional RunView.

Innovador sistema todo en uno para electroforesis en gel de agarosa, con fuente de alimentación e iluminador integrados. El ADN teñido se hace visible durante la ejecución mediante excitación con luz azul de 470 nm de longitud de onda y una tapa especial con filtro de emisión integrado para fluorescencia verde y roja. El ADN teñido durante la ejecución se puede observar en tiempo real sin tener efectos dañinos causados por longitudes de onda cortas.

De esta forma, todo el trabajo se puede realizar directamente en la mesa de laboratorio. El transporte del gel ya no es necesario, ya que dicho dispositivo hace la agarosa y no hay, por tanto, que fabricarla previamente. [11]

El precio de este dispositivo electrónico ronda los 2000 €.

3 ESQUEMA GENERAL

En este capítulo vamos a detallar cual es el objetivo fundamental de nuestro proyecto y las partes que caracterizan al mismo. A su vez, también mostraremos un diagrama de bloques con los distintos bloques que componen nuestro proyecto, detallando cada una de las partes de los mismos para proporcionar una visión más clara de lo que se quiere llegar a conseguir y de como funcionan cada una de sus partes.

3.1 Objetivo del Proyecto

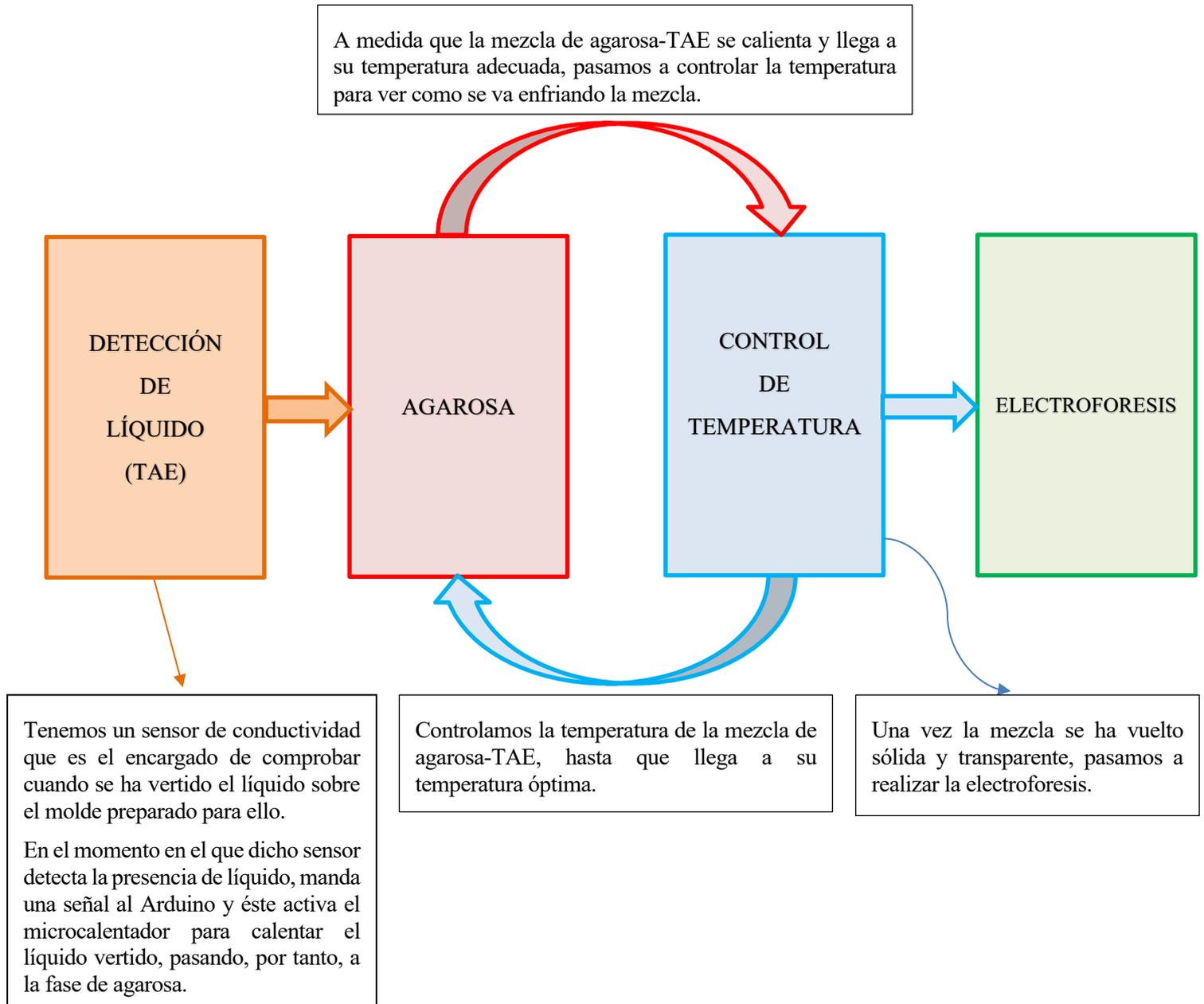
El objetivo principal de nuestro proyecto es el diseño y la fabricación de un dispositivo electrónico capaz de preparar la agarosa y de realizar la electroforesis para la detección de muestras de ADN.

A parte de cumplir el objetivo que vamos buscando, es necesario también cumplir con una serie de características básicas para hacer nuestro proyecto más competitivo, entre las cuales destacan:

- **Diseño Simple:** Se buscará realizar los diseños de los circuitos electrónicos que componen el dispositivo final lo más simple y óptimo posible.
- **Diseño compacto:** Se buscó un diseño lo más compacto posible que integre todo lo necesario para realizar la electroforesis y la detección de PCR.
- **Diseño modular:** Otras de las características que se busca es la de conseguir un dispositivo en el que sea fácil el acceso a las diferentes partes que lo componen con el objetivo de solucionar cualquier fallo que pueda aparecer.
- **Dispositivo portátil:** Se buscará conseguir fabricar un dispositivo que sea fácil de transportar y de montar en unos minutos.
- **Dispositivo autónomo:** Por último, se intentará conseguir con la ayuda de Arduino, que el dispositivo sea lo más independiente posible y que no sea necesario el empleo de un operario en diversas partes del proceso para conseguir la funcionalidad que se va buscando.

3.2 Esquema general del proyecto

Para facilitar la comprensión del objetivo principal de nuestro proyecto, se va a mostrar a continuación, un diagrama de bloques en el que se refleja cada una de las partes que componen el sistema, indicándose cuales son los elementos que intervienen en cada bloque y su funcionalidad.



3.2.1 Detección de Líquido (TAE)

La funcionalidad principal de dicho bloque es la de detectar la presencia de líquido en el molde que tenemos preparado para ello.

Para ello contaremos con la presencia de ciertos elementos fundamentales entre los cuales destacaremos:

- **Molde para gel y molde para peine:** En el primer molde se vertirá la mezcla de la agarosa con el TAE y el segundo es básicamente para formar los pocillos donde posteriormente trataremos las muestras de ADN.
- **Sensor de conductividad:** Dicho elemento sirve para detectar cuando la muestra se ha vertido sobre el molde para gel. En ese momento, envía una señal al Arduino y éste comienza el proceso de calentado de la muestra.

3.2.2 Agarosa

El bloque de agarosa está formado por un elemento esencial para su fabricación, el cual es el siguiente:

- **Microcalentador:** Dicho elemento sirve para calentar la mezcla de agarosa con el TAE, hasta conseguir que la mezcla se vea totalmente transparente, en ese momento se dejará de calentar y se dejará enfriar hasta conseguir que la mezcla se solidifique.

3.2.3 Control de Temperatura

El objetivo de dicho bloque es ir controlando la temperatura como su propio nombre indica para que la fabricación de la agarosa se haga de manera eficiente.

Dicho bloque está formado principalmente por el sensor de temperatura NTC y el Arduino con su correspondiente programación, para conseguir la funcionalidad que vamos buscando.

3.2.4 Electroforesis

El bloque de electroforesis está formado por varios elementos, entre los cuales cabe destacar:

- **Cámara de electroforesis:** Es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor de la mezcla (agarosa con TAE), donde se depositan las muestras.

3.2.5 Funcionamiento del Proyecto a desarrollar

Como podemos observar en el diagrama de bloques del apartado anterior, nuestro Proyecto está formado por cuatro grandes bloques que son: Detección de líquido (TAE), Agarosa, Control de temperatura y Electroforesis. Estos cuatro grandes bloques estarán conectados formando un solo bloque compacto.

La funcionalidad del sistema que estamos desarrollando va a ser la siguiente:

- En color rojo los procesos que se llevan a cabo de manera manual. 
- En color azul los procesos que se llevan a cabo de manera automática. 



Una vez explicado el proceso de funcionamiento que se va a llevar a cabo en nuestro proyecto, pasamos al siguiente punto que son los desarrollos y las pruebas que hemos ido llevando a cabo hasta obtener todos los elementos necesarios para ponerlo en funcionamiento de manera eficiente.

4 SENSOR DE CONDUCTIVIDAD

En este capítulo, una vez puesto en contexto de lo que trata este proyecto, pasamos a la parte de la electrónica. En él, vamos a tratar el tema del sensor de conductividad, uno de los componentes electrónicos que hemos tenido que diseñar y posteriormente fabricar y caracterizar para obtener una de las funciones de las que queremos dotar a nuestro dispositivo.

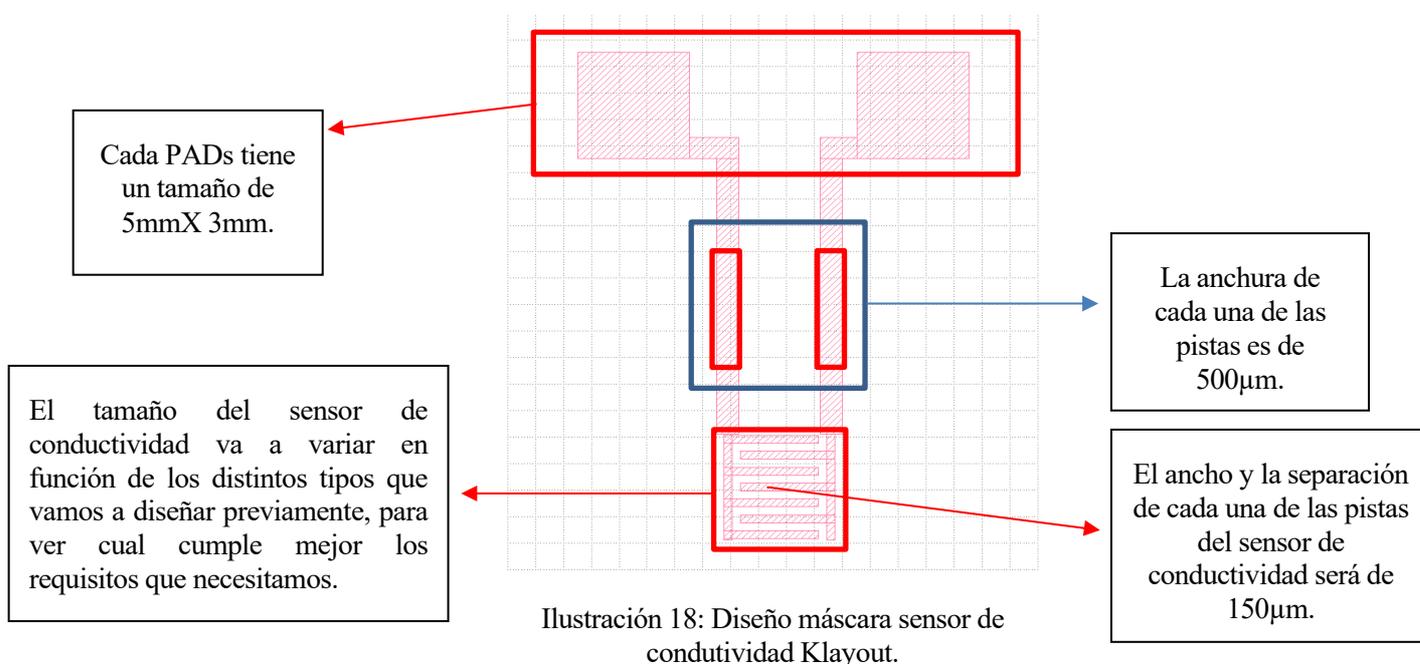
4.1 Fabricación del sensor de conductividad

La idea principal es hacer el sensor lo más pequeño posible y que a su vez tenga la sensibilidad suficiente como para detectar cuando la cavidad está llena de líquido.

Gracias al programa “Klayout” hemos creado las máscaras del sensor de conductividad que vamos a incluir en nuestro proyecto. [12]

La estructura que va a tener el sensor es una estructura interdigitada y a su vez, tiene unos PADS asociados para poder soldarle un par de cables que nos servirán para realizar las pruebas posteriormente. [13]

A continuación, vamos a mostrar una imagen de la estructura que va a presentar nuestro sensor de conductividad:



Para el diseño de las máscaras hemos realizado 5 prototipos (cada prototipo tenía 5 modelos iguales por si en la fabricación alguno salía defectuoso), de mayor a menor tamaño para comprobar si a medida que hacíamos las pruebas tenían la sensibilidad suficiente como para poder optimizar el tamaño lo máximo posible.

Las 5 máscaras realizadas, tienen los siguientes tamaños:

- 1cmX1cm
- 5mmX5mm
- 4mmX4mm
- 2mmX2mm
- 1mmX1mm

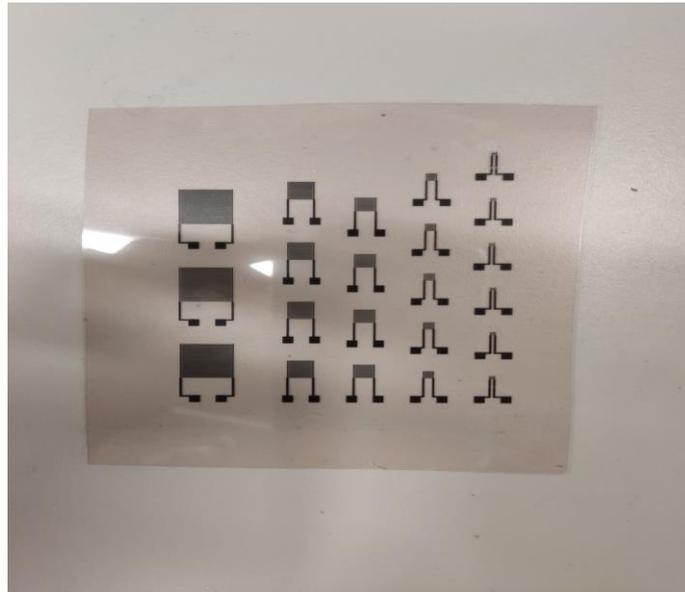


Ilustración 19: Máscaras de los diversos sensores de conductividad.

Una vez diseñadas según las especificaciones recomendadas, se fabricaron, junto con la cavidad que va a recubrir cada uno de los sensores para hacer las pruebas vertiendo el líquido.

Una vez en el laboratorio, con mínimo un prototipo de cada tamaño de sensor realizado, soldamos un cable a cada uno de los PADS de los sensores creados, para realizar las pruebas pertinentes.

Comenzamos realizando las pruebas de mayor a menor, ya que, si el mayor no tenía la sensibilidad suficiente como para detectar el líquido, no servirían los demás, al tener un tamaño mucho más pequeño.

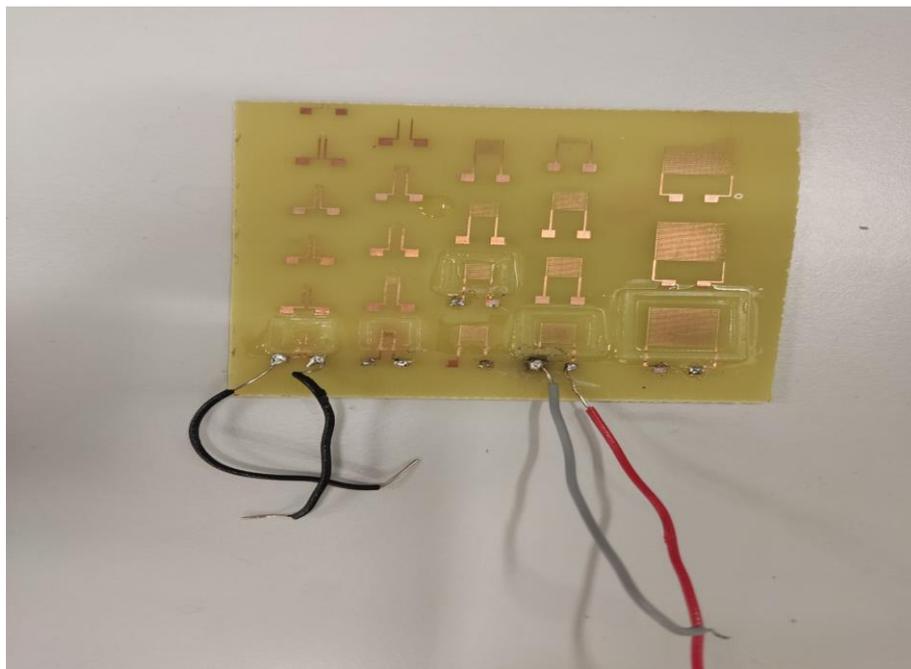


Ilustración 20: Placa de los sensores de conductividad.

4.2 Procedimiento a seguir para la toma de muestras

Lo primero que hacemos es comprobar que el circuito está abierto, cogemos para ello un multímetro, colocamos los cocodrilos tanto negativo como positivo a los cables que hemos soldado en los PADS del sensor correspondiente y comprobamos que el mensaje que sale por la pantalla del multímetro es OL (Open Loop) que viene a decir lo mismo que circuito abierto (lazo abierto traducción exacta), eso quiere decir que inicialmente el circuito se encuentra abierto y no está conduciendo, perfecto, justo lo que debía mostrarnos.

Seguidamente, lo que hacemos es comprobar la conductividad (la corriente), para ello lo que hacemos es cambiar los cocodrilos que teníamos inicialmente en el multímetro y poner unas puntas de prueba con negativo y positivo (al igual que los cocodrilos).

Colocaremos posteriormente una punta en un extremo de uno de los cables (que previamente ya dijimos que estaban soldados a los PADS del sensor correspondiente) y con la otra iremos tocando la fila del sensor correspondiente asociada a dicho PADS para ver si existe conductividad, si la hay, el multímetro empezará a pitar cada vez que toquemos en esa fila. En nuestro caso, lo hace correctamente para todos los sensores, señal de que los sensores están bien diseñados y fabricados.

Una vez probado en una fila, pasaremos a comprobar lo mismo en la otra fila del sensor, siguiendo el mismo procedimiento. En nuestro caso, lo hace correctamente también en la otra fila de cada uno de los sensores, señal de que los sensores están bien diseñados y fabricados.

Pasamos seguidamente a la caracterización de la resistencia necesaria a emplear en el circuito que nosotros vamos a diseñar posteriormente, para ver si el sensor es capaz de detectar cuando tiene líquido en su superficie.

Para ello lo primero que haremos será colocar el multímetro de nuevo con los bananas cocodrilo que empleamos anteriormente, cada uno conectado a un cable de los que soldamos a cada uno de los PADS del sensor correspondiente y vertimos el TAE, que es el líquido que vamos a emplear en el proceso de pruebas, ya que dicho líquido tiene iones que permiten la conductividad.

Esto lo que hace es que te proporciona un valor determinado de resistencia, que aparece medido con el multímetro, ese determinado valor de resistencia nos delimitará el valor que nosotros tenemos que poner de resistencia en el circuito posteriormente, generalmente el valor de resistencia que vamos a emplear es de $22k\Omega$, esto es así, debido a que este valor experimental es igual al medido para tener unos 2.5V a la salida de un futuro divisor de tensión.

Excepto para el sensor de 1mmX1mm que necesitará un valor de resistencia de aproximadamente unos $6M\Omega$ y que como veremos más adelante no vamos a poder emplear debido a que su sensibilidad es bastante deficiente y es incapaz de detectar cuando se vierte líquido sobre él.

Tabla 3: Valores de resistencia para cada sensor.

DIMENSIONES DEL SENSOR DE CONDUCTIVIDAD	RESISTENCIA NECESARIA
1cmX1cm	$22k\Omega$
5mmX5mm	$22k\Omega$
4mmX4mm	$22k\Omega$
2mmX2mm	$22k\Omega$
1mmX1mm	$6M\Omega$

A modo de esquemático, se va a mostrar a continuación cual va a ser el montaje definitivo que se colocará en la placa PCB que vamos a diseñar.

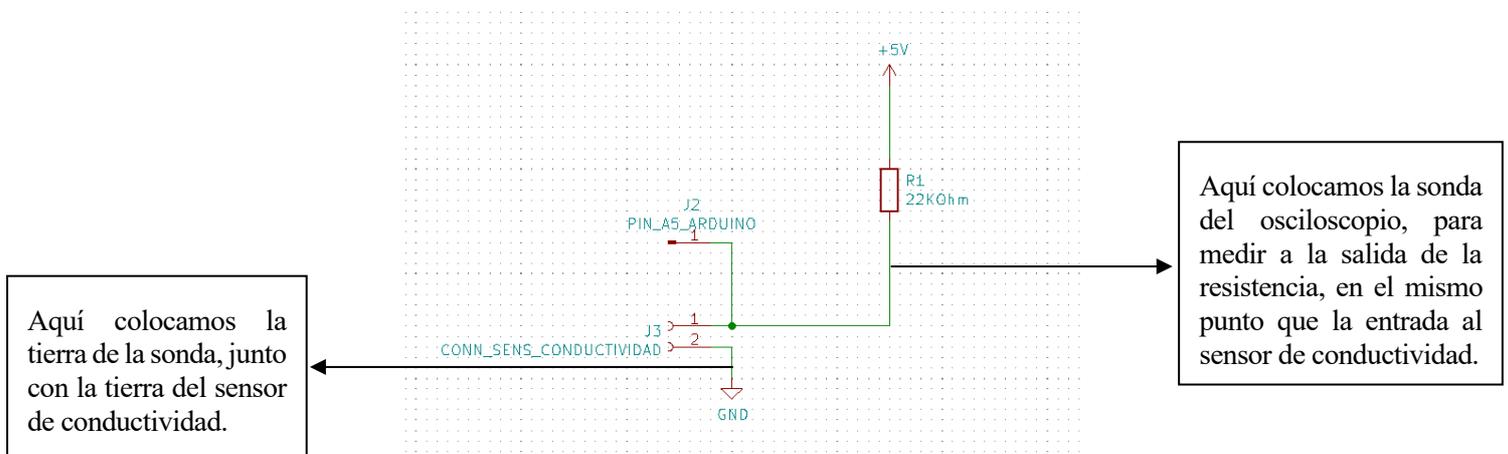
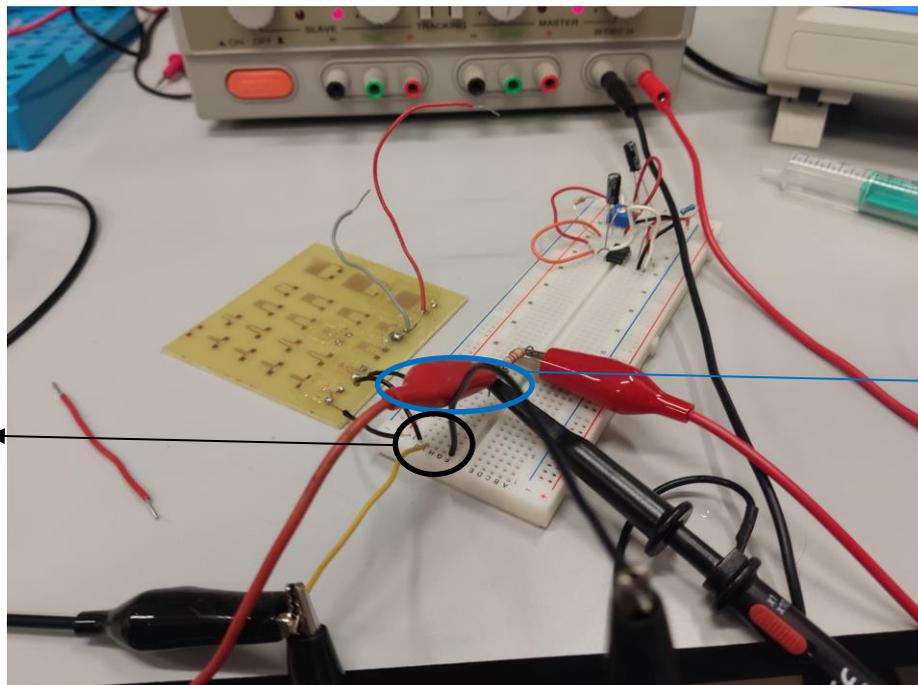


Ilustración 21: Montaje definitivo en PCB, para el sensor de conductividad.

Una vez hallado el valor de resistencia que necesitamos, cogemos la resistencia de $22k\Omega$ y la montamos en una placa de prueba, ponemos en serie con dicha resistencia uno de los cables del sensor de conductividad que vayamos a probar y el otro lo ponemos a tierra.

Utilizaremos la sonda del osciloscopio para medir a la salida de la resistencia, justamente en el punto donde se encuentra la entrada del sensor de conductividad y la tierra de la sonda que va junto con la tierra del sensor de conductividad, tal y como se ha indicado en la ilustración previa (Ilustración 21).

Una vez colocado todo el montaje requerido, pulsamos el botón de “Single Seq”, utilizamos los cursores para marcar el comienzo de la señal y que una vez se llegue al punto donde se cruzan el cursor vertical con el horizontal, se empezará a dibujar la señal que percibe la sonda.



La tierra de la sonda va conectada a la tierra del sensor de conductividad.

Salida de la resistencia conectada a la entrada del sensor de conductividad.

Ilustración 22: Montaje real, basado en el esquemático, llevado a cabo para realizar las pruebas.

Pues bien, hemos ido tomando diversas pruebas sobre cada uno de los sensores fabricados para comprobar que su funcionamiento es óptimo y que no es fruto de una simple casualidad.

Para todas las pruebas realizadas sobre los distintos sensores, el procedimiento a seguir ha sido el mismo:

1. Pulsamos el botón de “Single Seq”.
2. Esperamos que el osciloscopio nos muestre un mensaje que diga “Ready”, señal de que está preparado para recibir una señal determinada.
3. Vertimos con el uso de una jeringa el líquido TAE sobre el sensor de conductividad con el que estemos trabajando en ese momento.
4. Observamos la respuesta del osciloscopio a la salida.
5. Si el osciloscopio ha detectado cuando se ha vertido el líquido, mostrará una señal hacia abajo. Inicialmente se encontraba sin conducir y cuando se vertió el líquido, la señal se va hacia abajo como muestra de que ha percibido algo (en nuestro caso el líquido sobre el sensor que estemos comprobando).

4.3 Resultados de las pruebas para los distintos sensores de conductividad

4.3.1 Resultados sensor tamaño 1cmX1cm

Montaje empleado para la comprobación del sensor de conductividad:

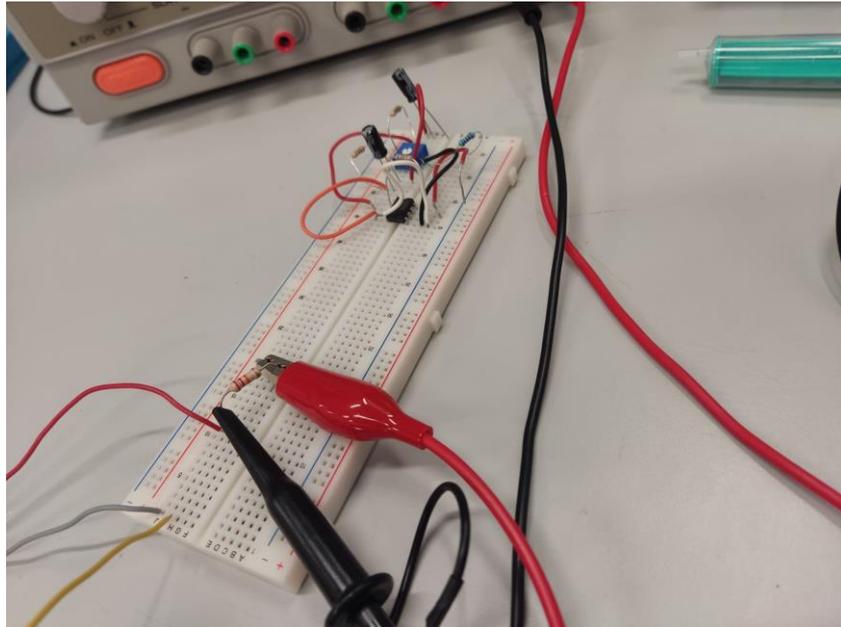


Ilustración 23: Montaje sensor 1cmX1cm.

Resultado obtenido para el sensor de conductividad:

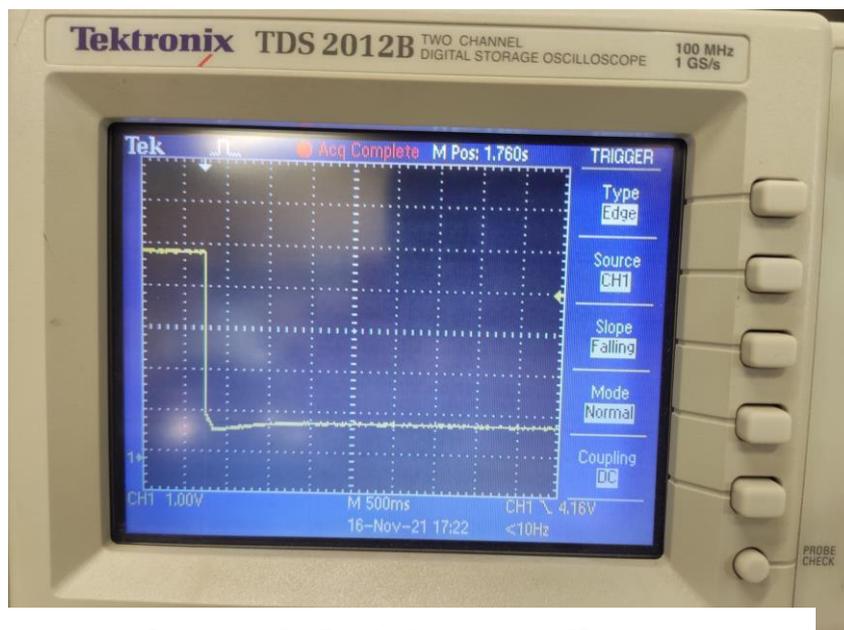


Ilustración 24: Resultado sensor 1cmX1cm

4.3.2 Resultados sensor tamaño 5mmX5mm

Montaje empleado para la comprobación del sensor de conductividad:

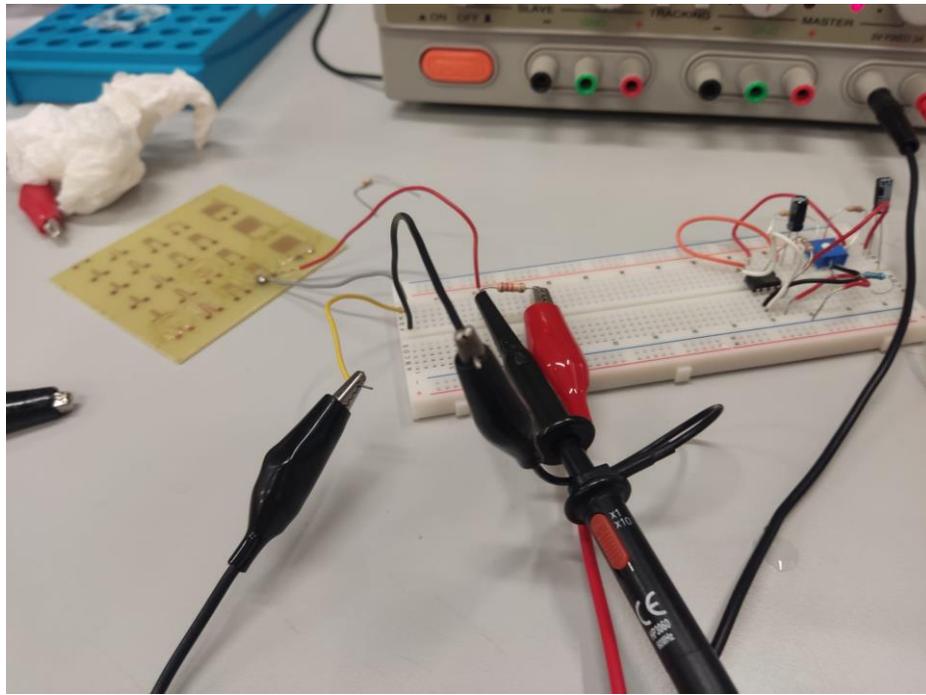


Ilustración 25: Montaje sensor 5mmX5mm

Resultado obtenido para el sensor de conductividad:

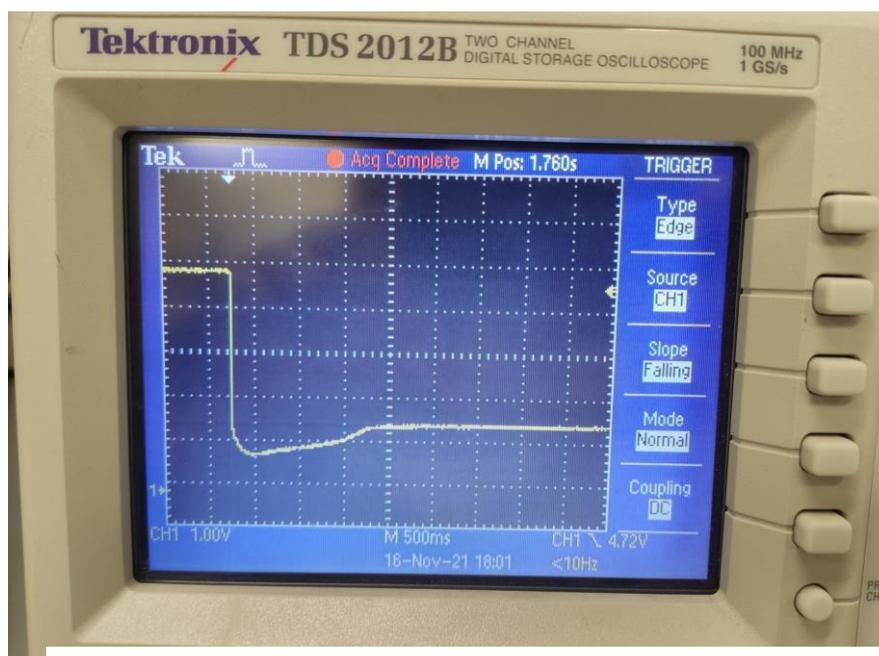


Ilustración 26: Resultado sensor 5mmX5mm

4.3.3 Resultados sensor tamaño 4mmX4mm

Montaje empleado para la comprobación del sensor de conductividad:

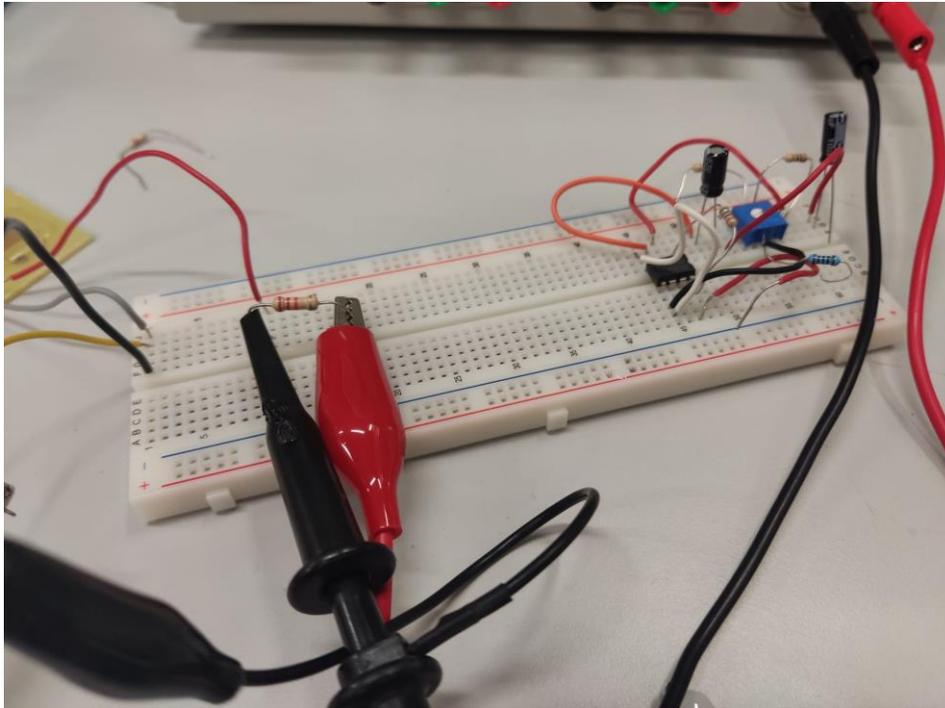


Ilustración 27: Montaje sensor 4mmX4mm

Resultado obtenido para el sensor de conductividad:

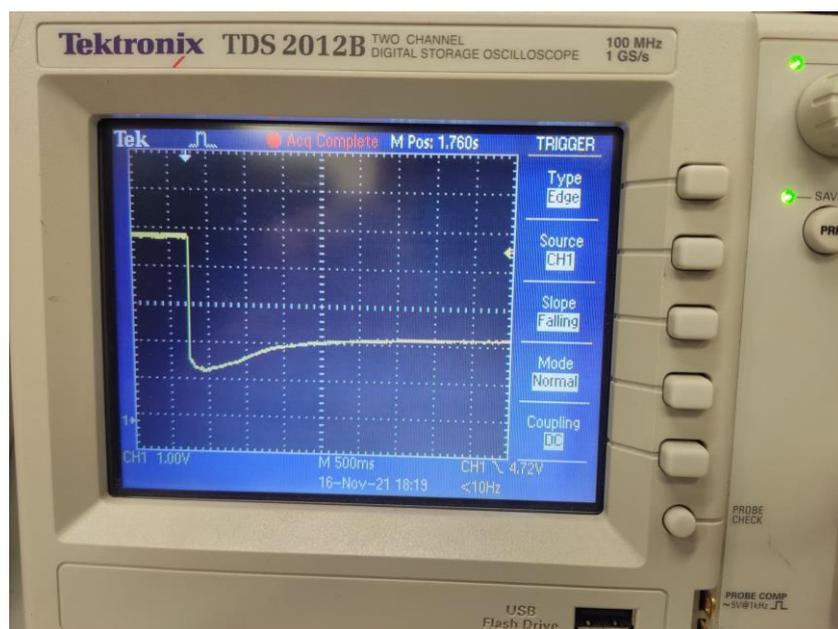


Ilustración 28: Resultado sensor 4mmX4mm

4.3.4 Resultados sensor tamaño 2mmX2mm

Montaje empleado para la comprobación del sensor de conductividad:

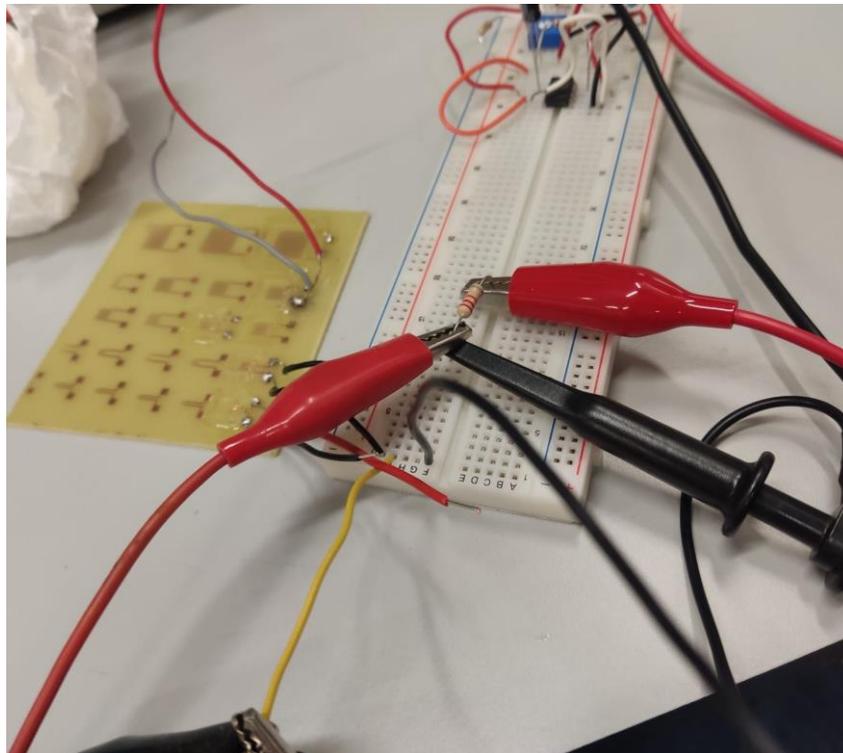


Ilustración 29: Montaje sensor 2mmX2mm

Resultado obtenido para el sensor de conductividad:

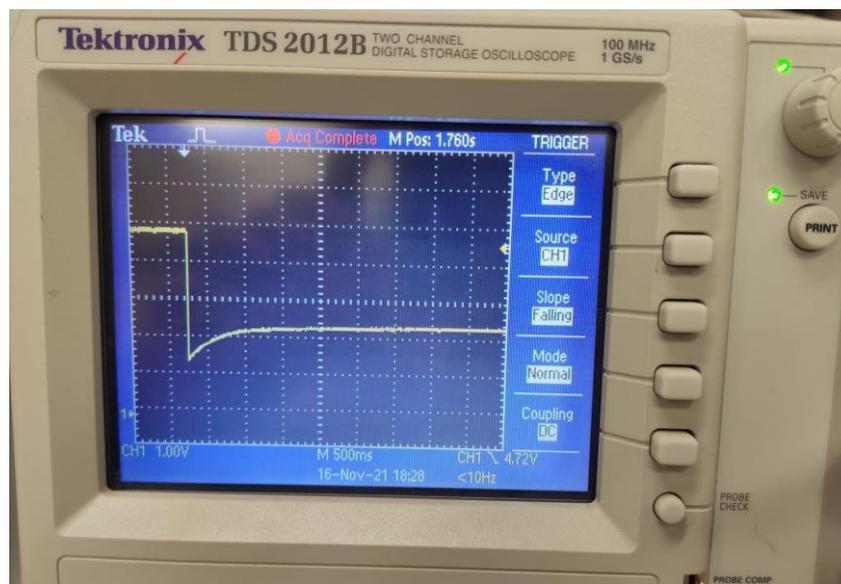


Ilustración 30: Resultado sensor 2mmX2mm

4.3.5 Resultados sensor tamaño 1mmX1mm

No se muestran resultados del sensor de 1mmX1mm porque no era lo suficientemente sensible como para detectar cuando recibía el líquido TAE en su superficie. Por tanto, no se pudieron tomar muestras y fue descartado.

Como conclusión sacamos que los sensores menores de 2mmX2mm no son capaces de detectar cuando tienen el líquido en su superficie.

4.4 Solución final

Como queremos que el sensor sea lo más pequeño posible y a su vez lo más sensible capaz de detectar el líquido TAE en su superficie, nos vamos a quedar con el sensor de 2mmX2mm y será el que posteriormente coloquemos en nuestro proyecto.

A continuación, se va a mostrar una imagen de dicho sensor fabricado en PCB:

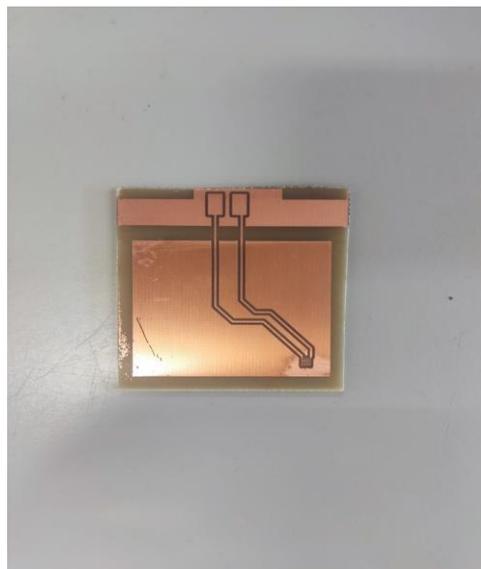
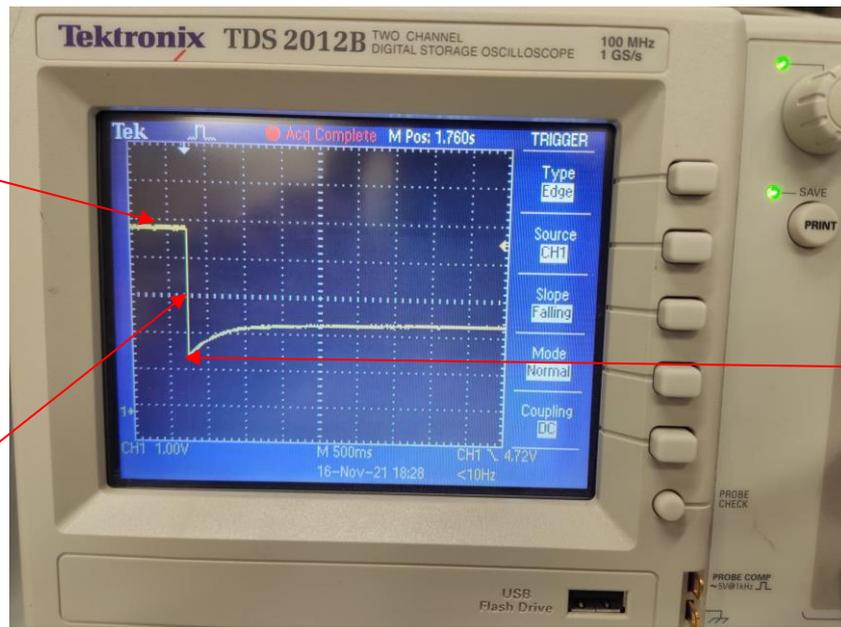


Ilustración 31: Sensor de conductividad fabricado en PCB.

Seguidamente, volvemos a mostrar el resultado del sensor conductividad para el sensor de 2mmX2mm, para indicar una serie de aspectos fundamentales sobre él que tienen relevancia y que a su vez nos permitirán ver de una forma más gráfica cual es su funcionamiento.

Cuando no hay líquido vertido sobre el molde colocado en la superficie del sensor de conductividad la tensión se mantiene a 5V.

A partir de 3.5V que es el punto de tensión que hemos elegido para que comience a detectar el sensor, es cuando se empieza a detectar que hay líquido en el molde colocado en la superficie del sensor de conductividad.



Cuando se ha detectado todo el líquido vertido es cuando se llega abajo en la curva.

Ilustración 32: Resultado sensor 2mmX2mm.

Básicamente, la idea principal es que se ha programado el código de Arduino de tal manera que a partir de una tensión de 3.5V éste ya sabe que hay líquido en el molde y que, por tanto, tiene que activar el funcionamiento del microcalentador.

NOTA:

Dependiendo de cuantas gotas caen y de la dinámica de vertido, la curva presenta una mayor suavidad o una mayor abruptez.

5 SENSOR DE TEMPERATURA Y CALENTADOR

En este capítulo, vamos a detallar como se han diseñado y fabricado dos de los elementos más importantes en el desarrollo de nuestro proyecto, como son el sensor de temperatura y el calentador. Ambos dan una funcionalidad esencial para la fabricación del gel de agarosa y como en cierto modo ambos van ligados, estarán colocados en la misma PCB.

5.1 Empleo de un NTC como sensor de temperatura

En nuestro proyecto es muy importante controlar la temperatura de manera eficiente, ya que un mal control de la misma puede provocar que el gel de agarosa que se obtenga como resultado final no sea válido, bien porque la muestra sea sometida a un exceso de temperatura, o bien porque la temperatura a la que ha sido sometida sea demasiado baja como para conseguir que la muestra pase a estar en un estado homogéneo y transparente.

En primer lugar, si sometemos la muestra a un exceso de temperatura, podemos provocar que la mezcla disminuya en su cantidad y con ello no conseguir un gel adecuado para el proceso de electroforesis. De igual modo, si la temperatura a la que se calienta la propia mezcla es una temperatura inferior a lo que se requiere, también tendremos un problema, ya que en tal caso el gel de agarosa se quedará en estado líquido, no permitiendo que se pueda llevar a cabo con él el proceso de electroforesis.

Una vez comentadas las principales causas que pueden ser provocadas por un mal control de temperatura, pasamos a plantear la solución para que esto no ocurra.

Para empezar, necesitamos controlar la temperatura a la que se está sometiendo la mezcla de agarosa y TAE, para ello necesitamos un sensor que lo vaya indicando, y el mejor para ello por su reducido tamaño y porque no supone un coste desorbitado es el empleo de un termistor NTC.

Básicamente un termistor NTC es un sensor de temperatura por resistencia, que varía su valor con la temperatura con un coeficiente negativo. La forma de la curva característica de esta resistencia puede verse en la imagen que vamos a mostrar a continuación. Se ve que el valor de ésta varía de forma negativa con un aumento de temperatura. [14]

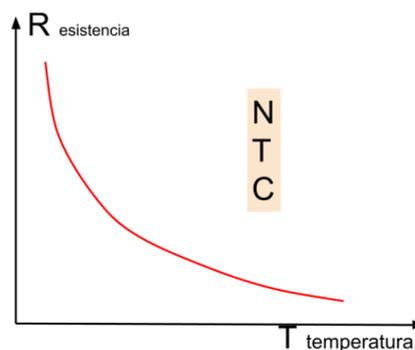


Ilustración 33: Curva característica NTC.

Vamos a indicar también que nuestro NTC se encuentra en la misma placa que el microcalentador (del cual hablaremos posteriormente), ya que el objetivo es que ambos estén lo más próximos posibles, para que el NTC tenga los valores de temperatura de la mezcla lo más realista posible.

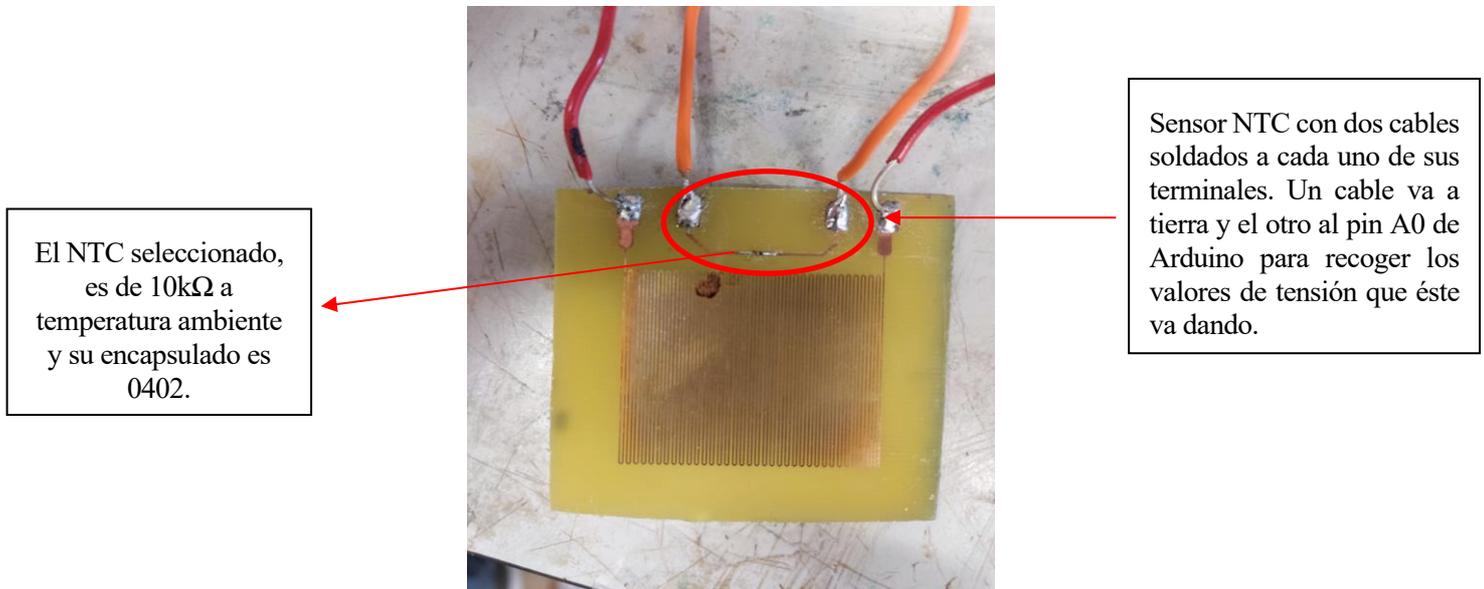


Ilustración 34: NTC en la misma placa que el microcalentador.

Como casi todos los sensores que usamos en electrónica, los termistores NTC también disponen de un modelo matemático que nos ayuda a relacionar la resistencia entre sus terminales y la temperatura a la que se encuentra.

Para ello en la programación de Arduino, aplicamos dicho modelo matemático, y obtenemos los valores de temperatura que vamos buscando.

Finalmente, vamos a comentar que el sensor de temperatura NTC en el montaje final va asociado a dos resistencias que a su vez van en serie entre ellas para darnos un valor de resistencia total de 1330Ω .

El valor de 1330Ω de la resistencia en serie con la NTC es el usado por defecto en el grupo de investigación en el que se encuadra dicho proyecto, porque optimiza la medida de la temperatura, permitiendo con ello proporcionarnos un mayor rango.

Ante la dificultad que encontramos para encontrar una resistencia de ese valor y su precio elevado, decidimos coger dos resistencias de valores más comunes y unir las en serie entre ellas para conseguir dicho valor.

Hay que tener en cuenta también que ambas resistencias van unidas con el pin de 5V proveniente de Arduino.

5.2 Empleo de un microcalentador

Llegados a este punto, vamos a detallar inicialmente como se fabricó el microcalentador y su principal funcionalidad dentro del proyecto que estamos llevando a cabo. Cabe resaltar también la relación directa que existe entre el microcalentador y el sensor de conductividad del que hablamos en el capítulo anterior.

5.2.1 Fabricación del microcalentador

La idea principal es hacer el calentador lo más pequeño posible y que a su vez presente la resistencia suficiente como para llegar a las temperaturas necesarias que va a requerir la mezcla para la fabricación eficiente del gel de agarosa.

Gracias al programa “KICAD” hemos creado la máscara del microcalentador que vamos a emplear en nuestro proyecto. [15]

La estructura que va a tener el microcalentador es una estructura a modo de serpentin y a su vez, tiene unos PADS asociados para poder soldarle un par de cables que nos servirán para conectarlo finalmente al circuito completo.

A continuación, vamos a mostrar una serie de imágenes en las que se verá la máscara que se diseñó para la fabricación del microcalentador y la placa que se obtuvo como resultado.

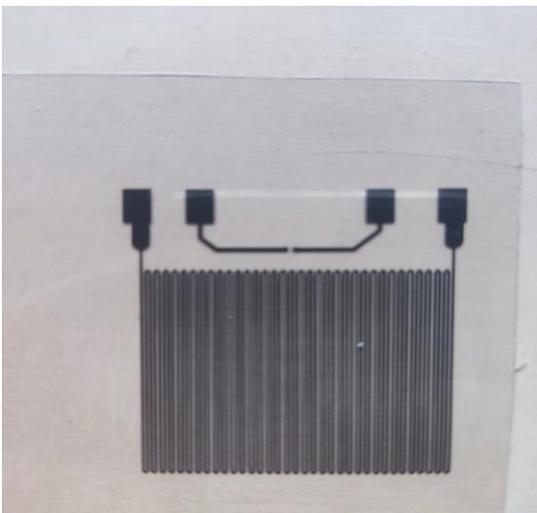


Ilustración 36: Máscara microcalentador.

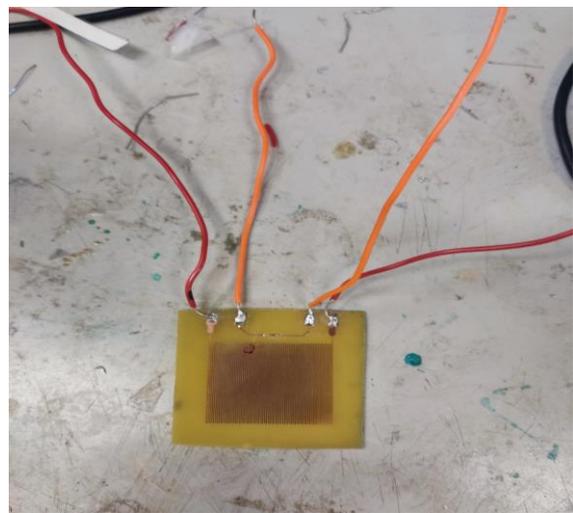


Ilustración 35: Microcalentador fabricado.

A continuación, después de visualizar las imágenes previas, vamos a detallar el tamaño del microcalentador en sí, a la vez que el tamaño de cada una de las pistas y los PADS que forman dicho elemento.

El tamaño del microcalentador concreto es de 3.5cmX3.5cm, las pistas que forman dicho elemento tienen un grosor de 250 μ m y una separación entre pistas del mismo valor, es decir, de 250 μ m y el tamaño de los PADS es de 5mmX3mm.

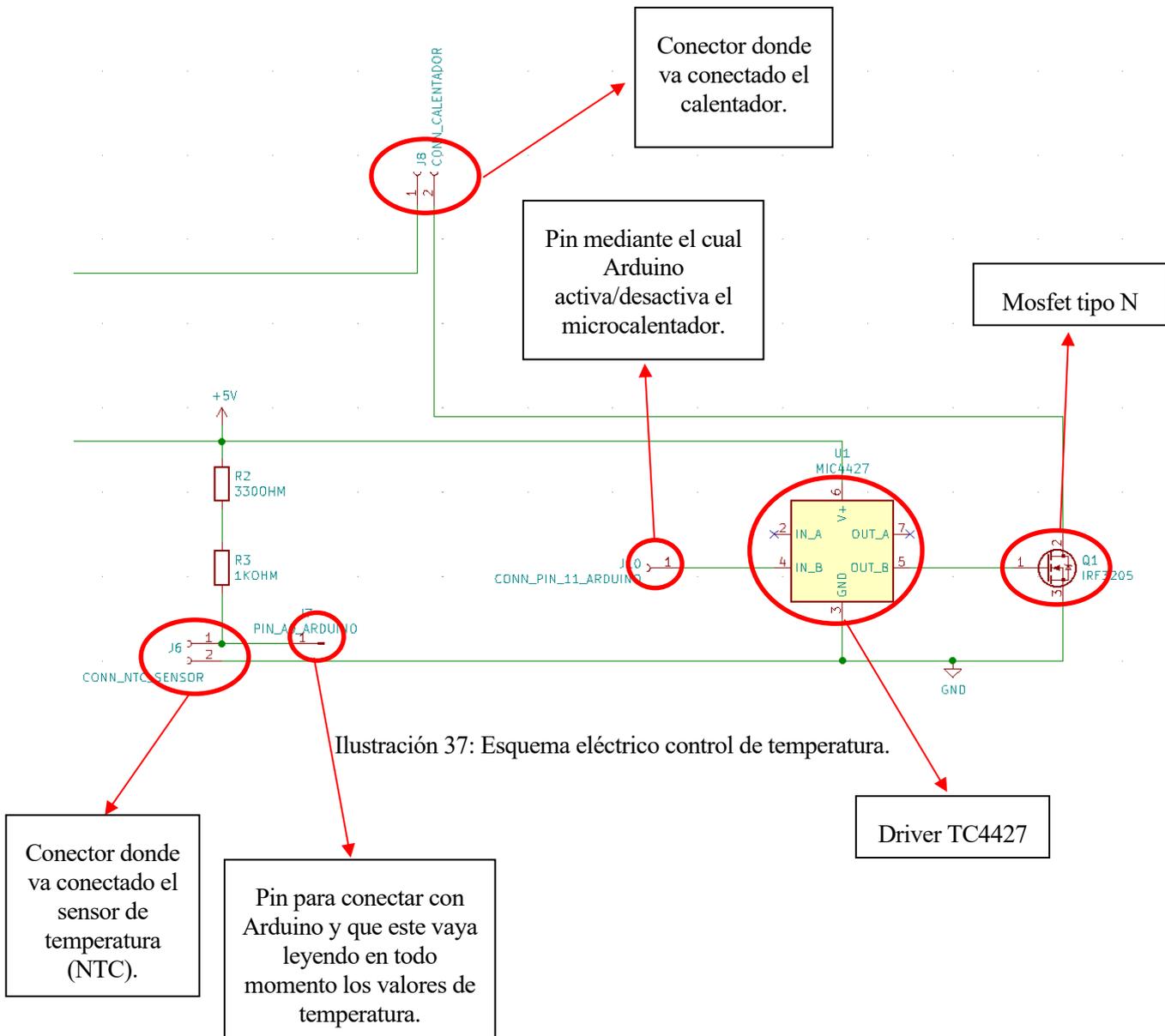
Vamos a resaltar también que el valor resistivo del mismo es de 19.5 Ω y las corrientes que pasan por él tienen un valor máximo de 1.02A.

Finalmente, hay que destacar la relación directa que existe entre el microcalentador y el sensor de conductividad como resaltamos al principio de este apartado. Básicamente, para comenzar a calentar la mezcla es necesario que el microcalentador esté activado, por tanto, como comentamos en el capítulo anterior del sensor de conductividad, cuando éste detecta la presencia de líquido en su superficie, envía una señal al Arduino, para que éste ponga en funcionamiento el microcalentador, siendo dicha señal el comienzo por así decirlo del control de temperatura, ya que hay que regular la temperatura máxima de calentado del microcalentador y su apagado cuando se haya alcanzado el tiempo máximo de calentado de la mezcla.

6 CONTROL DE TEMPERATURA

En este capítulo, vamos a detallar como se ha realizado el control de temperatura, el cual tiene una gran importancia a la hora de conseguir la fabricación del gel de agarosa. Es importante detallar de manera precisa los tiempos de calentado y enfriado de la muestra para conseguir que ésta se realice de manera correcta.

6.1 Circuito eléctrico del control de temperatura



Observando dicho esquema, vamos a entrar en detalle de dos componentes sobre los que no hemos hablado previamente sobre su funcionalidad, como son el driver TC4427 y el transistor Mosfet tipo N.

6.1.1 Driver TC4427

El driver controlador de puerta que hemos empleado en el circuito es el TC4427, el cual tendrá dos funcionalidades principales.

En primer lugar, una de sus funcionalidades será cargar y descargar rápidamente la capacidad de puerta del transistor mosfet y que éste tenga una rápida apertura y cierre.

En segundo lugar, dicho driver nos servirá para proteger el microcontrolador, en nuestro caso el Arduino UNO, por si hubiera alguna corriente de descarga de la puerta hacia atrás.

En otros casos, que no es el que presentamos en nuestro proyecto, se usa porque la tensión necesaria de puerta es mayor que la que proporciona Arduino. En ese caso, se alimenta el driver a la tensión necesaria (mayor que la de Arduino) y cuando el propio Arduino manda 5V, el driver manda su alimentación a la puerta del mosfet. En nuestro caso como hemos comentado anteriormente no va a ser necesario porque el driver está alimentado a 5V, que es la misma tensión que proporciona Arduino y la tensión V_{th} del transistor mosfet está por debajo de dicho valor.

6.1.2 Transistor mosfet tipo N

Como se puede apreciar en el esquemático del circuito, tenemos un transistor mosfet tipo N a la salida del driver controlador de puerta. Dicho mosfet, se utilizará como interruptor, de tal forma que el Arduino manda una señal PWM para que nuestro interruptor esté un determinado periodo abierto y otro cerrado.

Con estos tiempos se consigue controlar la corriente, de forma que si el interruptor estuviera siempre cerrado, la corriente que dejaría pasar sería máxima. Todo esto regido por la siguiente fórmula:

$$I = \frac{V_{fuente}}{R_{calentador}}$$

Y si estuviera siempre abierto, la corriente que dejaría pasar sería cero.

Todos estos valores y el resto de valores intermedios lo ajusta el PID por sí mismo a la salida del pin 11 de Arduino, con el duty cycle de la señal PWM, de manera que si el duty cycle es del 50%, se tendrá la mitad de corriente máxima.

6.2 Esquema general del control de temperatura



6.3 Explicación detallada de cada una de las partes del control de temperatura

En este apartado vamos a hablar detalladamente de cada una de las partes que intervienen en el control de temperatura y que han sido referenciadas en el esquema del apartado anterior.

6.3.1 NTC como sensor de temperatura

Como hemos visto en el capítulo anterior, el empleo de una NTC se va a llevar a cabo para medir la temperatura a la que se encuentra la mezcla en todo momento y así conseguir con ese control tan exhaustivo de la misma un gel de agarosa óptimo para llevar a cabo la migración de ADN de manera eficiente.

6.3.2 Encendido del microcalentador

Para llevar a cabo el control de temperatura de la mezcla, es necesario calentarla, para ello debemos encender el calentador y calentar la mezcla de agarosa más TAE, y como bien detallamos en capítulos previos, el Arduino será el que active dicho elemento una vez reciba la confirmación por parte del sensor de conductividad de que la mezcla está depositada en la cavidad.

6.3.3 Temperatura máxima de calentado de la mezcla

En este apartado, vamos a detallar la temperatura máxima de calentado que necesita la mezcla para conseguir la transparencia completa.

Después de la realización de numerosas pruebas, se ha llegado a la conclusión de que la temperatura máxima de calentado de la mezcla debe rondar los 100°C-102°C, por el simple hecho de que cuando el microcalentador es capaz de llegar a dichas temperaturas, la mezcla comienza a burbujear de manera más rápida, permitiendo con ello que la transparencia sea palpable a simple vista.

También cabe resaltar que probamos con temperaturas máximas más bajas y el resultado no era el esperado, porque se requería mucho tiempo para que comenzaran a aparecer las primeras burbujas y eso provocaba una sobreexposición de calentado que como consecuencia tenía que la mezcla fuese perdiendo líquido y el resultado final del gel de agarosa no era el esperado por su baja cantidad.

6.3.4 Empleo de un controlador PID

Este apartado, nos sirve como continuación del anterior, ya que hacemos uso de un controlador PID programado en Arduino, para que la temperatura de calentado del microcalentador no siga aumentando y se mantenga estabilizada en valores próximos a los 100°C.

Es importante también comentar, que el controlador programado realiza el control de manera muy eficiente, ya que se queda clavado en el valor deseado de 100°C de manera muy rápida.

A continuación, se muestran una serie de imágenes del control realizado en la que se puede apreciar el buen funcionamiento del controlador.



Ilustración 38: Temperatura de la mezcla intentando alcanzar la temperatura de referencia establecida en 100°.

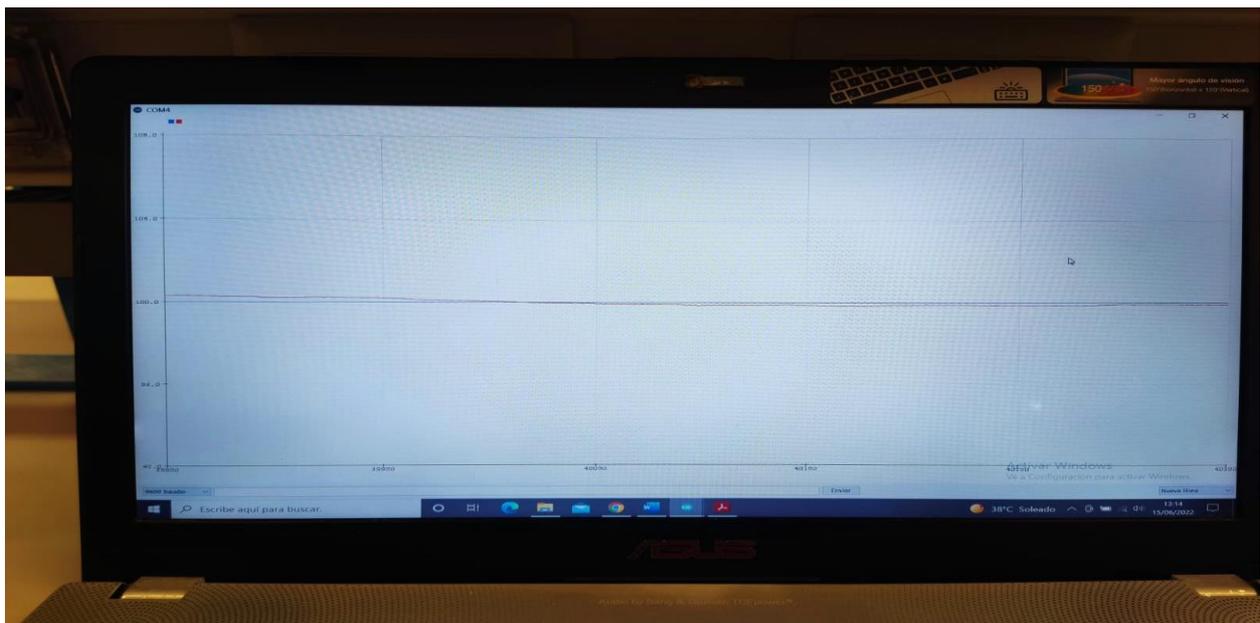


Ilustración 39: Temperatura de la mezcla controlada en 100° por el controlador PID.

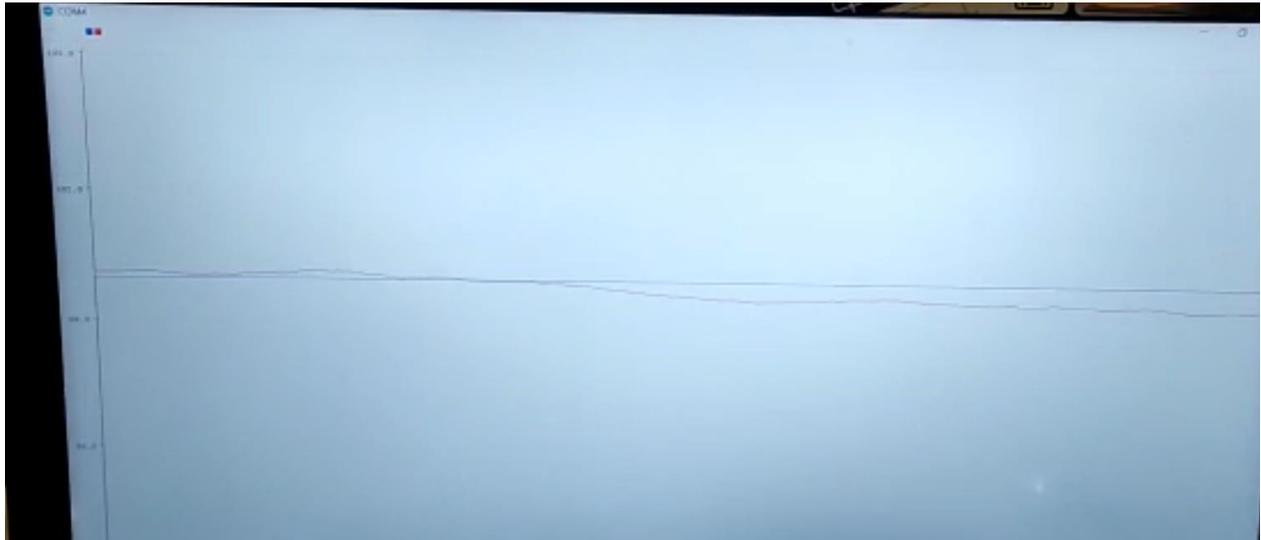


Ilustración 40: Temperatura de la mezcla inferior a los 100°, porque ha terminado el periodo de calentado y la muestra se comienza a enfriar.

6.3.5 Definición de los intervalos de funcionamiento del microcalentador

En este apartado, vamos a centrarnos en detallar cuando el microcalentador está activado y cuando cesa su funcionamiento, para permitir con ello que la mezcla se enfríe y pase a un estado sólido.

En primer lugar, cuando el sensor de conductividad manda una señal a Arduino, éste inmediatamente comprende que se ha detectado líquido y activa el funcionamiento del microcalentador.

El microcalentador, se encontrará activo aproximadamente unos 10 minutos. En los primeros 5 minutos, la mezcla se va a ir calentando pero sin alcanzar temperaturas desorbitadas, ya que se quedará aproximadamente en unos 62°C-65°C, que es el momento en el que empiezan a aparecer las primeras burbujas en la mezcla.

En los 5 minutos finales, el microcalentador llega a una temperatura máxima aproximadamente de unos 102°C, los cuales serán controlados por el PID. Consiguiendo dicho controlador posteriormente mantener constante la temperatura en torno a los 100°C, permitiéndonos con ello que las burbujas sean cada vez más abundantes y que la mezcla se convierta totalmente en transparente.

Una vez finalizado ese intervalo de 10 minutos destinados al calentado de la mezcla, el Arduino desconecta el funcionamiento del microcalentador y deja que la muestra se vaya enfriando hasta obtener un estado sólido, lo cual nos permitirá posteriormente retirar el molde con los peines y podremos apreciar los pocillos en el gel de agarosa solidificado, donde seguidamente vertiremos las distintas muestras de ADN y finalmente, pasaríamos a realizar la electroforesis.

6.3.6 Señalización de la temperatura alcanzada mediante LEDS

En este apartado, vamos a entrar a comentar que empleamos una serie de LEDS para avisar a la persona encargada de la realización del proceso cuando puede retirar el gel de agarosa del molde sin tener problemas.

Básicamente, porque la temperatura de calentado del microcalentador va a ser muy elevada para conseguir la fabricación eficiente del gel de agarosa que queremos y, por tanto, queremos evitar cualquier tipo de accidente por quemaduras.

En primer lugar, se encenderá un LED rojo cuando la temperatura de la mezcla sea superior a los 98°C, para indicar al igual que hace un semáforo que hay que estar parado, no se puede tocar la mezcla ni el microcalentador en ese momento por motivos evidentes, ya que pueden llegar a provocar lesiones por quemaduras.

En segundo lugar, cuando ya han transcurrido los diez minutos de calentado con el microcalentador activado, apagamos el mismo y pasamos a dejar enfriar la mezcla realizada.

Cuando la temperatura se encuentre comprendida entre los 35°C y los 98°C, se encenderá un LED amarillo, indicando que hay que tener precaución, ya que el microcalentador está apagado pero la mezcla aún esta demasiado caliente como para intentar retirarla.

Y finalmente, cuando la temperatura se encuentre entre valores menores de 35°C, se encenderá un LED verde, que nos advertirá de que ya podemos retirar la muestra si así lo deseamos sin ningún peligro aparente y además el gel ya se habrá solidificado.

A modo resumen, el funcionamiento de los LEDS acorde a la temperatura será el siguiente:

- **LED ROJO:** Se enciende cuando la temperatura es igual o superior a los 98°C.
- **LED AMARILLO:** Se enciende cuando la temperatura se encuentra comprendida entre los 98°C y los 35°C. Después de los 10 minutos de calentado.
- **LED VERDE:** Se enciende cuando la temperatura es menor de 35°C. Después de los 10 minutos de calentado.

A continuación, se va a mostrar el esquemático empleado para los LEDS:

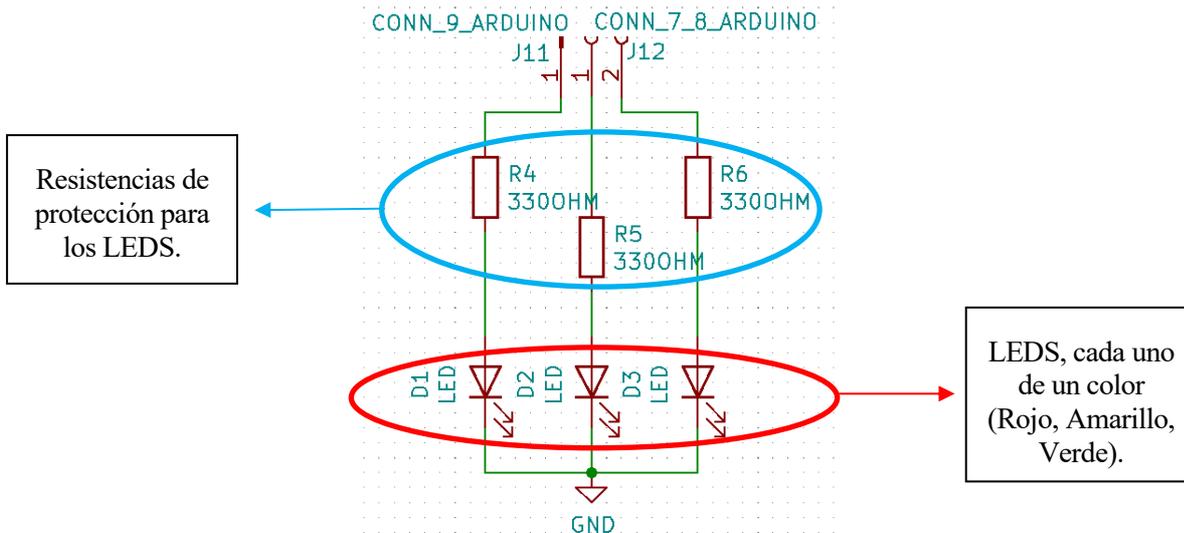


Ilustración 41: Esquema eléctrico LEDs.

Se pueden apreciar en el esquemático una serie de resistencias que van unidas en serie a una serie de LEDs que son los que determinan si la muestra y el microcalentador están calientes o fríos, en función del que se encienda.

Las resistencias presentan un valor de 330Ω para que su corriente sea de unos 9mA aproximadamente. La cuenta que se aplica es la siguiente:

$$\frac{V_{cc} - V_{th}}{R}$$

Donde la V_{cc} tiene un valor de 5V proveniente de Arduino, la V_{th} son unos 2V aproximadamente de los LEDs y la R tiene un valor de 330Ω como hemos detallado previamente. La corriente, por tanto, que pasa por cada uno de los LEDs tiene un valor admisible para que éstos iluminen de forma correcta.

6.3.7 Arduino como cerebro electrónico de la placa

En este apartado, vamos a hablar del cerebro electrónico que llevará a cabo todas las funcionalidades de manera automática, que no es más que una placa de Arduino UNO. Dicha placa está programada principalmente para llevar a cabo todas las funciones relacionadas con el control de temperatura y el funcionamiento de manera automática de todos los elementos que intervienen en el proceso de fabricación del gel de agarosa.

A continuación se muestra la placa de Arduino que interviene en el proyecto.

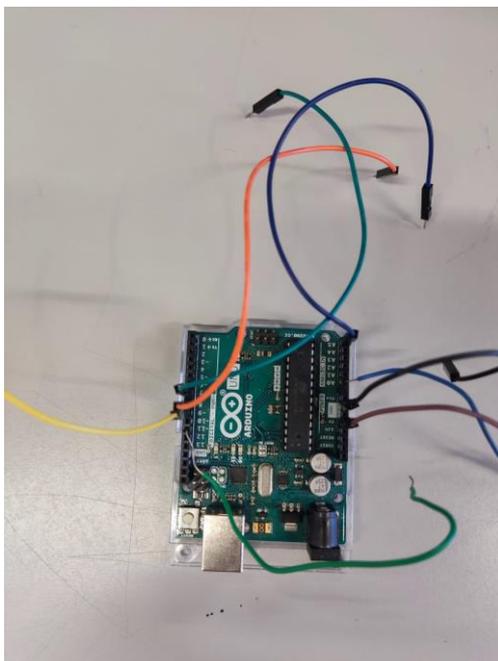


Ilustración 42: Arduino UNO empleado en el proyecto.

Cabe destacar también que muchos de los pines de esta placa están conectados con la placa electrónica que mostraremos posteriormente, para dar la funcionalidad adecuada a cada uno de los elementos que intervienen en el proceso de fabricación de la agarosa o de la propia electroforesis, ya que sin la relación de ambas placas electrónicas, todos los procedimientos que deben ser realizados para la correcta implementación del dispositivo que estamos desarrollando no se llevarían a cabo.

6.3.8 Resultado de la muestra obtenida

Si el control de temperatura se ha realizado de manera correcta, el resultado que debemos apreciar en el gel de agarosa fabricado es el siguiente:

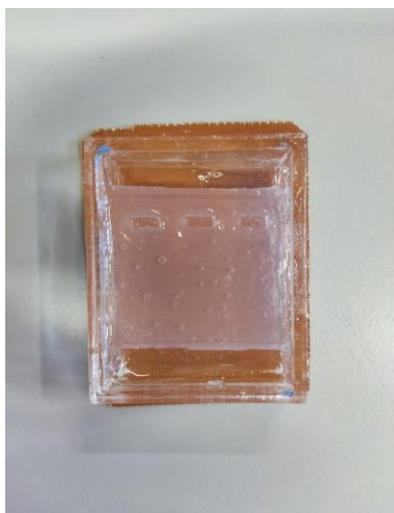


Ilustración 43: Gel de agarosa fabricado para prueba.

7 FABRICACIÓN DEL SISTEMA COMPLETO

En este capítulo, vamos a realizar una recopilación de los distintos elementos que han sido diseñados y fabricados para dotar de la funcionalidad necesaria al proyecto que estamos llevando a cabo. Hay que tener en cuenta que la mayoría de ellos ya han sido detallados de forma concreta en capítulos anteriores, por tanto, a continuación, simplemente vamos a hacer un breve resumen de los que ya hemos comentado previamente y trataremos un poco más en detalle los que todavía no han sido presentados.

7.1 Estructuras de metacrilato

En primer lugar, vamos a comentar un poco más detalladamente los moldes que se emplearán en el proyecto.

Estos moldes son necesarios principalmente para la fabricación del gel de agarosa, ya que sin ellos no podríamos llegar a mezclar TAE con agarosa y mucho menos colocar la mezcla de dichas sustancias sobre el sensor de conductividad y el microcalentador para su posterior calentado.

Hay que destacar también que dichos moldes han sido fabricados con metacrilato.

Tenemos dos moldes de metacrilato fabricados, uno para verter la mezcla, que se muestra a continuación.



Ilustración 46: Molde metacrilato
(Vista superior).



Ilustración 44: Molde metacrilato
(Vista lateral).

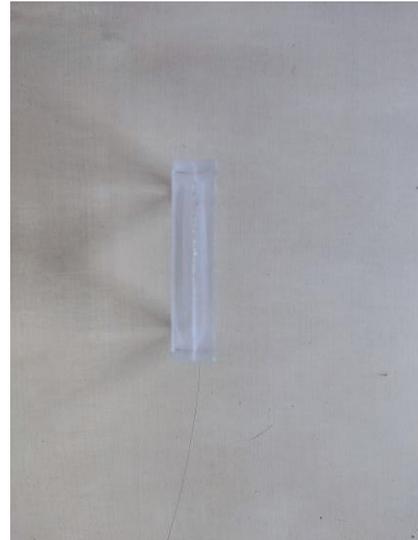


Ilustración 45: Molde metacrilato
(Vista frontal).

Y otro para la formación de los pocillos donde posteriormente se vertirá el ADN, que tiene forma de peine para formar una cavidad en el gel de agarosa una vez éste se encuentre en estado sólido.

A continuación, tendremos una imagen de dicho molde:

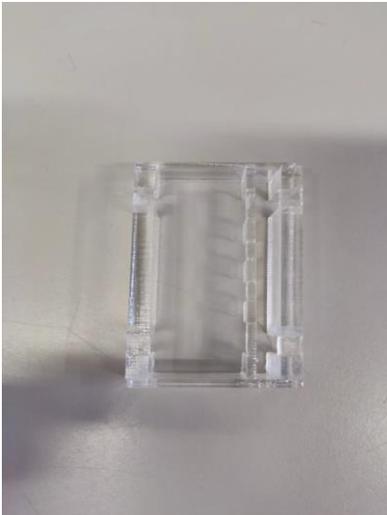


Ilustración 49: Molde metacrilato peine (Vista superior).

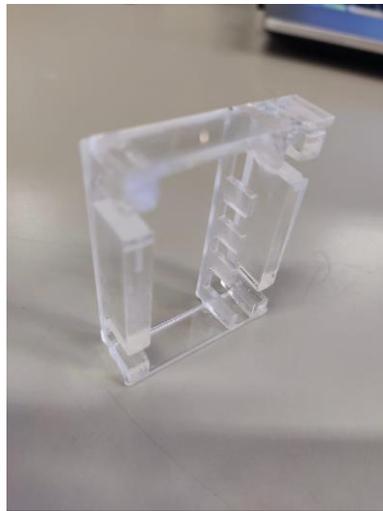


Ilustración 48: Molde metacrilato peine (Vista lateral).



Ilustración 47: Molde metacrilato peine (Vista frontal).

7.2 Sensor de conductividad

Del sensor de conductividad ya hemos hablado en apartados anteriores, por tanto, para no ser reiterativos en su explicación, simplemente vamos a mostrar una serie de imágenes de lo que fue el desarrollo del mismo antes de su fabricación y su posterior colocación en el circuito definitivo.

Hay que tener en cuenta que el sensor de conductividad que vamos a emplear es el de 2mmX2mm, por tanto, solo vamos a mostrar imágenes del mismo.

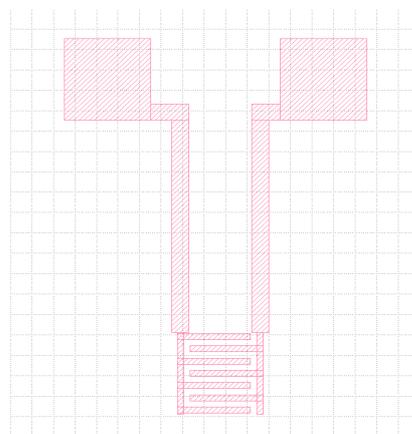


Ilustración 50: Diseño máscara 2mmX2mm Klayout.

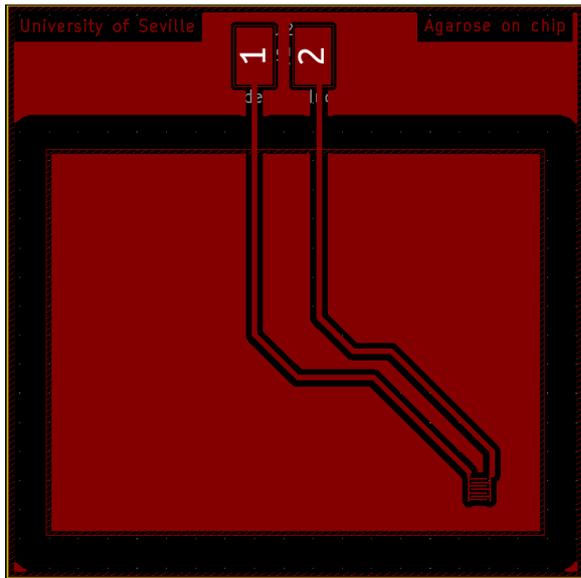


Ilustración 52: Diseño del sensor de conductividad en KICAD más marco metacrilato.

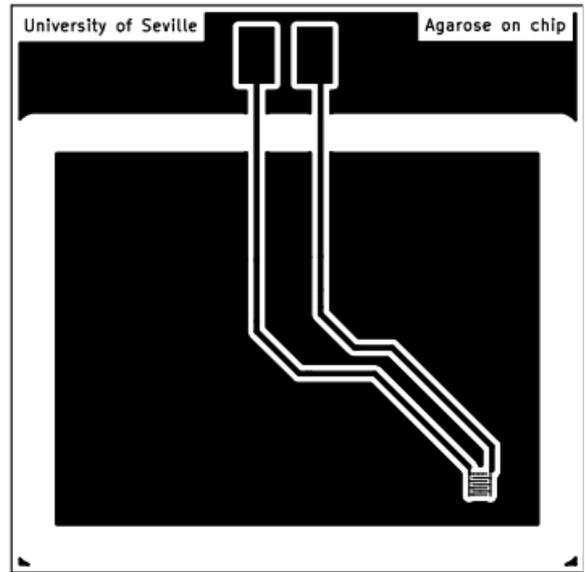


Ilustración 51: Máscara para fabricar sensor de conductividad más marco metacrilato.

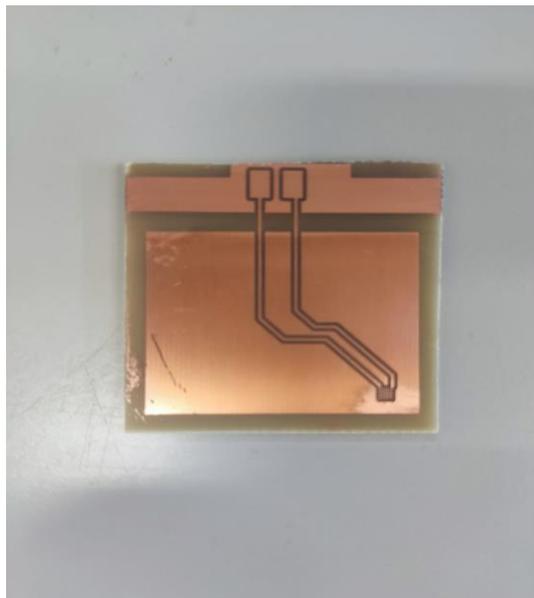


Ilustración 53: Resultado sensor de conductividad en PCB.

7.3 Microcalentador

Del microcalentador ya hemos hablado en apartados anteriores, por tanto, para no ser reiterativos en su explicación, simplemente vamos a mostrar una serie de imágenes de lo que fue el desarrollo del mismo antes de su fabricación y su posterior colocación en el circuito definitivo.

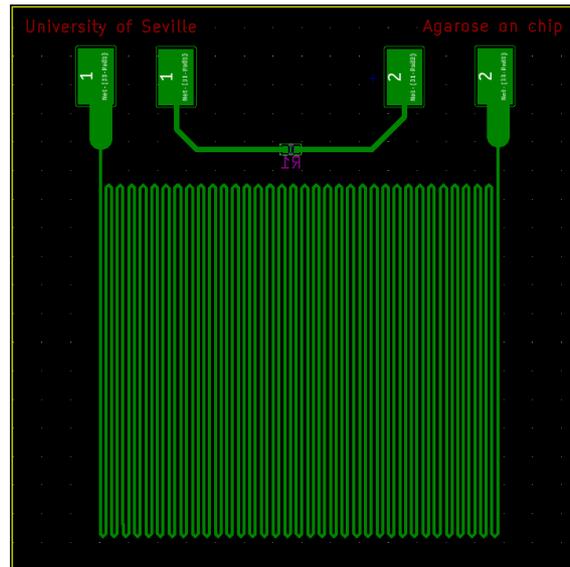


Ilustración 54: Diseño microcalentador en KICAD más NTC.

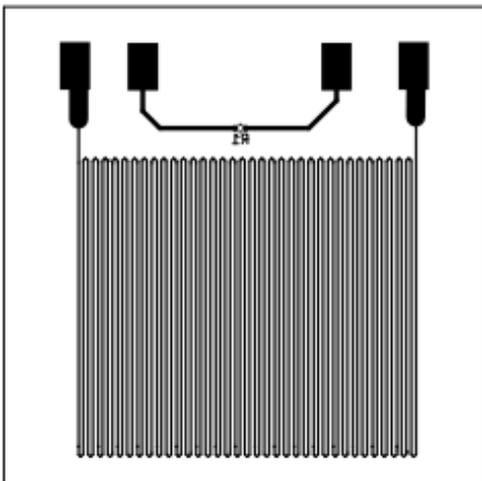


Ilustración 56: Máscara para fabricar microcalentador más NTC.

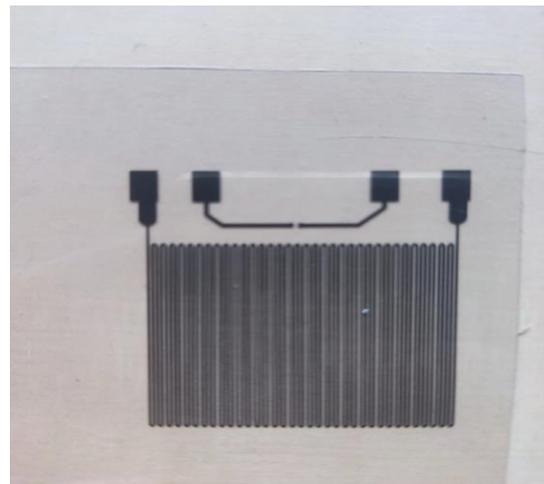


Ilustración 55: Máscara fabricada del microcalentador más NTC.

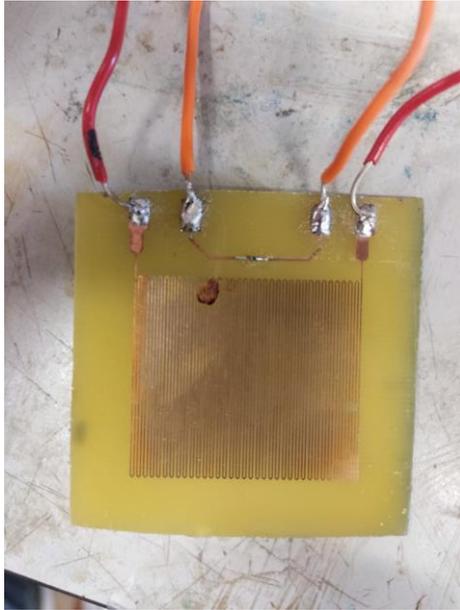


Ilustración 57: Microcalentador fabricado más NTC (Primer plano).

7.4 Montaje del sistema completo sin electrónica (Microcalentador + sensores)

En este apartado del bloque, vamos a mostrar como quedaría la unión de todas las piezas fabricadas previamente. Para ello tan solo tenemos que observar la imagen siguiente:

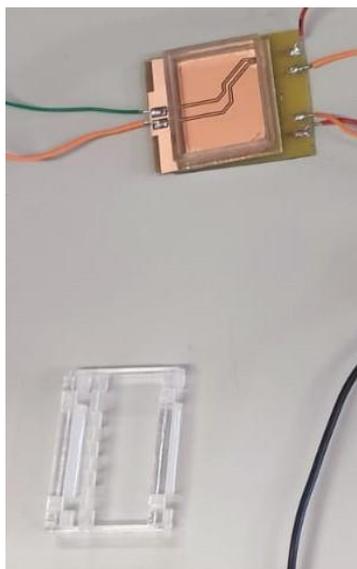


Ilustración 58: Sensor de conductividad con marco de metacrilato sobre microcalentador. Molde con peines sin colocar aún.

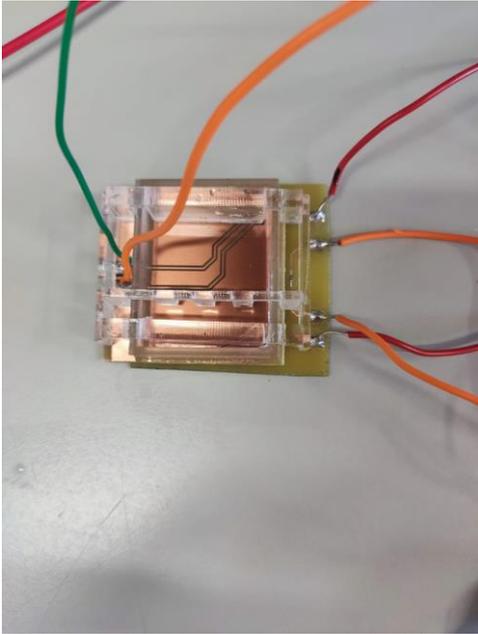


Ilustración 60: Sensor de conductividad con marco de metacrilato sobre microcalentador. Molde con peines colocado en la parte superior del otro marco. (Vista superior).

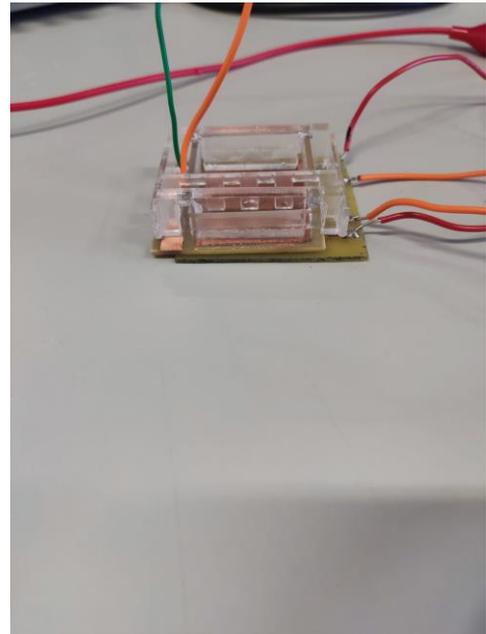


Ilustración 59: Sensor de conductividad con marco de metacrilato sobre microcalentador. Molde con peines colocado en la parte superior del otro marco. (Vista lateral).

En dichas imágenes se puede apreciar como el sensor de conductividad tiene pegado un molde de metacrilato a su alrededor, que es donde se vertirá la mezcla, seguidamente, podemos ver como el sensor de conductividad se encuentra justamente encima del microcalentador.

Hay que tener en cuenta que la PCB del sensor de conductividad es doble cara, es decir, tiene dos partes de cobre, siendo la de atrás en su totalidad cobre, lo que nos permite transferir el calor de una manera más eficiente del microcalentador a la mezcla. A su vez, la parte del sensor de temperatura vemos que no está tapada por la PCB del sensor de conductividad, ya que esto provocaría un fallo de exactitud en la toma de valores de temperatura.

Y finalmente, podemos apreciar como el molde de metacrilato que tiene los peines, va colocado encima del molde en el que se vertirá la agarosa con el TAE.

7.5 Problema presentado con el montaje anterior

A la hora de llevar a cabo las pruebas con el dispositivo nos apareció un problema, que nos llevó a buscar una solución alternativa a la primera propuesta de montaje planteada, para alcanzar los objetivos que íbamos buscando.

El problema que nos apareció en la realización de los diversos procesos fue una importante pérdida de líquido cada vez que la mezcla de TAE con agarosa alcanzaba una determinada temperatura gracias al calentador. Nos dimos cuenta que dicha pérdida aparecía porque el metacrilato no pegaba bien en las dos finas pistas de cobre que unían el sensor de conductividad con los PADS donde se soldaban los cables.

En primer lugar, simplemente para pegar el molde a la placa usamos pegamento, pero como bien hemos indicado, la pérdida era palpable a simple vista.

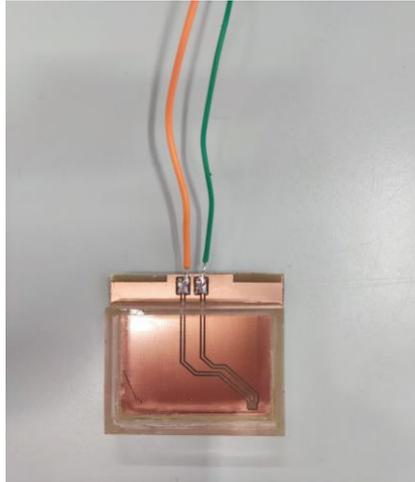
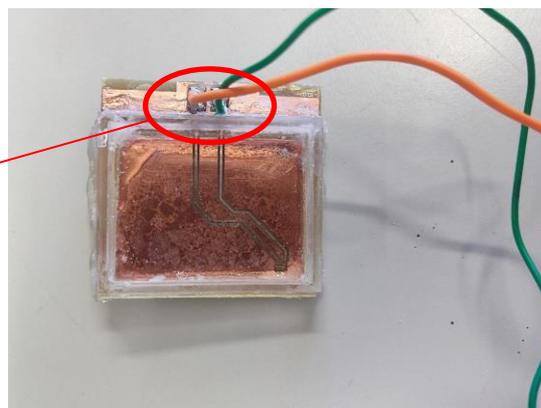


Ilustración 61: Sensor de conductividad con molde pegado solo con pegamento.

Entonces, decidimos emplear silicona para pegar el marco por dentro y por fuera y ver si conseguíamos eliminar esa pérdida de líquido que estábamos teniendo cada vez que la mezcla alcanzaba cierto grado de temperatura.



Pistas de cobre que no permitían que la estructura quedase bien pegada y aparecieran pérdidas de líquido.

Ilustración 62: Sensor de conductividad con molde pegado con pegamento y silicona.

Como se puede apreciar, existe una diferencia notoria entre la primera imagen y la segunda, ya que la silicona es un poco más basta que el pegamento y afeaba un poco lo que viene a ser la estructura final en sí.

Probamos a realizar de nuevo las sucesivas pruebas y ni por esas conseguimos evitar la pérdida de líquido en el molde. Por tanto, no nos quedó más remedio que fabricar una nueva placa con un nuevo molde. Teniendo en cuenta esta vez que la placa no tuviera nada de cobre en la superficie para conseguir que el marco quedase totalmente pegado de manera eficiente y así no tener pérdidas.

Vamos a resaltar también que solo empleamos pegamento para pegar el nuevo molde a la placa, en la que el cobre solo está en la parte de abajo para conseguir transferir el calor desde el microcalentador de manera más eficiente.

7.6 Montaje alternativo del sistema completo sin electrónica (Microcalentador + sensores)

Debido al problema que se nos presentó a la hora de realizar las pruebas con el montaje previo, no tuvimos más remedio que buscar una alternativa que nos permitiera seguir con el dispositivo hacia delante y esa solución no era otra que cortar el sensor de conductividad e incluirlo en uno de los laterales del nuevo molde que fabricamos para hacer las pruebas posteriores.

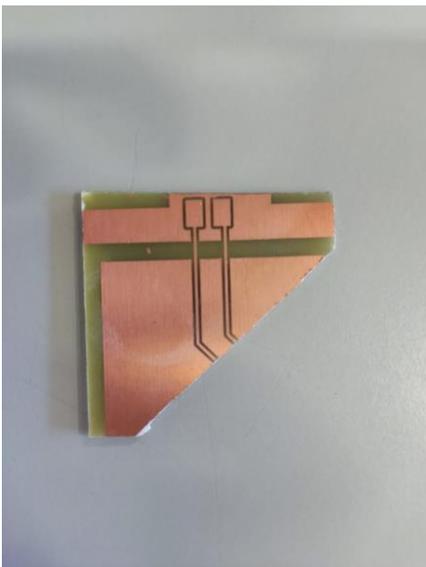


Ilustración 64: Placa del sensor de conductivida cortada.

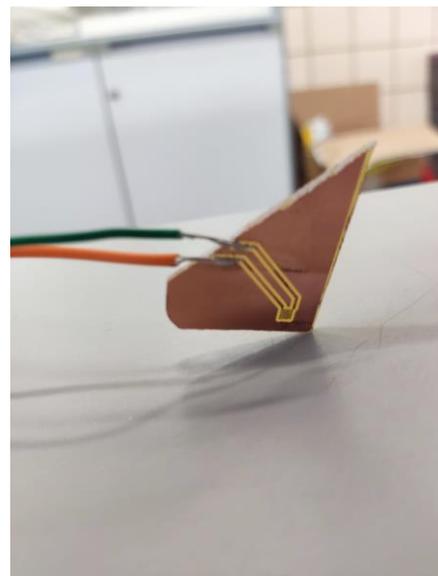


Ilustración 63: Sensor de conductividad con el que vamos a trabajar.

En las imágenes previas, se puede ver como hemos cortado el sensor de conductividad de su placa original y como le hemos soldado dos cables a cada una de sus pistas, ya que no tenemos los PADS que teníamos en el diseño original para colocar los cables.

A continuación, se va a mostrar cual es el nuevo molde que vamos a emplear en el dispositivo para realizar la mezcla y cual será el montaje completo de esta parte.

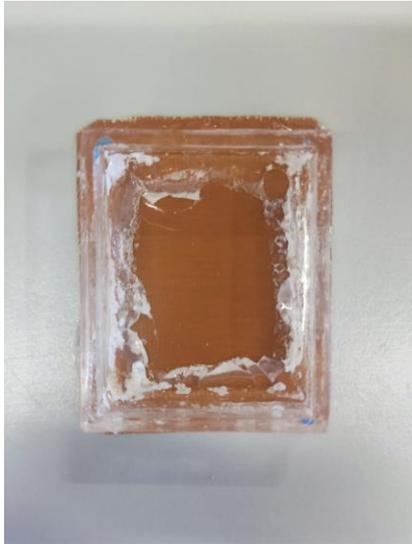


Ilustración 66: Nuevo molde fabricado.

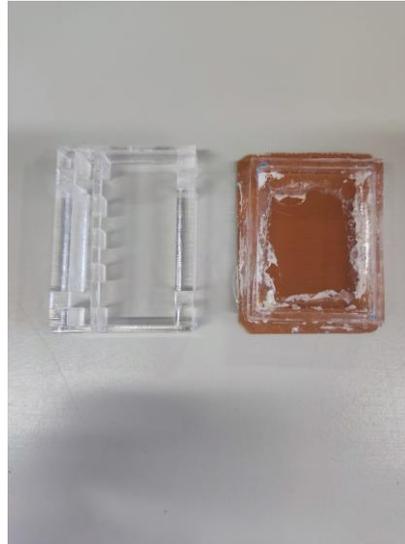


Ilustración 65: Nuevo molde más molde para peines.

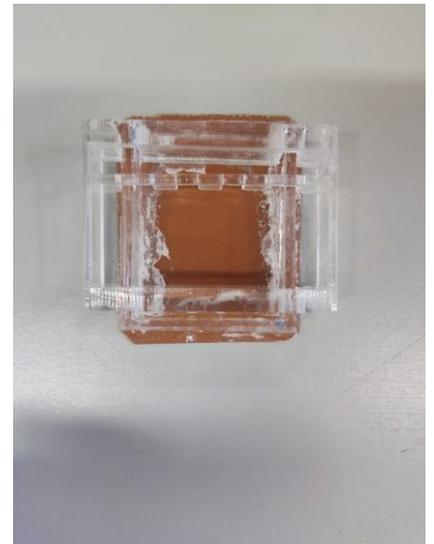


Ilustración 67: Unión de los moldes en una misma estructura.

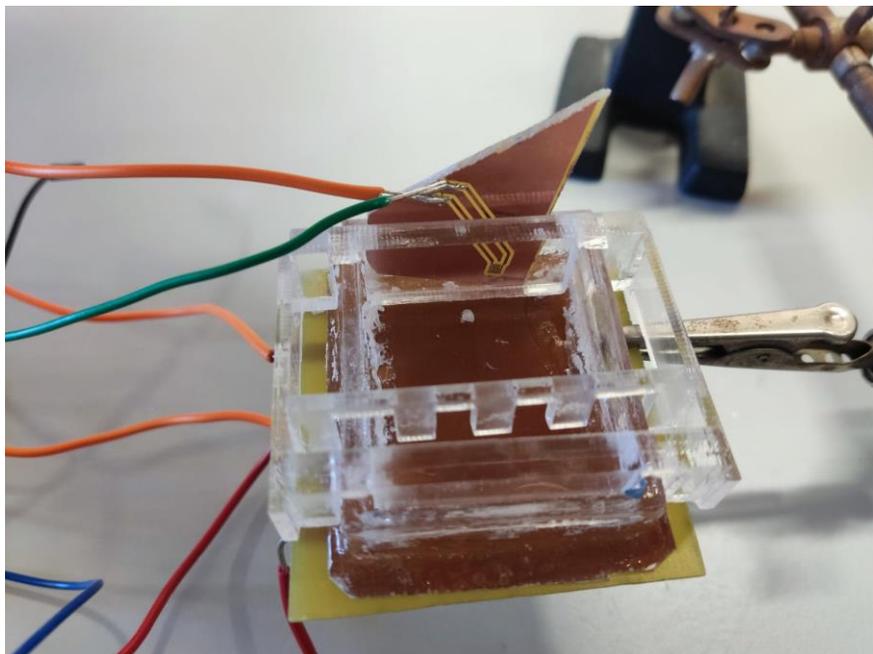


Ilustración 68: Montaje alternativo completo. (Vista lateral).

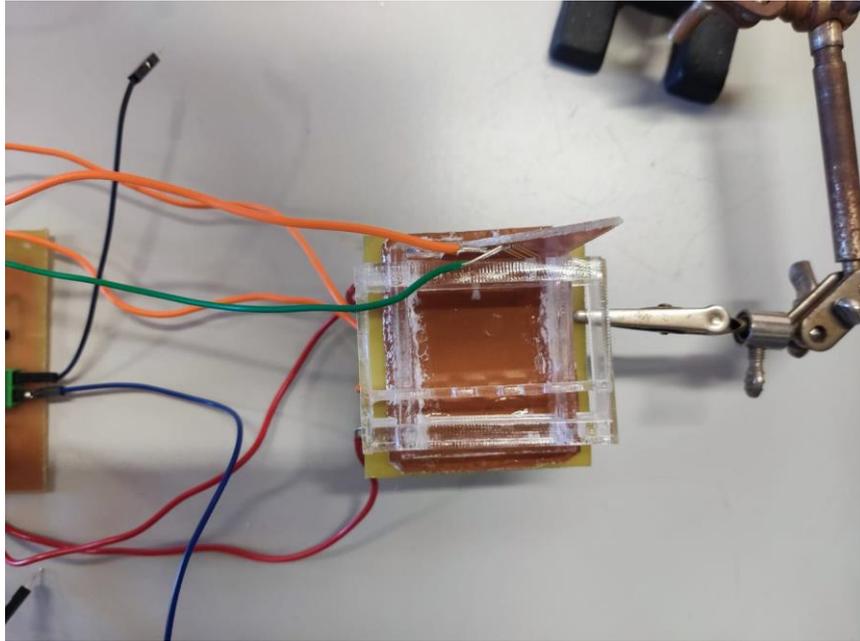


Ilustración 69: Montaje alternativo completo. (Vista superior).

En las imágenes previas del montaje alternativo completo, se puede apreciar que el microcalentador se coloca con el cobre para abajo, es decir, dado la vuelta. Esto es así, para evitar que se haga un cortocircuito con la parte inferior de cobre de la placa donde pegamos el molde y que a su vez tendrá colocado en su superficie el sensor de conductividad.

8 CIRCUITOS ELECTRÓNICOS

En este capítulo, vamos a hablar principalmente del circuito electrónico que es necesario para realizar todas las funciones que se deben llevar a cabo en el proyecto, como son la fabricación del gel de agarosa y la electroforesis.

8.1 Selección de Agarosa/Electroforesis

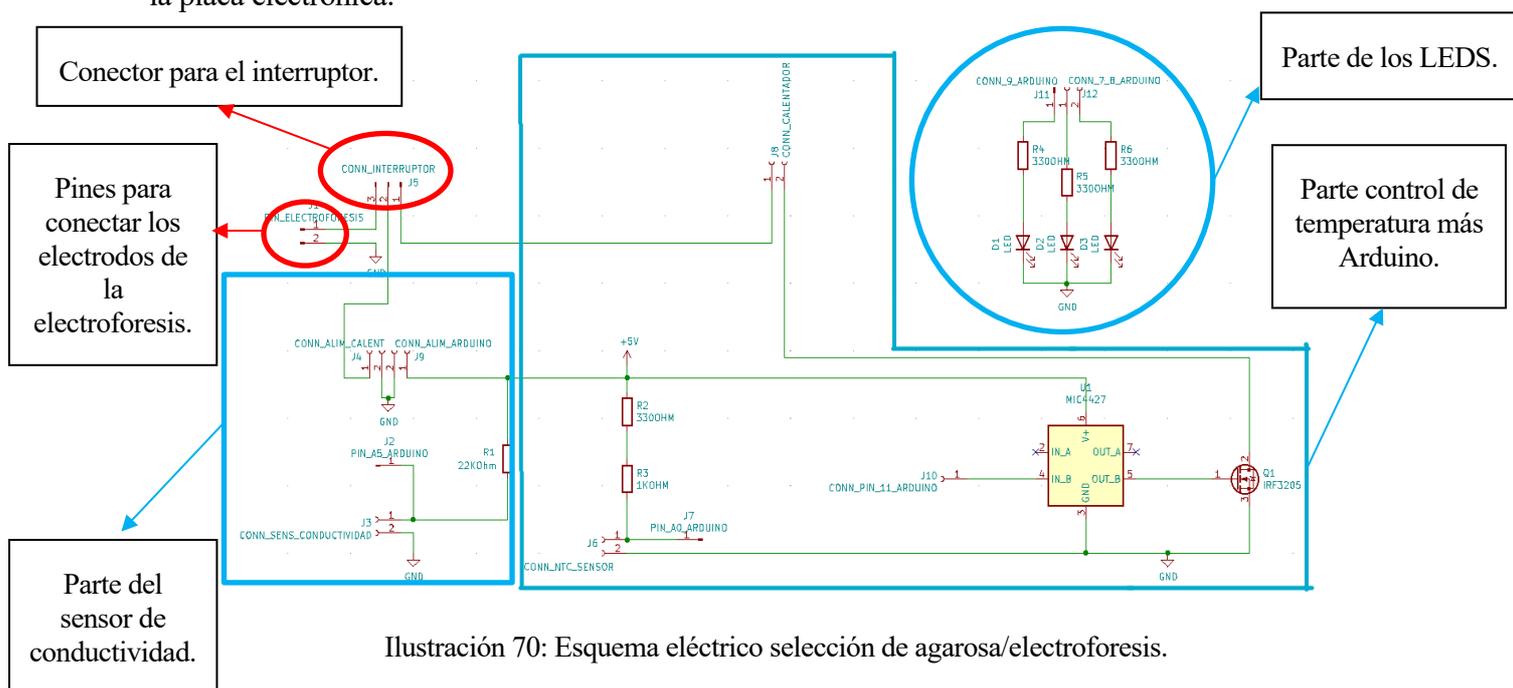
A continuación, vamos a hablar del circuito electrónico que empleamos para llevar a cabo la fabricación del gel de agarosa o en su defecto para llevar a cabo el proceso de electroforesis.

El circuito estará gobernado por un interruptor de tres posiciones, en función de la posición del mismo, el circuito llevará a cabo el proceso de agarosa o el de electroforesis. En la posición central de dicho interruptor, no se realizaría ninguno de los dos procesos comentados previamente.

A continuación, vamos a mostrar un esquema del circuito en cuestión para facilitar su comprensión e indicaremos a su vez que son cada una de las partes que componen dicho circuito.

8.1.1 Esquemático del circuito completo

Procedemos a continuación a mostrar una imagen del esquemático desarrollado para la fabricación de la placa electrónica.



8.1.2 Elementos empleados en el circuito

En este apartado, vamos a comentar cada uno de los elementos/componentes que son empleados para la fabricación de la placa.

8.1.2.1 Conectores y pines

En el esquemático del apartado anterior, se puede apreciar que hay multitud de conectores y pines que sirven para conectar a la placa multitud de elementos externos, como pueden ser el Arduino (que es el otro circuito electrónico empleado, que servirá como cerebro para la automatización de los procesos), la fuente de alimentación que será la encargada de alimentar el circuito, el microcalentador que será el encargado de calentar la mezcla de agarosa con TAE, el sensor de temperatura NTC que será el encargado de medir la temperatura a la que se encuentra la mezcla comentada previamente, el interruptor que será el encargado de determinar que proceso debe llevar a cabo la placa y el sensor de conductividad que será el encargado de indicar cuando se ha detectado líquido en el molde preparado para ello.

8.1.2.2 LEDS

Tenemos tres LEDS colocados en la placa, uno de color rojo, otro de color amarillo y otro de color verde, como comentamos en capítulos previos, estos LEDS se encuentran colocados en la placa para tener un feedback visual con el sistema y saber en que momento podemos retirar el molde con el gel de agarosa del microcalentador sin provocarnos una lesión debido a una quemadura.

Su función principal es ayudar al operario que trabaja con el dispositivo para que éste no tenga ningún percance debido a las altas temperaturas a las que va a trabajar el microcalentador y a las que va a llegar el gel de agarosa.

8.1.2.3 Interruptor

Vamos a emplear el uso de un interruptor para poder tener las dos funcionalidades necesarias en una misma PCB y no tener distintos circuitos para ejercer las funciones que necesitamos.

El interruptor que vamos a emplear es un interruptor de tres posiciones como ya se comentó en apartados previos y cada posición de dicho interruptor va a tener una funcionalidad determinada.

En primer lugar, debemos colocar el interruptor hacia la derecha para llevar a cabo el proceso de fabricación del gel de agarosa y seguidamente, cuando todo este proceso haya finalizado, vamos a colocar el interruptor hacia la izquierda para continuar con el proceso de la electroforesis.

8.1.2.4 Electrodo electroforesis

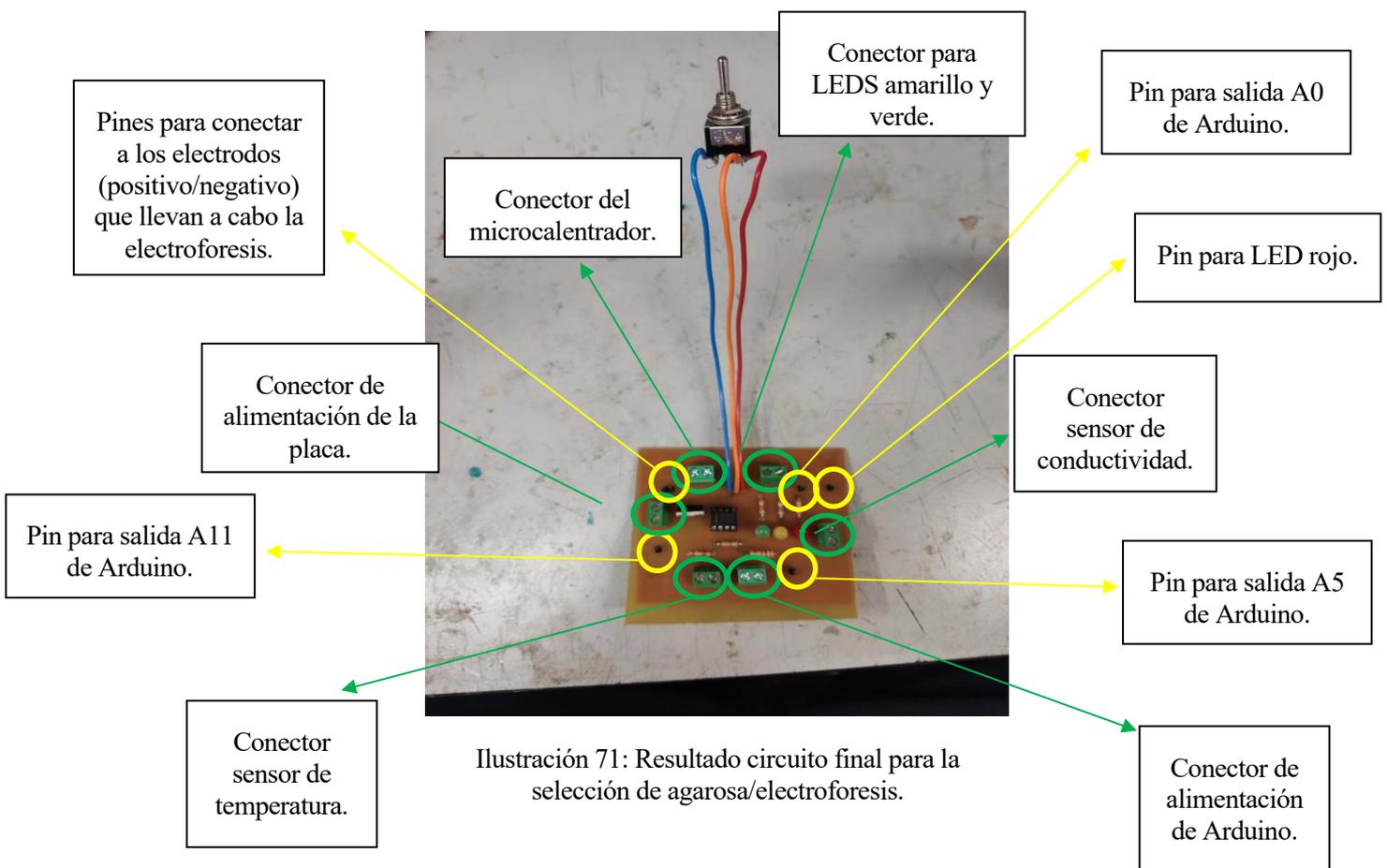
Continuando con lo último detallado en el apartado anterior, para llevar a cabo el proceso de electroforesis, son necesarios el empleo de una serie de electrodos, dichos electrodos son de acero, ya que tienen una conductividad eléctrica muy buena.

Uno será el electrodo positivo y el otro el negativo. Su principal funcionalidad será la de migrar el ADN del electrodo negativo al electrodo positivo, ya que los fragmentos tienen carga negativa.

Teniendo en cuenta que todos los fragmentos de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa, los fragmentos pequeños atraviesan el gel de agarosa más rápido que los grandes.

8.1.3 Prototipo final de la placa fabricado

En este apartado, vamos a mostrar el resultado definitivo de la placa que se ha fabricado para este circuito electrónico, detallando la funcionalidad de sus pines y conectores.



9 MONTAJE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

En este capítulo, vamos a mostrar los resultados del dispositivo final que hemos realizado, explicando en cada imagen que se está representando y en que momento del proceso nos encontramos, para que visualmente podamos hacernos una idea de que está ocurriendo en todo momento.

En primer lugar, antes de poner en funcionamiento el dispositivo, podemos apreciar que al cargarse el código del programa en la placa de Arduino UNO y tener la placa alimentada a los 20V necesarios, se enciende el LED verde, para indicarnos que el dispositivo se encuentra preparado para comenzar a funcionar.

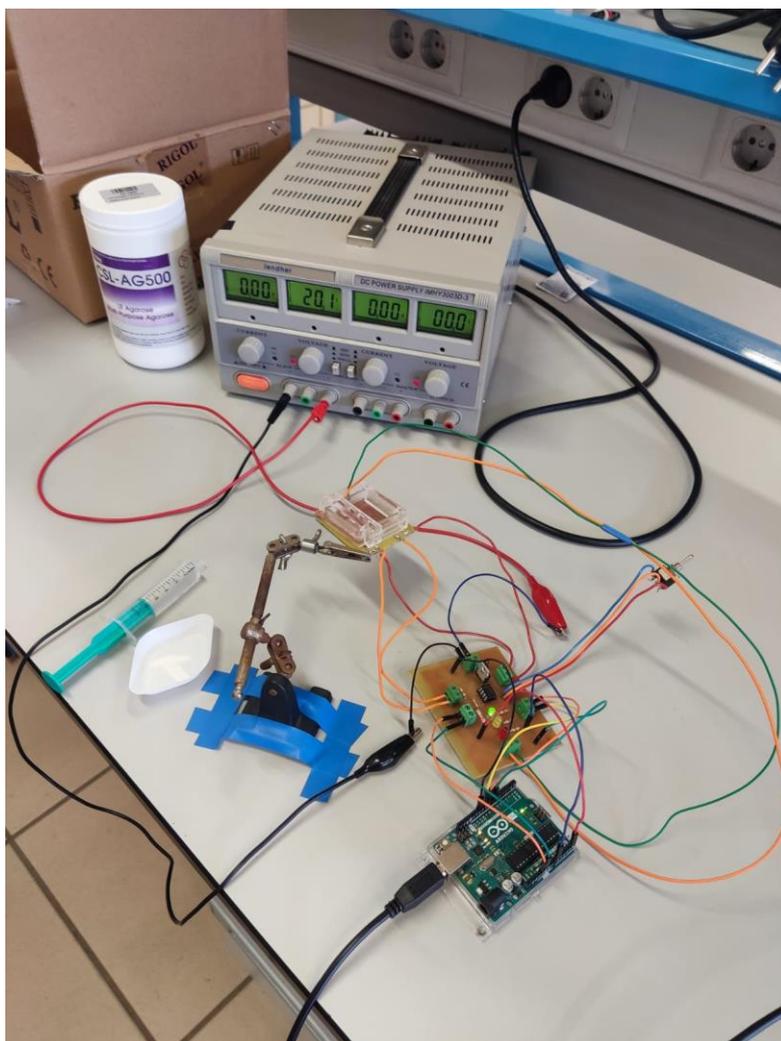


Ilustración 72: Dispositivo preparado para comenzar a funcionar.

Seguidamente, lo que hacemos es mover el interruptor hacia la posición de la derecha (hacia el cable rojo). Con esta acción lo que estamos haciendo es que comience el proceso de fabricación del gel de agarosa.

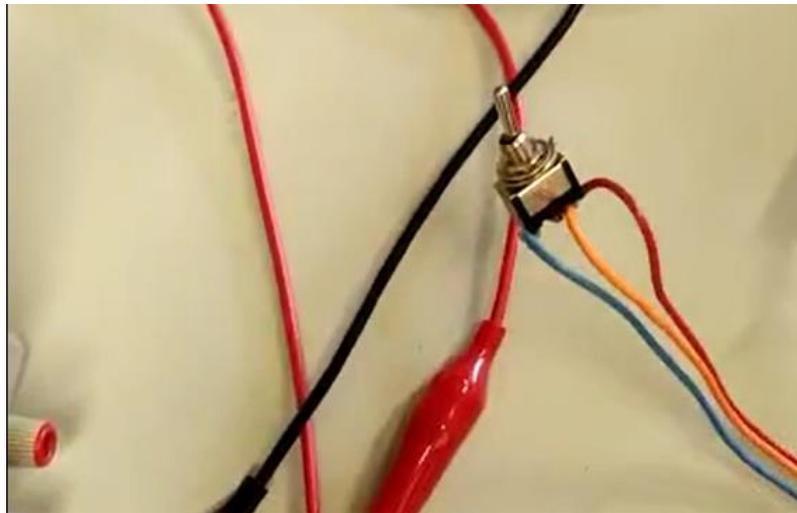


Ilustración 73: Interruptor hacia la derecha.

Una vez colocado el interruptor hacia la derecha, vertimos en primer lugar el TAE, del cual echaremos aproximadamente unos 9 mililitros, teniendo en cuenta que la concentración de gel de agarosa que queremos es del 2%, en el molde que tenemos fabricado para ello y a su vez debemos tener previamente ya colocado el sensor de conductividad. Seguidamente echamos la agarosa en el mismo molde, teniendo en cuenta que la concentración de gel con la que vamos a trabajar es del 2%, medimos en un peso específico 0.18 gramos de agarosa y lo echamos en el molde de manera bien distribuida, para que no se queden zonas del gel con baja cantidad y nos den lugar a un gel descompensado.

Podremos apreciar en ese momento como se apaga el LED verde de la placa, porque el dispositivo ya está en funcionamiento.

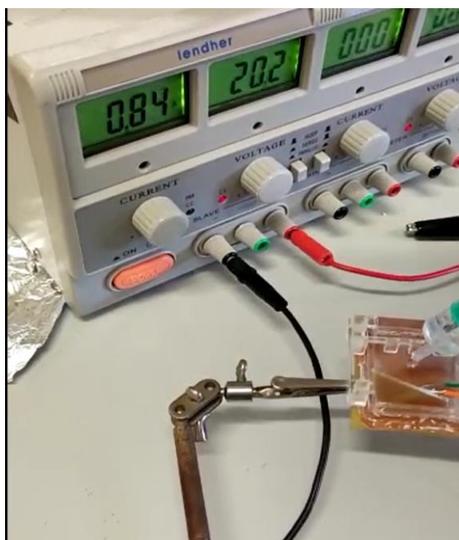


Ilustración 75: Vertimos TAE sobre el molde. Sensor de conductividad, detecta la presencia de líquido.

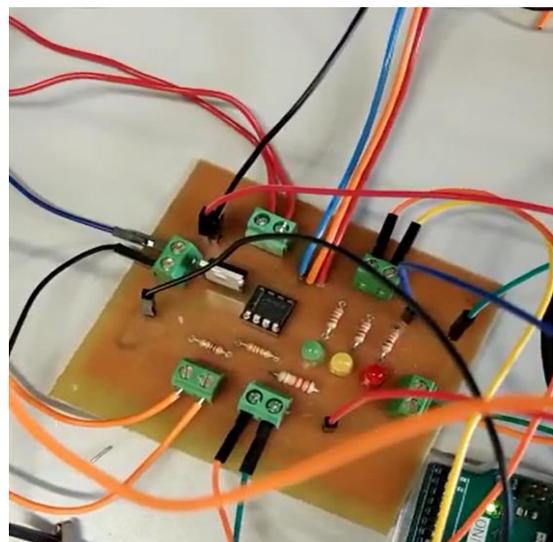


Ilustración 74: Todos los LEDs se apagan porque comienza a funcionar el microcalentador.

Cuando la temperatura se incremente hasta valores iguales o superiores a los 98°, podemos apreciar como se enciende el LED rojo en la placa, señal de que en estos momentos el microcalentador se encuentra a una temperatura muy elevada y no es para nada recomendable tocarlo ni a él ni a la mezcla de TAE con agarosa.

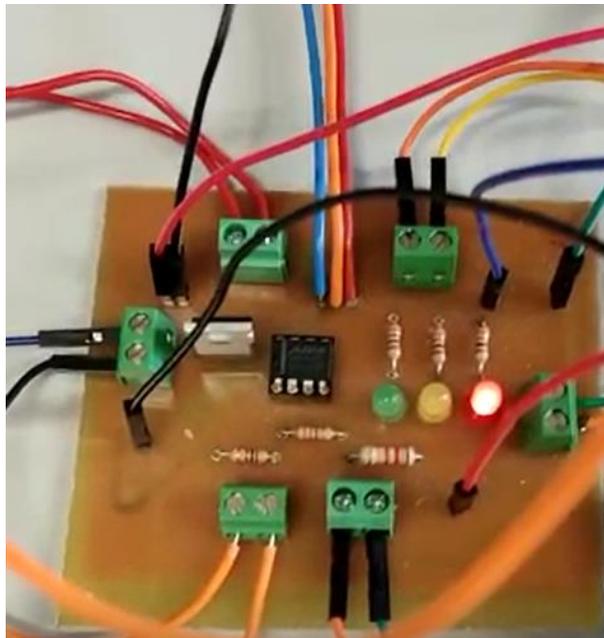


Ilustración 76: LED rojo encendido, se ha alcanzado una temperatura de calentado muy elevada.

A medida que vamos calentando, la temperatura provoca que la mezcla burbujee, señal de que el proceso se está llevando a cabo de manera satisfactoria.

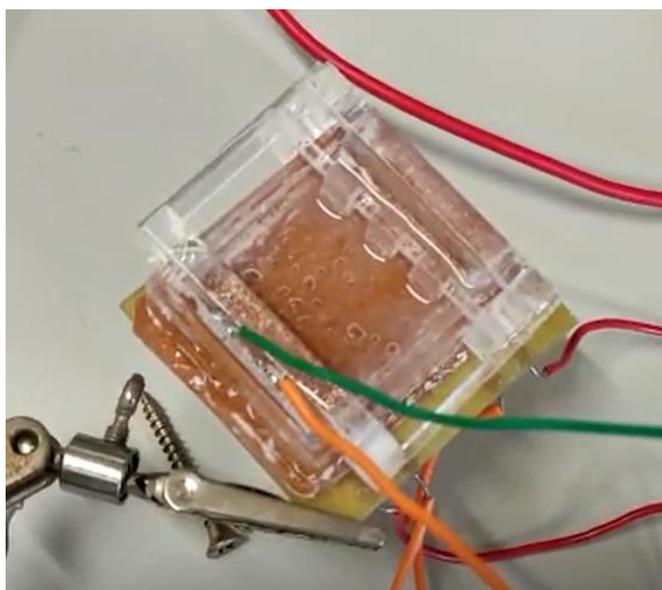


Ilustración 77: Burbujas en la mezcla cuando se alcanzan temperaturas cercanas a la de referencia.

El tiempo de calentado del microcalentador para la fabricación del gel de agarosa es de 10 minutos, a partir de ese tiempo el calentador se apaga y deja que la mezcla se vaya enfriando por sí misma, para así conseguir que el gel resultante presente un estado compacto y transparente.

A medida que la temperatura decae, se encenderá el LED amarillo cuando la misma sea igual o inferior a 98°C

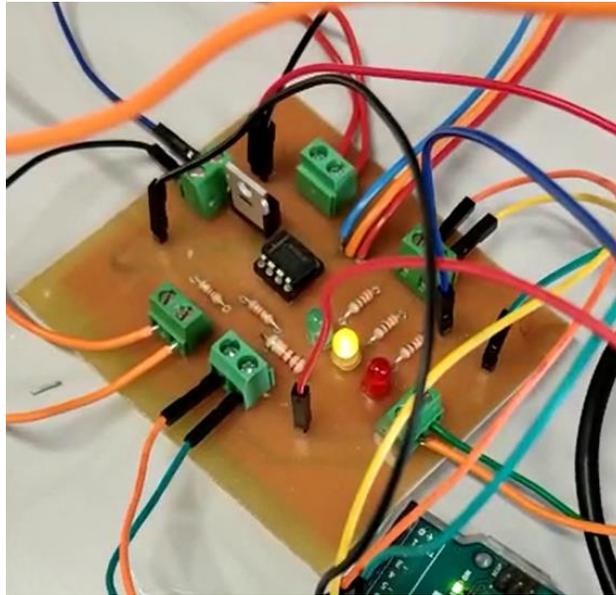


Ilustración 78: LED amarillo encendido, el microcalentador se ha apagado, pero la mezcla sigue estando muy caliente.

Cuando la temperatura de la mezcla llega en torno a los 35°C, podemos decir que la muestra ya está prácticamente lista y podemos apreciar en la placa como se vuelve a iluminar el LED verde que teníamos encendido al principio.

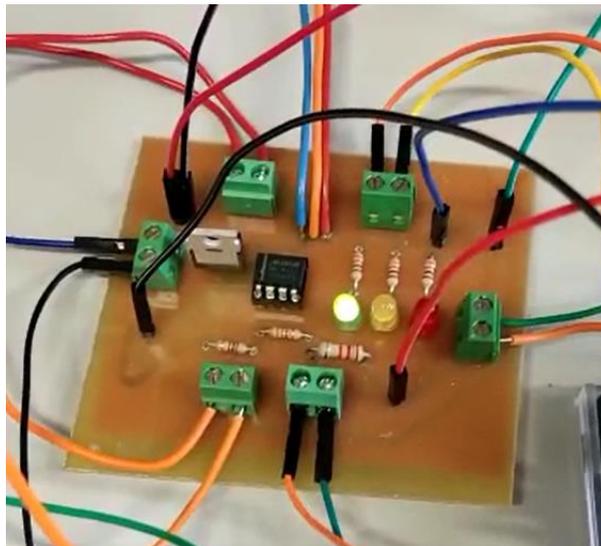


Ilustración 79: LED verde encendido, la temperatura de la mezcla ha alcanzado los 35°C.

Una vez ha transcurrido el tiempo necesario, aproximadamente unos 20 minutos para que la muestra se enfríe en su totalidad, veremos como el LED verde se mantiene encendido, porque ya no hay problemas de posibles lesiones con el microcalentador y a parte porque ya se ha terminado en sí el proceso de fabricación del gel de agarosa.

Seguidamente, lo que se hace es proceder a retirar el molde con los peines para ver si los pocillos han sido correctamente creados.

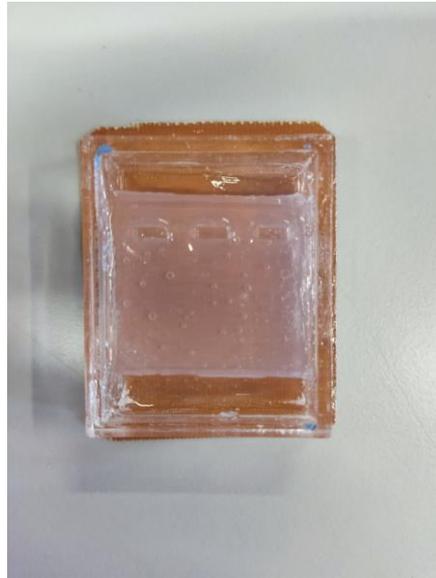


Ilustración 80: Pocillos creados en el proceso de fabricación del gel de agarosa.

Una vez tenemos ya el gel de agarosa fabricado, tenemos que proceder a llevar a cabo el proceso de electroforesis, para ello tendremos que hacer uso de unos electrodos de acero como los que se muestran a continuación.

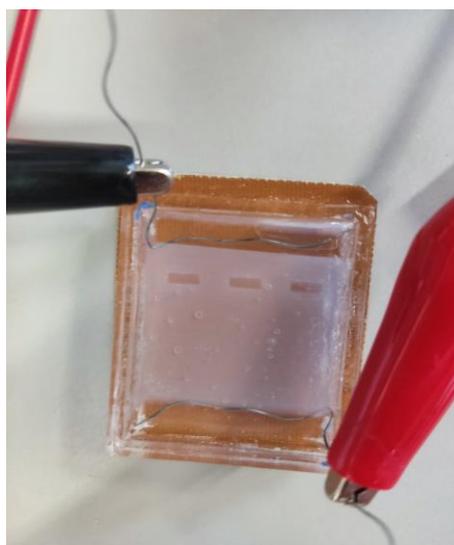
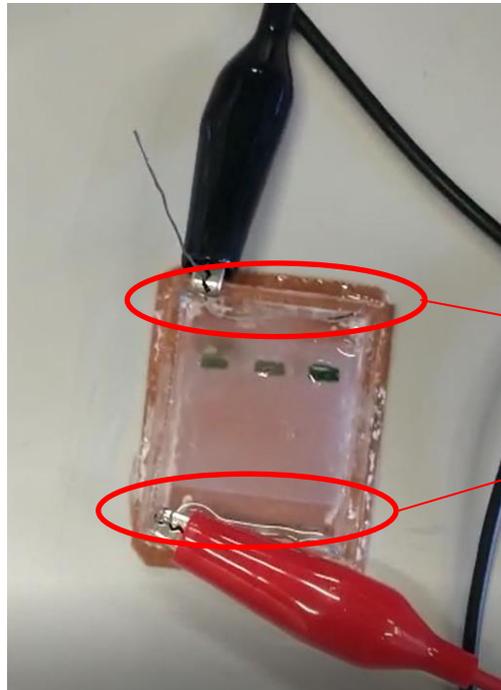


Ilustración 81: Electrodo introducidos en el gel de agarosa.

Una vez enseñado uno de los elementos más importantes para llevar a cabo el proceso de la electroforesis, tendremos que destacar que hay que verter líquido TAE en la superficie del gel de agarosa fabricado para que exista conductividad entre los dos electrodos que vamos a emplear en el proceso.



Se puede apreciar el TAE en los grandes pozos que hay en la parte superior e inferior del gel de agarosa.

Ilustración 82: TAE sobre gel de agarosa para llevar a cabo la electroforesis.

A continuación, una vez vertido el TAE sobre el gel de agarosa, colocamos las muestras de tinta o de ADN con la ayuda de una jeringuilla en los pocillos que han sido creados.

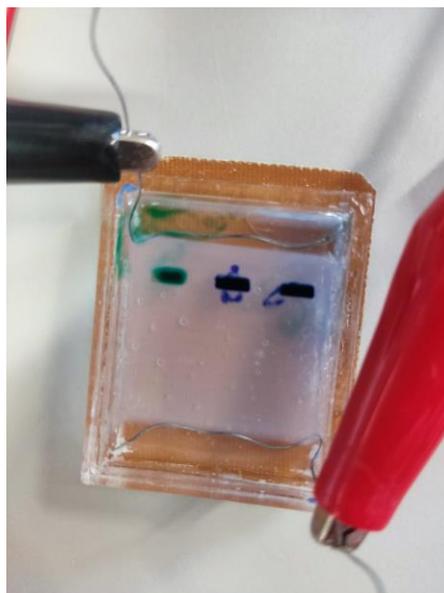


Ilustración 83: Tinta recién vertida en los pocillos.

Giramos seguidamente la patilla del interruptor hacia la izquierda, para la dirección del cable azul del interruptor. Dicha acción tiene como objetivo llevar a cabo el proceso de electroforesis.

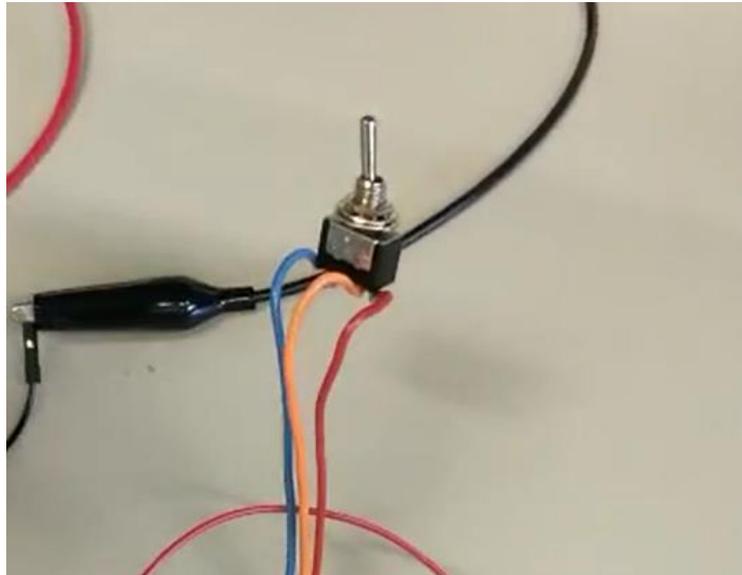


Ilustración 84: Interruptor hacia la izquierda.

Finalmente, en este apartado vamos a mostrar como es la migración de la tinta o del ADN cada 2 minutos hasta que la tinta o el ADN ya haya migrado.

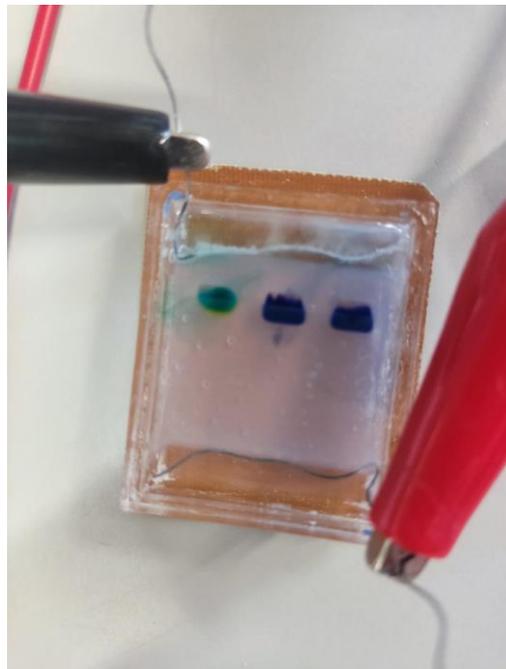


Ilustración 85: Después de 2 minutos del proceso de electroforesis.

Pasados dos minutos, podemos apreciar como prácticamente ya no queda nada de tinta en el interior de los pocillos.

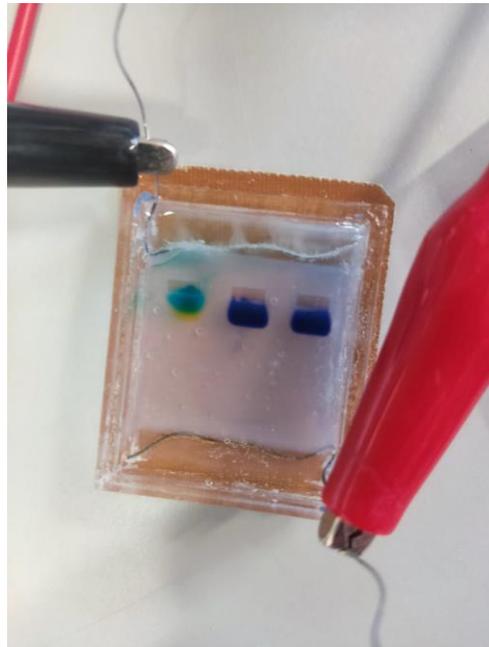


Ilustración 86: Después de 4 minutos del proceso de electroforesis.

Vemos a continuación como la tinta sigue bajando a lo largo del gel de agarosa, desde el polo negativo al positivo.

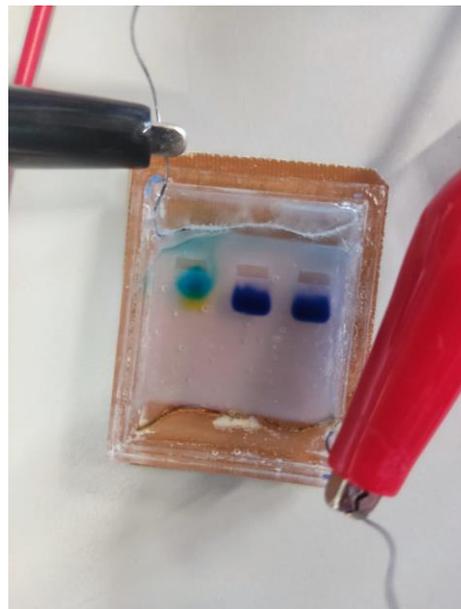


Ilustración 87: Después de 6 minutos del proceso de electroforesis.

Empezamos a ver pasados seis minutos, como el color verde se empieza a descomponer en dos colores primarios, amarillo y azul.

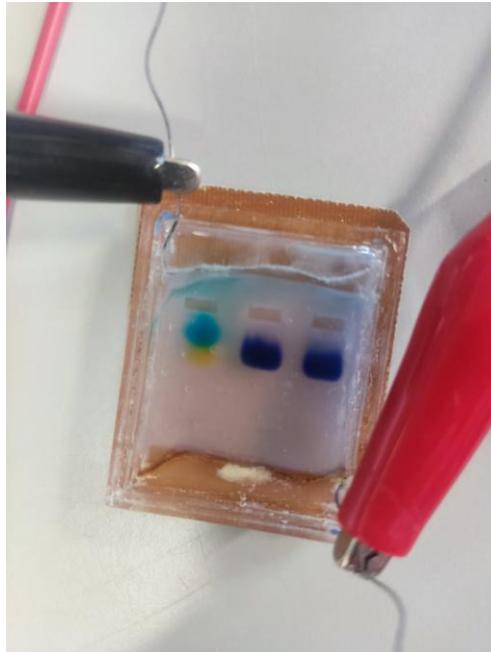


Ilustración 88: Después de 8 minutos del proceso de electroforesis.

En la ilustración anterior, podemos ver como ya están prácticamente separados en su totalidad el color azul y el amarillo que formaban la tinta verde y apreciamos también como en la tinta azul pura, no se descompone en ningún color, porque es básicamente un color primario.

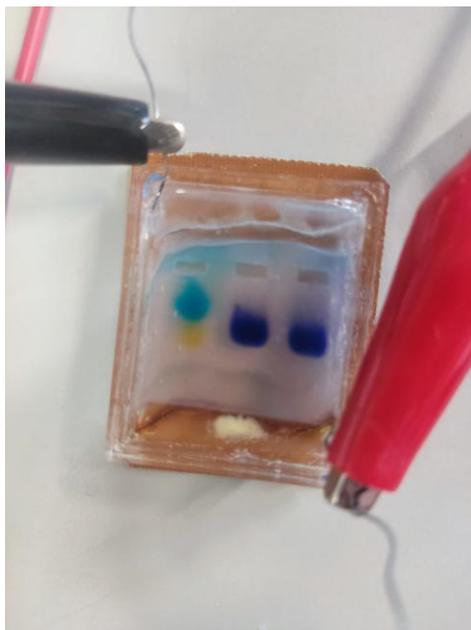


Ilustración 89: Después de 10 minutos del proceso de electroforesis.

Sigue corriéndose la tinta a lo largo del gel de agarosa, como llevamos viendo a lo largo de esta sucesión de imágenes mostradas previamente.

Y finalmente, la tinta o el ADN migrado se puede apreciar en esta última imagen, ya que vemos que no nos queda restos de nada en los pocillos.

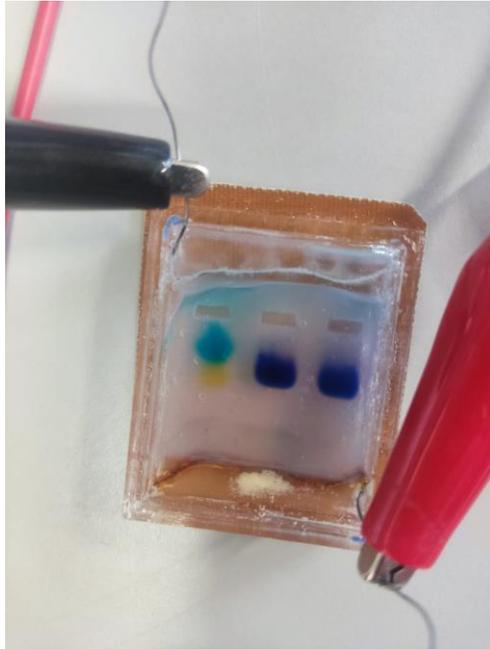
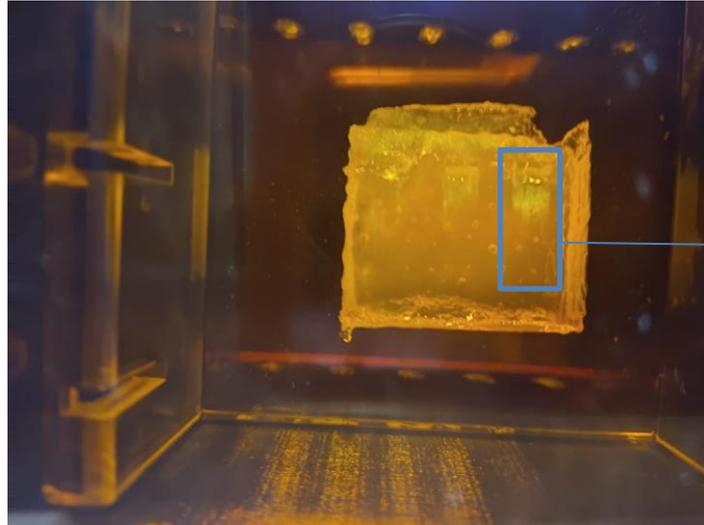


Ilustración 90: Después de 12 minutos del proceso de electroforesis.

Cabe destacar una cosa importante en todo este proceso. Como se puede apreciar, después de doce minutos de proceso de electroforesis, la tinta amarilla baja más rápido que la tinta azul ya que ambas componen en general la tinta verde que teníamos al principio vertida en el primer pocillo. Esto es así, debido a que las partículas más pequeñas circulan más rápido que las partículas más grandes a través del gel de agarosa.

En los otros dos pocillos, no podemos apreciar ninguna separación de colores porque el color azul es un color primario puro y no se descompone en otros como bien comentamos previamente.

A continuación, vamos a mostrar una imagen con ADN migrado vista con luz ultravioleta en uno de los experimentos realizados, que se podrá ver con más detalle en el Anexo E de la memoria:



Ahí se puede apreciar como la banda de ADN a medida que se va migrando, va hacia abajo.

Ilustración 91: Imagen del proceso de migración de ADN después de aplicarle luz ultravioleta.

10 CONCLUSIONES

El principal objetivo de desarrollo de este proyecto es el diseño de un dispositivo electrónico capaz de preparar gel de agarosa y de realizar la electroforesis para hacer pruebas relacionadas con la migración de ADN. Este sistema incluye diversos procesos que deben interactuar entre sí, para llevar a cabo el desarrollo del mismo de una forma eficiente.

Siguiendo la línea que se tenía planteada, se han realizado los diversos diseños y se han fabricado todos y cada uno de los circuitos electrónicos que componen el sistema final y el sensor de conductividad, así como la comprobación del correcto funcionamiento de cada uno de ellos.

Teniendo en cuenta lo comentado previamente, podemos decir que se han cumplido todos los objetivos que nos habíamos marcado al principio de este documento, como eran:

- **Diseño Simple:** Como se puede apreciar en todos y cada uno de los diseños de los circuitos electrónicos que hemos llevado a cabo, ya que son diseños muy simples y lo más optimizados posibles.
- **Diseño compacto:** Uno de los objetivos básicos del proyecto, es agrupar en un solo dispositivo todo lo referente a la fabricación del gel de agarosa y al proceso de electroforesis, por lo que optamos por hacer un diseño compacto de todas las partes que intervienen en el proyecto, para así ocupar el mínimo espacio posible y tenerlo todo unido en un mismo dispositivo. Para ello, fue necesario el uso de un interruptor, que gobernará el dispositivo, indicando en todo momento que funcionalidad debe llevar a cabo el sistema.
- **Diseño modular:** Con el objetivo de poder tener un dispositivo de fácil acceso para todos y cada uno de los diferentes procesos en caso de fallo, se decidió realizar un diseño modular dividiendo en diversos bloques el dispositivo. Para ello, en la placa general, colocamos multitud de conectores para conectar todos y cada uno de los circuitos electrónicos externos que van a proporcionarle una cierta funcionalidad al sistema. Con ello, lo que conseguimos es que en caso de fallo, tan solo tengamos que desconectar de los conectores el circuito electrónico conflictivo y solventar el problema que en él ocurra, sin necesidad de desmontar todo el sistema.
- **Dispositivo portátil:** Otro de los objetivos que habíamos planteado previamente en nuestro proyecto, era la construcción de un dispositivo que fuera fácil de transportar y de montar en unos minutos. Esto se ha conseguido gracias a la estructura que le hemos dado a nuestro dispositivo y al sistema de conexión que se le ha diseñado para integrar todos los procesos que lleva a cabo.
- **Dispositivo autónomo:** Por último, otro objetivo que nos marcamos al comienzo del proyecto, fue conseguir que el sistema fuese lo más independiente posible gracias a la ayuda de Arduino. Finalmente, dicho objetivo fue cumplido para la mayoría de las tareas que no requieren de la participación de un operario, como es el caso de la mezcla de agarosa con TAE o del relleno de los pocillos con ADN o tinta como se ha usado en multitud de pruebas.

Desde el punto de vista personal, el hecho de haber realizado este proyecto, me ha supuesto comprobar todos los conocimientos de electrónica que he ido adquiriendo con el paso de los años en el Grado y además poder ampliar mis conocimientos en un campo tan importante como es hoy en día la unión de la electrónica con la medicina.

También he conseguido adquirir una visión más general y amplia de lo que supone la electrónica en su conjunto, ya que en el proyecto he ido avanzando desde el diseño de los circuitos electrónicos hasta su fabricación.

Gracias a la labor desempeñada en este proyecto, puedo decir que hoy en día tengo las ideas más claras de como desarrollar un dispositivo desde cero y de la importancia que hay que darle a la comprobación de todos los componentes y todos los circuitos de manera exhaustiva, ya que un simple fallo de comprobación con las partes del dispositivo por separado, te puede ahorrar un fallo enorme con el circuito montado en su totalidad, ya que el tiempo que se tarda en averiguar de donde proviene el fallo es aún mayor que si haces la comprobación detalladamente de cada uno de los componentes o de las pistas que se han diseñado para cada uno de los circuitos.

11 TRABAJOS FUTUROS-MEJORAS

El siguiente capítulo lo vamos a destinar a comentar las futuras ampliaciones destinadas a mejorar el proyecto y a optimizar su funcionamiento.

Para ello, a continuación, vamos a resaltar algunas de las cosas que hemos detectado que pueden ser objeto de mejora en un futuro:

- **Empleo de un ventilador:** El empleo de un ventilador, nos permitiría reducir los tiempos de espera del enfriado del gel de agarosa. A día de hoy en el proyecto, son necesarios 20 minutos para conseguir que la muestra se cure en su totalidad y se consigan unos pocillos óptimos. Gracias a la ayuda de dicho ventilador, podríamos enfriar la muestra de una manera más rápida y conseguir, por tanto, resultados más rápidos.
- **Empleo de mosfets como interruptores:** Gracias al empleo de dos mosfets, podemos sustituir el uso del interruptor y nos quedaría un diseño más optimizado. La idea sería tener dos mosfets inicialmente abiertos ambos, cuando quisiéramos llevar a cabo el proceso de fabricación del gel de agarosa mediante software programado en Arduino cerraríamos uno de ellos y cuando dicho proceso ya hubiese finalizado, por medio de software también cerraríamos el otro mosfet a medida que abrimos el que cerramos en primer lugar, para dar paso de esta forma al proceso de la electroforesis.
- **Introducir Arduino en la placa general:** Para disminuir el tamaño del dispositivo, podríamos introducir la placa de Arduino en la placa general del sistema. Tan solo tendríamos que hacer mediante diseño, las conexiones pertinentes para introducir dicho Arduino en la placa que engloba el sistema.
- **Carcasa para electrodos:** Fabricar una carcasa que contenga de manera fija los electrodos que se van a llevar a cabo en el proceso de la electroforesis, así tan solo tendríamos que retirar una vez fabricado el gel de agarosa el molde con los peines y colocar la carcasa con los electrodos para llevar a cabo la electroforesis. De la manera que está ahora implementado, es necesario ponerte manualmente a colocar los electrodos de manera correcta para que no haya ningún problema.
- **Estructura para incluir el sistema:** Fabricar una estructura, para incluir todas y cada una de las partes y que se viera un sistema estéticamente más llamativo, ocultando la unión de los cables, que en este primer prototipo van situados visiblemente en el montaje.

- **Máscara de soldadura sobre la placa del sensor de conductividad:** Para conseguir con ello que el molde de metacrilato quede bien pegado y no tenga fugas de líquido a causa de que el pegamento no se adhiere bien sobre las dos pistas de cobre que van del sensor de conductividad a los PADS.
- **Eliminar fuente de alimentación de laboratorio:** La idea es sustituir dicha fuente de alimentación por otra más pequeña, que proporcione los 20V para todo el proceso y la corriente necesaria de 1 Amperio, que nos permita hacer el dispositivo más manejable y poder emplearlo en cualquier lugar.

REFERENCIAS

- [1] A. S. R. & J. A. B. Adirana Salazra Montes, Fundamentos y Aplicaciones en las ciencias de la salud, vol. 53, McGraw Hill, 2013.
- [2] Salazar Montes A, Sandoval Rodríguez A, Armendáriz Borunda J., Preparación de un gel de agarosa, McGraw-Hill, 2017.
- [3] Electroforesis en gel (artículo) | Khan Academy, <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>.
- [4] URBANO-GÁMEZ, Jesús David; PERDIGONES, Francisco; QUERO, José Manuel. Semi-Automatic Lab-on-PCB System for Agarose Gel Preparation and Electrophoresis for Biomedical Applications. Micromachines, 2021, vol. 12, no 9, p. 1071.
- [5] PERDIGONES, Francisco. Lab-on-PCB and flow driving: A critical review. Micromachines, 2021, vol. 12, no 2, p. 175.
- [6] E-Gel Power Snap System for Routine Agarose Gel Electrophoresis, https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/e-gel-electrophoresis-system/e-gel-routine-na-electrophoresis.html?ef_id=EAIAIQobChMI85GawuO2-AIVk-d3Ch37KAIHEAAYASAAEgKwwfD_BwE:G:s&s_kwci.
- [7] Sistema de electroforesis para ADN myGel InstaView™, <https://www.medicaexpo.es/prod/benchmark-scientific/product-99480-1001941.html>.
- [8] Sistema de electroforesis MyGel Mini, <https://accuris-usa.com/Products/mygel-mini-electrophoresis/>.
- [9] Sistema de electroforesis en gel de agarosa MBE-150, <https://www.medicaexpo.es/prod/major-science/product-108304-747057.html>.
- [10] Aparato completo del sistema de electroforesis Mupid® One, <https://www.eurogentec.com/en/catalog/mupid-one-electrophoresis-system-complete-apparatus~e60c900e-ad89-45fc-a4a1-a9a8ead4859d>.
- [11] Sistema completo de electroforesis ROTIPHORESE® PROfessional runVIEW, <https://www.carlroth.com/fr/en/rotiphorese-professional/complete-electrophoresis-system-rotiphorese-professional-runview/p/4849.1>.
- [12] Klayout, <https://www.klayout.de/>.
- [13] Nadia E Tolouei , Roya Mazrouei y Mohammad Shavezipur, Sensores tridimensionales basados en impedancia para la detección de productos químicos en soluciones acuosas, <https://www.vibgyorpublishers.org/content/ijabm/ijabm-2-012.php?jid=ijabm>, 2020.

[14] Termistores, <https://es.omega.com/prodinfo/termistores.html#:~:text=facilitar%20la%20soldadura.-,Resistencia%20base,55%20%C2%B0C%20a%20aprox..>

[15] KiCAD, <https://www.kicad.org/>.

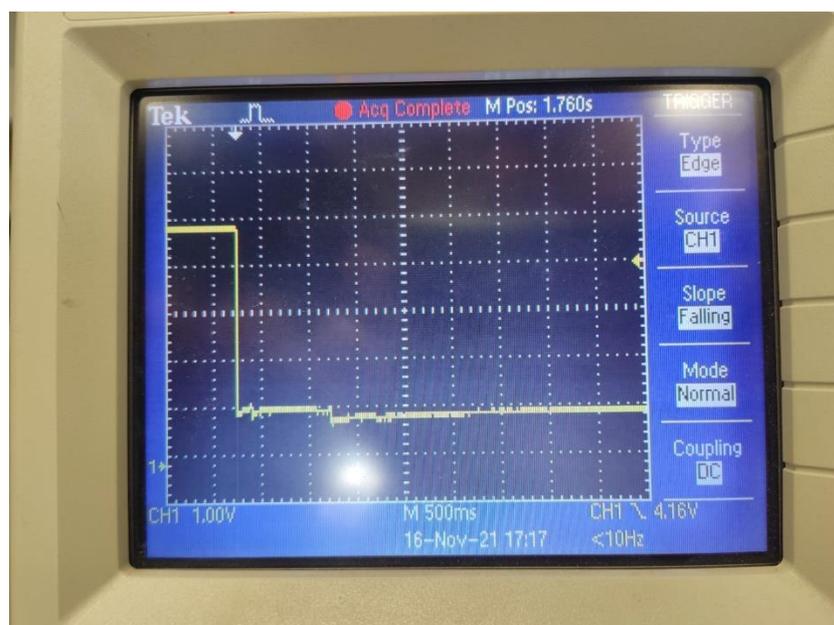
En siguiente capítulo, vamos a mostrar una serie de anexos al proyecto, en el que se recalcarán, por ejemplo, algunos de los modelos y pruebas previos al circuito electrónico definitivo, se indicará en otro anexo el código de Arduino desarrollado para la correcta implementación de las funcionalidades de nuestro proyecto y a su vez, hablaremos en otro anexo del proceso de fabricación llevado a cabo en el laboratorio para la fabricación de todas y cada una de las placas y finalmente, acabaremos mostrando en un último anexo, las pruebas realizadas con ADN de verdad en nuestro dispositivo.

Anexo A: Pruebas realizadas para los distintos sensores de conductividad:

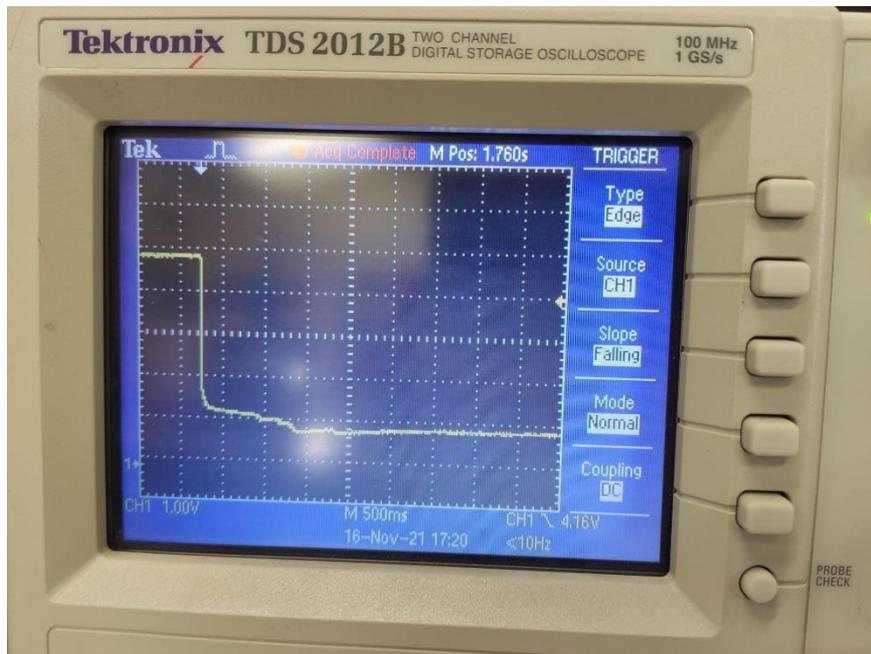
En este primer anexo, vamos a mostrar todas y cada una de las pruebas que se realizaron a cada uno de los sensores de conductividad, para mostrar que su funcionamiento es óptimo y que no es fruto de una simple prueba realizada.

Resultados sensor tamaño 1cmX1cm:

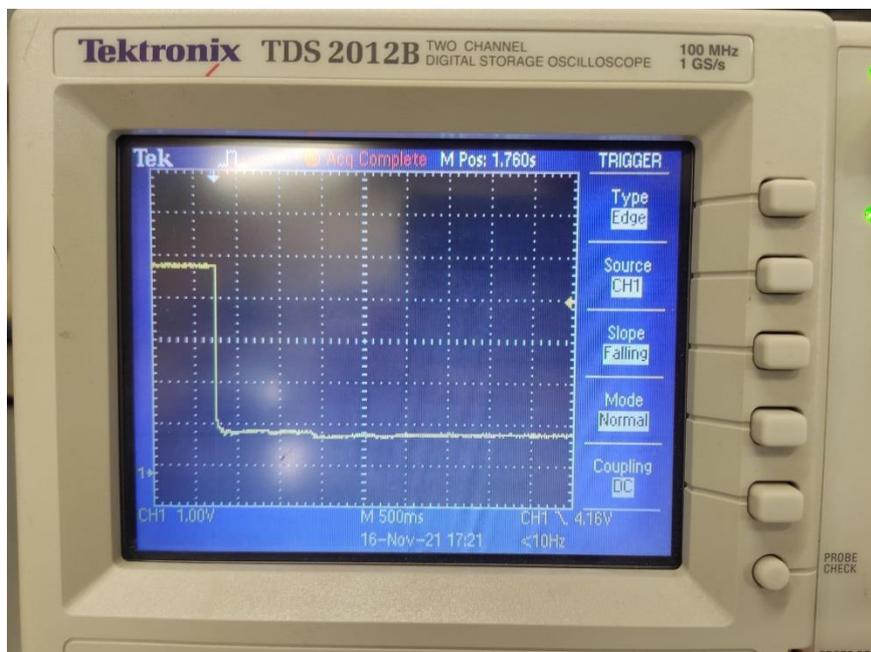
Primera prueba:



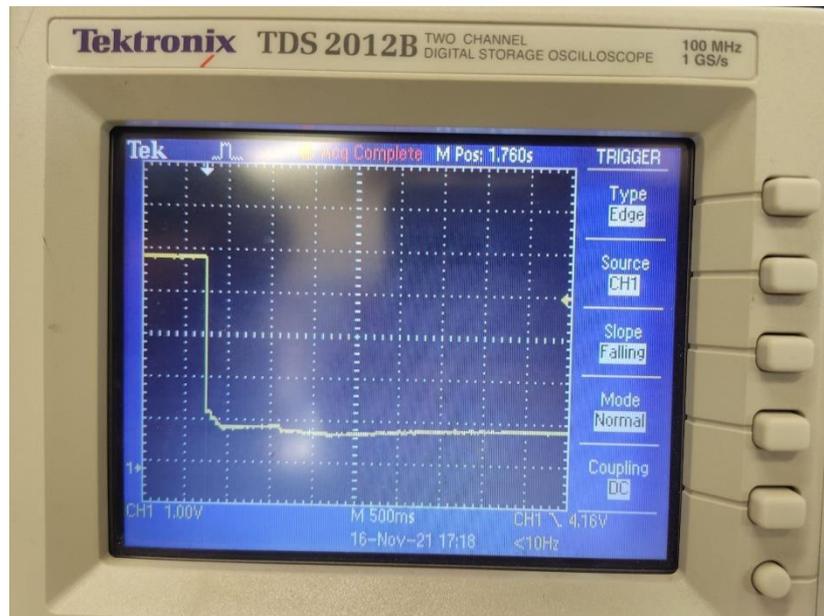
Segunda prueba:



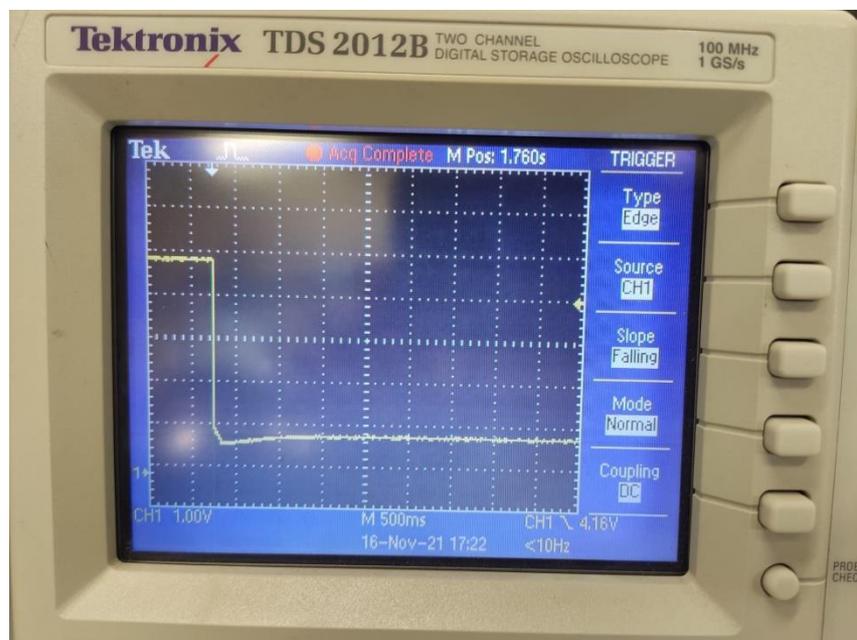
Tercera prueba:



Cuarta prueba:

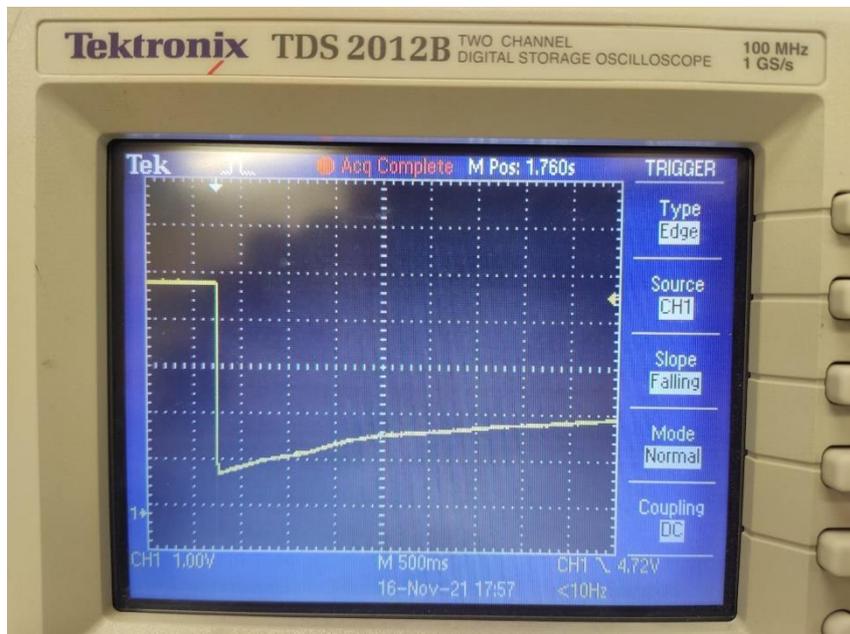


Quinta prueba:

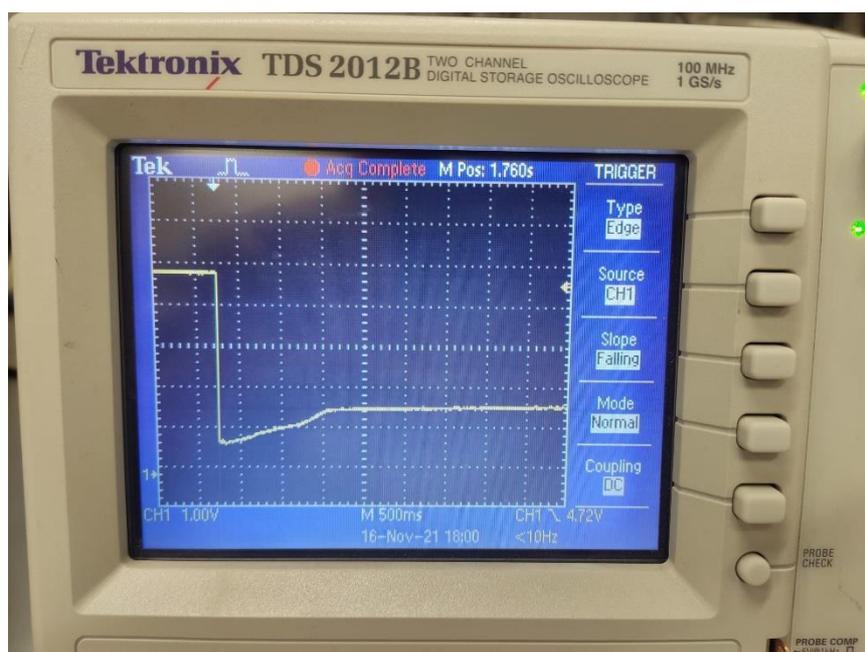


Resultados sensor tamaño 5mmX5mm:

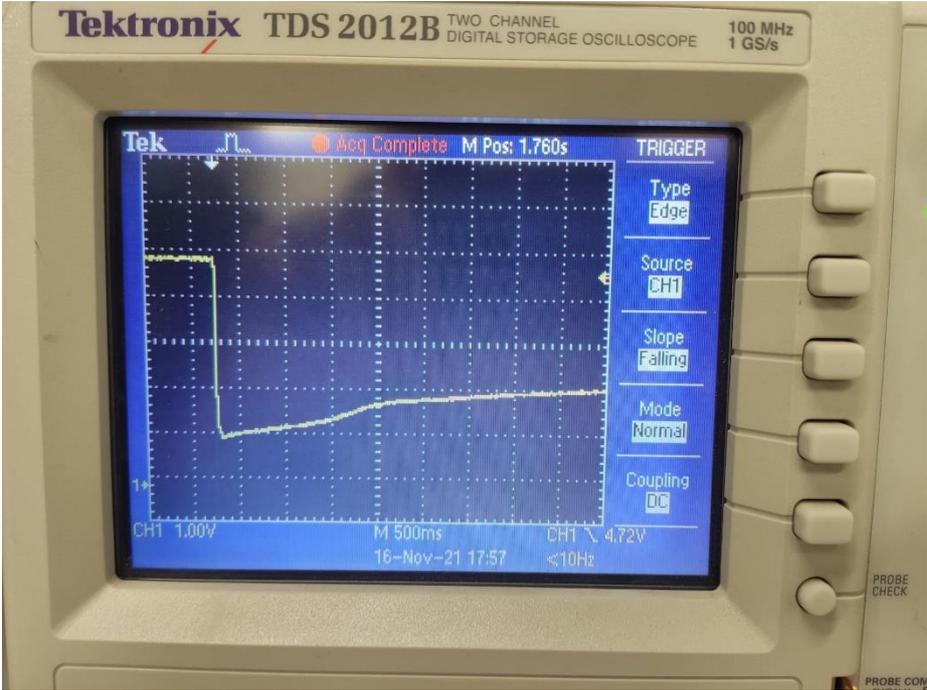
Primera prueba:



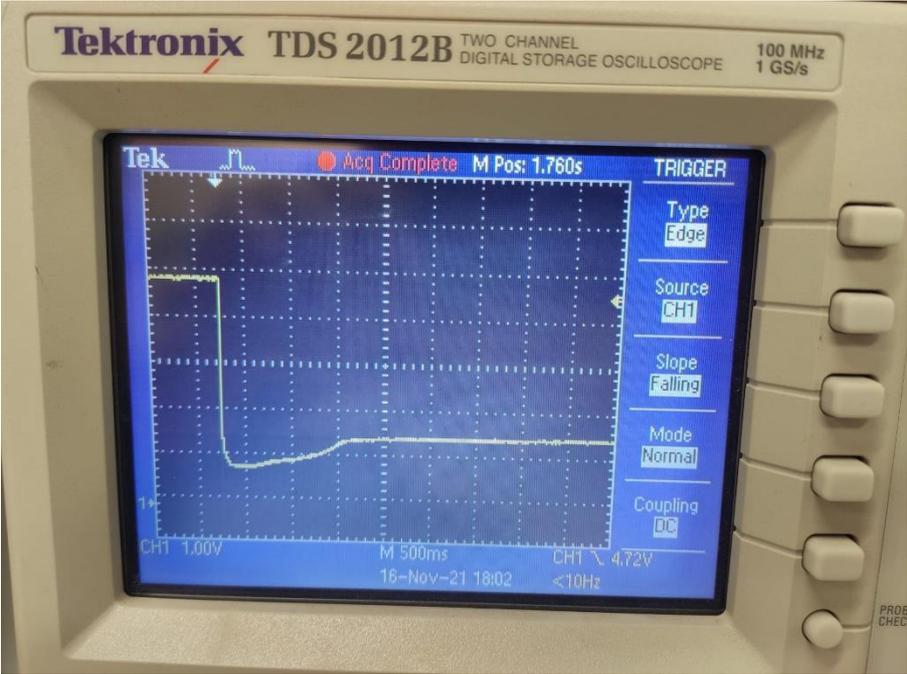
Segunda prueba:



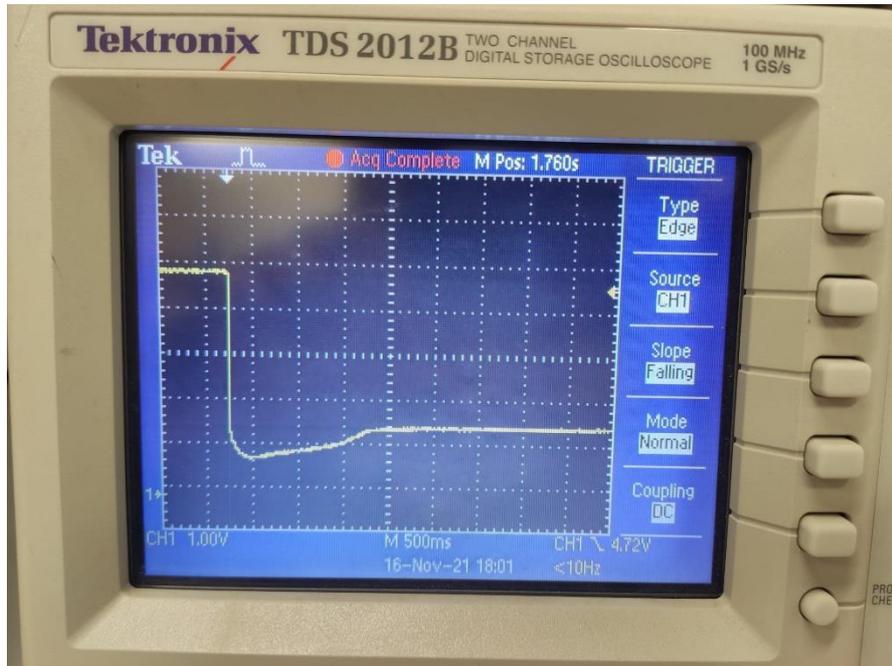
Tercera prueba:



Cuarta prueba:

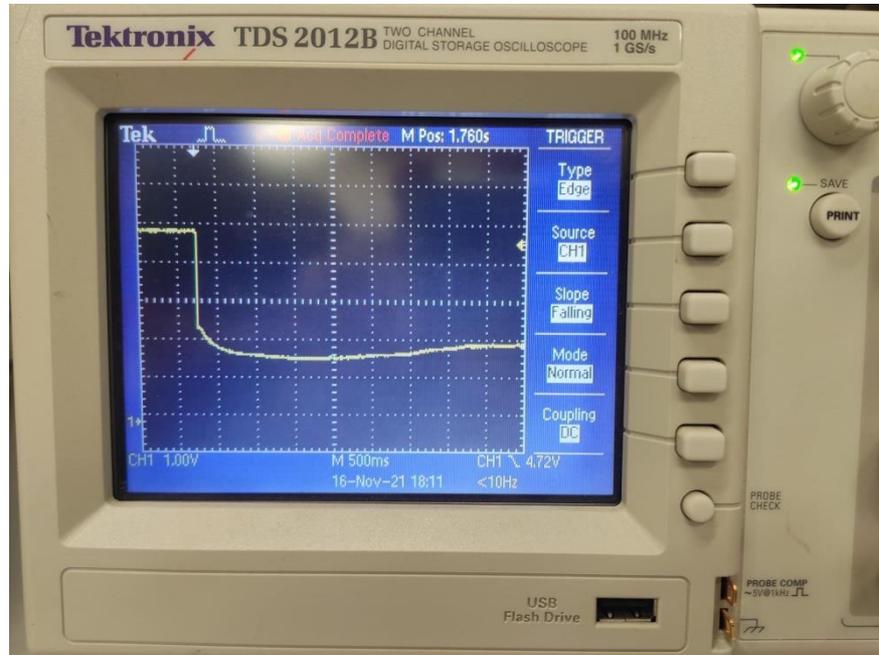


Quinta prueba:

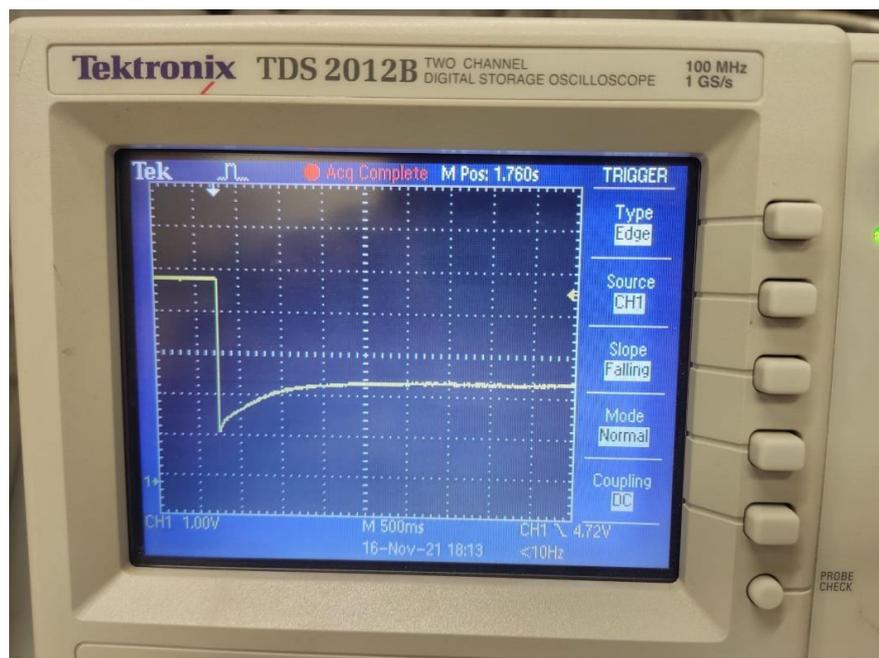


Resultados sensor tamaño 4mmX4mm:

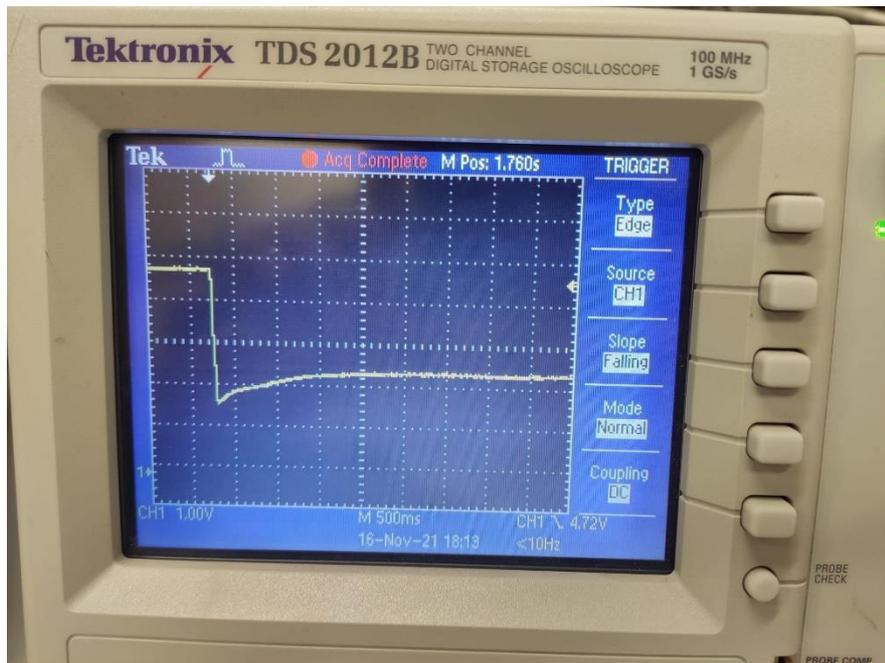
Primera prueba:



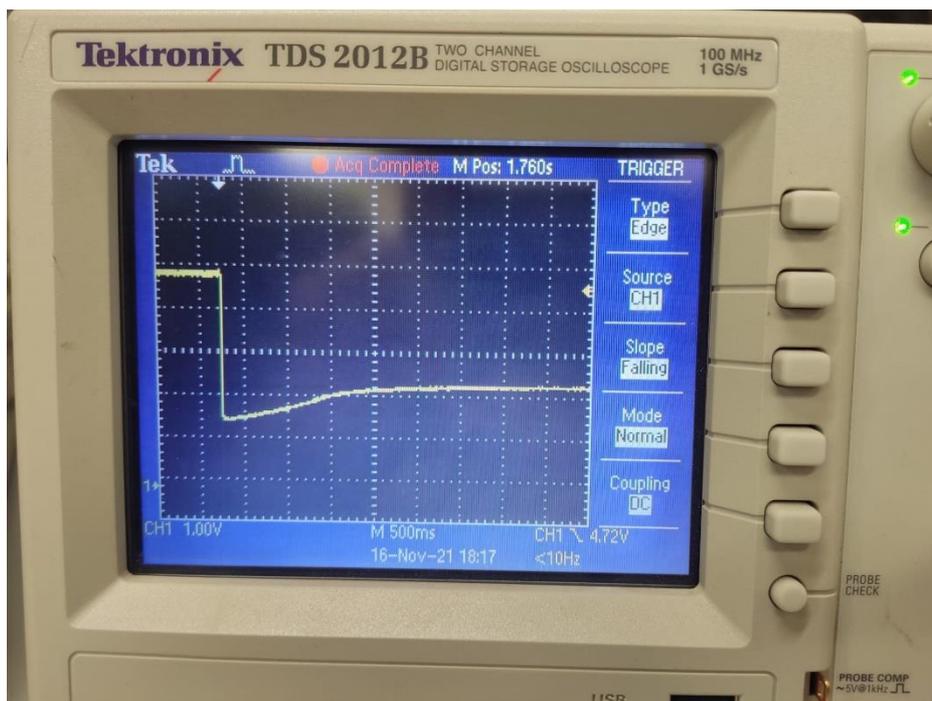
Segunda prueba:



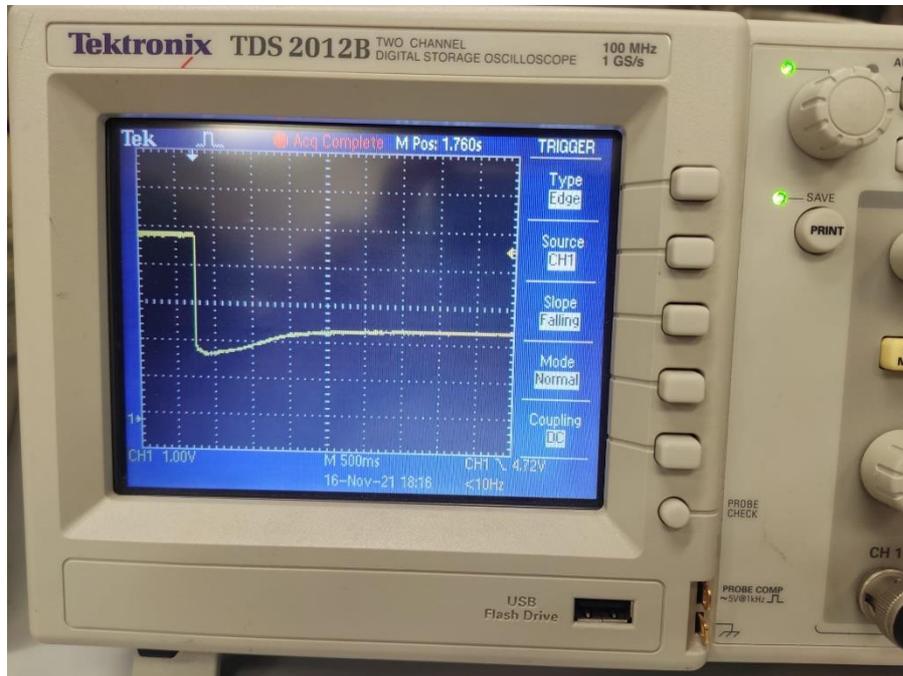
Tercera prueba:



Cuarta prueba:

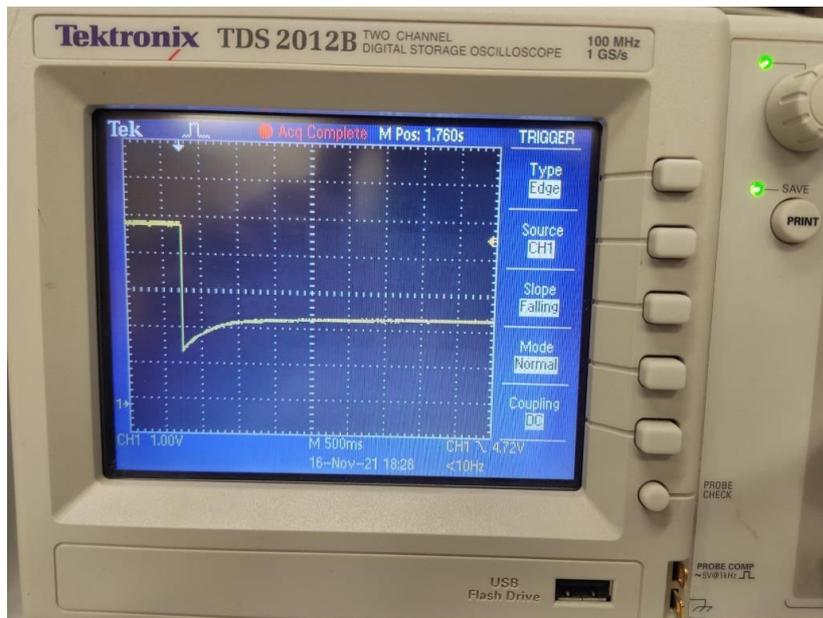


Quinta prueba:

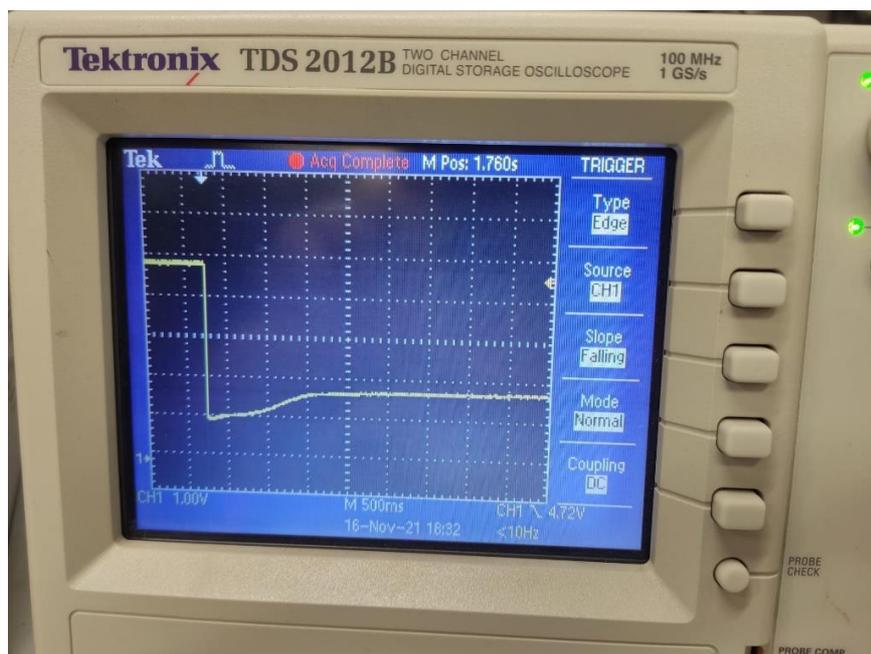


Resultados sensor tamaño 2mmX2mm:

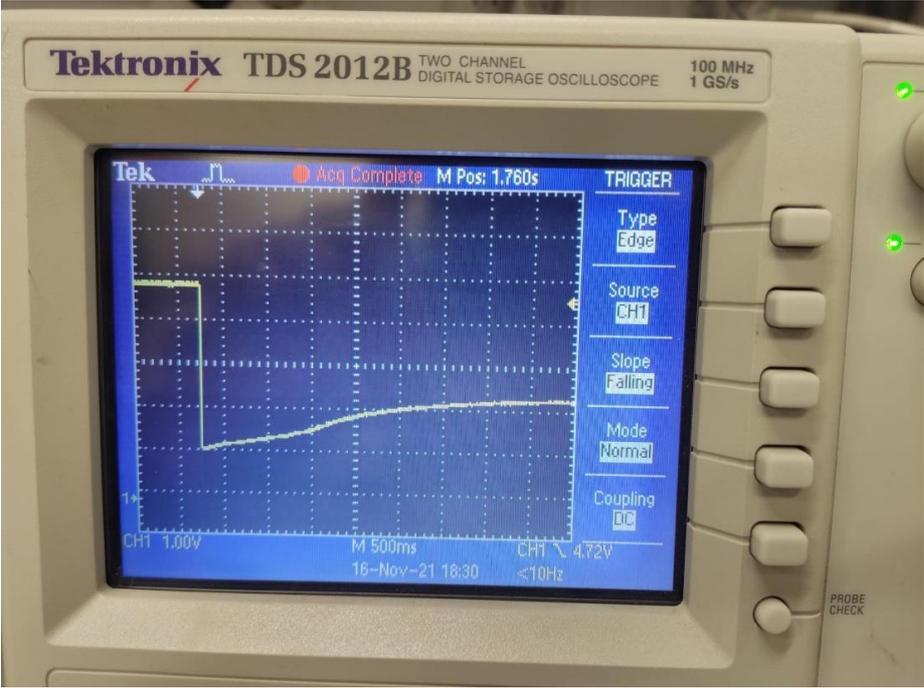
Primera prueba:



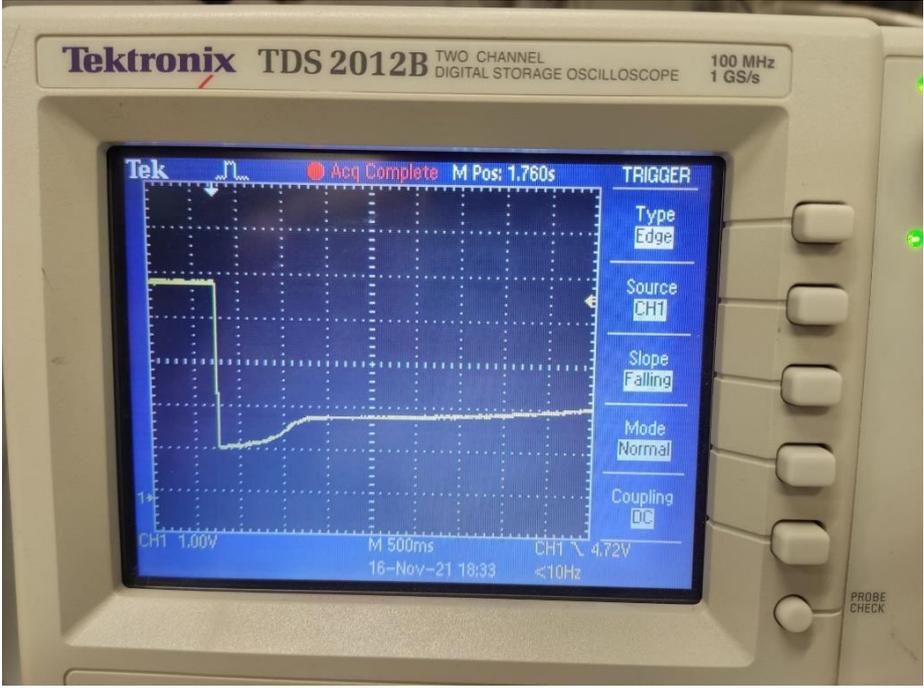
Segunda prueba:



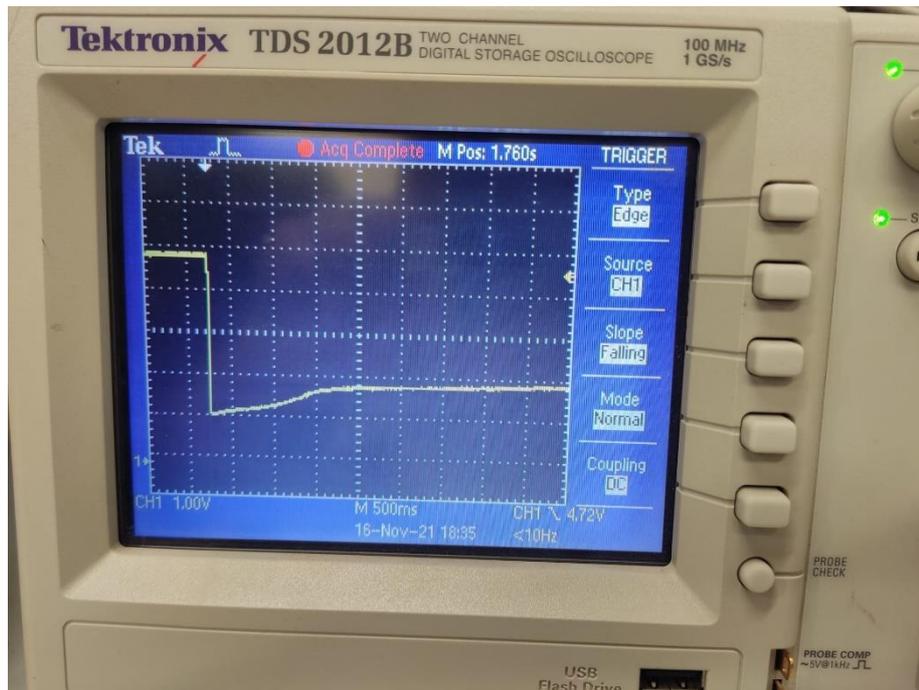
Tercera prueba:



Cuarta prueba:



Quinta prueba:



Resultados sensor tamaño 1mmX1mm:

No se muestran resultados del sensor de 1mmX1mm porque no era lo suficientemente sensible como para detectar cuando recibía el líquido TAE en su superficie.

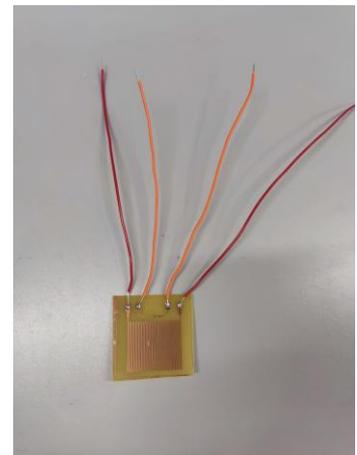
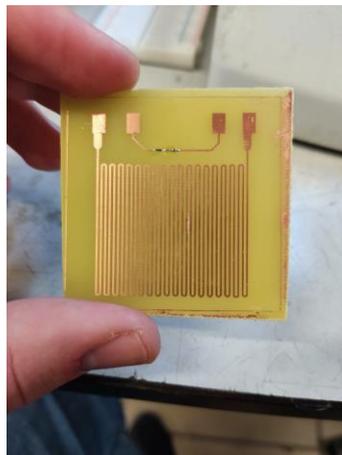
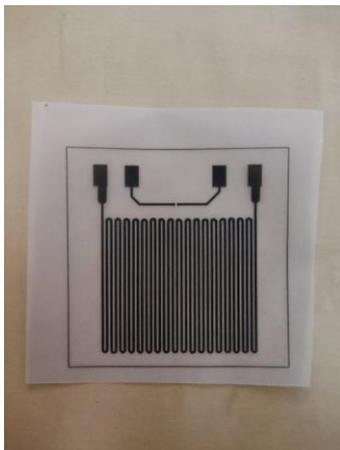
Anexo B: Microcalentador previo al definitivo:

En este anexo, vamos a hablar del modelo de microcalentador diseñado y fabricado previamente al modelo definitivo del mismo. En dicho modelo, podemos apreciar que la resistencia del calentador es inferior a la del modelo definitivo, porque tiene un menor recorrido a la par que unas pistas demasiado gruesas y por esa causa, la corriente que circula por dicho calentador es mucho mayor, provocando con ello un mal control de temperatura. Se necesitaba a su vez una resistencia en serie bastante grande que también calentaba bastante.

Gracias al programa “KICAD” creamos la máscara del microcalentador que probamos en primer lugar antes del definitivo.

La estructura que va a tener el microcalentador es una estructura a modo de serpentin y a su vez, tiene unos PADS asociados para poder soldarle un par de cables que nos servirán para conectarlo finalmente al circuito completo.

A continuación, vamos a mostrar una serie de imágenes en las que se verá la máscara que se diseñó para la fabricación del microcalentador y la placa que se obtuvo como resultado.

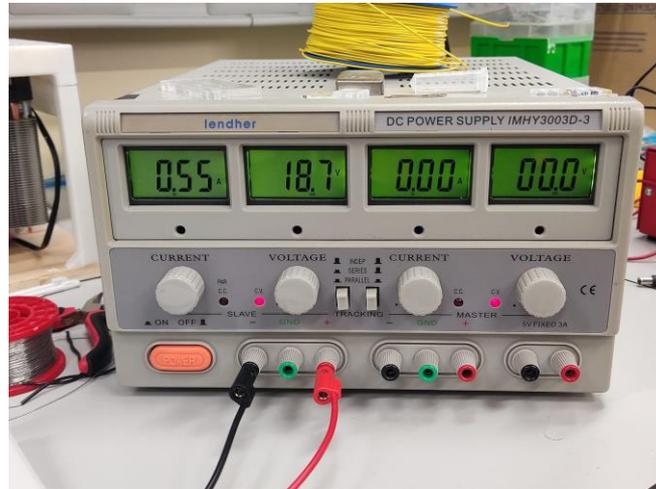


En dichas imágenes, podemos apreciar en primer lugar, la máscara que se empleó para su fabricación, en segundo lugar, el microcalentador resultante que obtuvimos a la hora de fabricar la placa y finalmente el microcalentador completo con la NTC soldada y con los cables soldados a cada uno de los PADS.

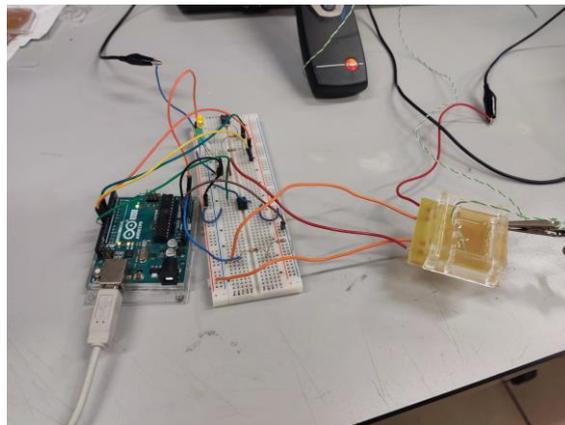
A continuación, después de visualizar las imágenes anteriores, vamos a detallar el tamaño del microcalentador en sí, a la vez que el tamaño de cada una de las pistas y los PADS que forman dicho elemento.

El tamaño del microcalentador concreto es de 3.5cmX3.5cm, las pistas que forman dicho elemento tienen un grosor de 500 μ m con una separación entre las mismas de 500 μ m y el tamaño de los PADS es de 5mmX3mm.

Vamos a resaltar también que el valor resistivo del mismo es de 1.9 Ω y las corrientes que pasan por él tienen un valor máximo de 1.44A.



Para calcular la resistividad, del microcalentador, tan solo tenemos que medir con el multímetro entre sus dos PADS y ver el valor obtenido. Una vez obtenido dicho valor y teniendo la tensión que suministra la fuente sacamos la corriente por la ley de Ohm. Otra manera de hallar los valores es aplicando directamente la ley de Ohm, viendo los valores de tensión y de corriente que entrega la fuente de alimentación y viendo el valor máximo al que podemos alimentar a la par que el valor de corriente que nos está pidiendo, podemos sacar el valor de la resistencia del calentador.



La imagen superior, muestra el conexionado que empleamos para comprobar el funcionamiento del calentador. Una vez comprobado los valores y los resultados que obteníamos de gel de agarosa, decidimos modificar el microcalentador, para hacerlo más eficiente y que gracias a ello, alcanzase las temperaturas de una forma más rápida y a su vez no relentizase tanto el proceso de fabricación.

El estar un tiempo más elevado calentando, provoca que la mezcla se evapore, quedando muy poco gel de agarosa para llevar a cabo el procedimiento completo. Ante esta tesitura, decidimos diseñar un nuevo microcalentador más eficiente, que aplicaremos en el circuito y que funcionará mucho mejor.

Anexo C: Programación de Arduino UNO:

En este anexo, vamos a mostrar el código que hemos diseñado para programar el Arduino UNO, con el fin de llevar a cabo todo el funcionamiento del dispositivo de la manera más autónoma que se nos permite. No vamos a entrar mucho en detalle a la hora de comentar las líneas de código, puesto que en el desarrollo del mismo hay multitud de comentarios que sirven al lector para saber que se está haciendo en todo momento y para que sirva cualquier línea determinada del código.

```
#include <PID_v1.h>

//TIEMPOS//
unsigned long T_agar = 600; //Tiempo de calentado de la agarosa. Alrededor de
los 10 minutos. 10min X (60seg / 1min) = 600seg

//TEMPERATURAS//
double Temp_agar = 100; //Temperatura de la Agarosa

double Setpoint, Input, Output;
double Kp=200,Ki=20,Kd=0; //(Para LoC: 150/10/0) (Previo-PCB-TFG: 80/5/0)
float alfa = 0.05; //Inicialmente este valor va bien, podemos variarlo
durante los experimentos.
float error = 0;
int i = 0;
double medida;
double medidaf = 0;

int R80 = 1330; //Mismos valores que para R95, ya que son muy próximos y no
existe gran diferencia entre R80 y R95
float beta80 = 3445.0; //Mismos valores que para beta95, ya que son muy
próximos y no existe gran diferencia entre beta80 y beta95
float To = 298.15;
int Vcc = 5;
int Ro = 10000; //Se deja así para todos los casos, Ro es fija

//Variables para leer la tensión del sensor de corriente
float lectura_Vsens; //Necesitamos una primera variable de tipo float para
guardar la lectura que haremos en el pin analógico A5. (Nos dará un valor
entre 0 y 1023).
float Vsens_current; //La segunda variable, también será de tipo float y nos
servirá para guardar la conversión de la medida en voltios.

//Variable para evitar que el programa se ejecute indefinidamente
int PARO = 1;

//Variables que se utilizan para cronometrar el tiempo de funcionamiento del
microcalentador
unsigned long InicioTiempo = 0;
unsigned long TomaMedidaTiempo = 0;
unsigned long DiferenciaTiempo;
unsigned long INTERVALO_CALENTADO = 600000; //Si 1 min son 600000
milisegundos, 10 min serán 600000 milisegundos. Ponemos el tiempo en
milisegundos para trabajar con la función "millis()"
int FijarInicioTiempo = 1; //Para que la variable inicio tiempo no se esté
actualizando continuamente, si vale 1 se actualiza, pero si vale 0 deja de
hacerlo.
```

```

PID myPID(&Input, &Output, &Setpoint, Kp, Ki, Kd, DIRECT);

//The setup routine runs once when you press reset:
void setup() {

    myPID.SetSampleTime(10);
    myPID.SetMode(AUTOMATIC);
    Setpoint = Temp_agar;
    //Initialize serial communication at 9600 bits per second:
    Serial.begin(9600); // msp430g2231 must use 4800 (Inicializamos puerto
serie).
    pinMode(7, OUTPUT); //Para encender LED Rojo.
    pinMode(8, OUTPUT); //Para encender LED Verde.
    pinMode(9, OUTPUT); //Para encender LED Amarillo.
    pinMode(11, OUTPUT);
}

void loop() {

    //El ADC interno del microcontrolador tiene una resolución de 10 bits, esto
significa que la tensión analógica de entrada se convierte en un valor
numérico entre 0 y 1023.
    lectura_Vsens = analogRead(A5);
    Vsens_current = lectura_Vsens / 1023 * 5.0;
    //Serial.println(Vsens_current);

    if(Vsens_current <= 3.5 && PARO == 1) //Si la tensión del sensor de
corriente es menor o igual que 3.5V y la variable PARO vale 1, comenzará a
funcionar el calentador, ya que eso quiere decir que se ha detectado líquido
y el código aún no se había ejecutado.
    {
        digitalWrite(8, LOW); //Apagamos LED Verde cuando comenzamos a calentar.
        if(FijarInicioTiempo == 1)
        {
            InicioTiempo = millis();
            FijarInicioTiempo = 0; //Para que no se cumpla la condición y no se
 siga actualizando InicioTiempo.
        }

        TomaMedidaTiempo = millis();

        DiferenciaTiempo = TomaMedidaTiempo - InicioTiempo;
        //Serial.print( "La función tardó:" );
        //Serial.print( DiferenciaTiempo );
        // Serial.println( " ms " );

        float ADC80 = analogRead(A0); //Leemos temperatura80, valor VNTC
        //
        //Calculos para 80°C
        float Vout80=ADC80*5/1023;
        float VNTC80=Vout80;
        float RNTC80 = (VNTC80*R80)/(Vcc-VNTC80);
        float alfa80 = (1000/To)+((1000/beta80)*(log(RNTC80/Ro)));
        float T80 = 1000/alfa80 - 273.15;

        if(T80 >= Temp_agar-2)
        {
            digitalWrite(7, HIGH); //Encendemos LED Rojo cuando la temperatura ha
llegado a los 98 grados.
        }
}

```

```

    else
    {
        digitalWrite(7, LOW); //No encendemos LED Rojo porque la temperatura
no ha llegado a los 98 grados.
    }

    medida = T80; //Medida va a guardar el valor de temperatura calculado
previamente en unidades de temperatura y no de ADC
    medidaf = medida*alfa + (1-alfa)*medidaf;
    Input = medidaf;
    error = Setpoint - medidaf;

    myPID.Compute();
    analogWrite(11, Output);
//    Serial.print(81);
//    Serial.print(",");
//    Serial.print(80);
//    Serial.print(",");
//    Serial.print(T80-2.44);
//    Serial.print(",");
//    Serial.print(79);

    Serial.print(Setpoint);
    Serial.print(",");
//    Serial.print(error);
//    Serial.print(",");
    Serial.println(Input);
    delay(10);

    if(DiferenciaTiempo >= INTERVALO_CALENTADO)
    {
        //digitalWrite(11, LOW); //Después de 10 minutos de calentado,
apagamos el microcalentador.
        myPID.SetMode(MANUAL);
        Output = 0;
        if (T80 > 35 && T80 <= Temp_agar-2)
        {
            digitalWrite(9, HIGH); //Encendemos LED amarillo cuando la
temperatura se encuentra entre 35 y 98 grados.
        }
        else if (T80 <= 35)
        {
            PARO = 0;
            digitalWrite(9, LOW); //Apagamos LED amarillo cuando la temperatura
baja de 35 grados.
            while(PARO == 0)
            {
                digitalWrite(8, HIGH); //Encendemos LED Verde después de los 10
minutos de calentado, cuando la temperatura empieza a bajar y a aproximarse a
los 25 grados.
            }
        }
        Serial.print(Setpoint);
        Serial.print(",");
        Serial.print(PARO);
        Serial.print(",");
        Serial.println(Input);
    }
}
else //En caso de que la tensión del sensor no sea menor o igual a 3.5V,
no ocurrirá nada y el calentador seguirá apagado.

```

```
{
  digitalWrite(11, LOW);
  digitalWrite(8, HIGH); //Encendemos LED Verde siempre antes de
calentar, señal de que el sistema está listo.
}
```

Anexo D: Proceso fotolitográfico para la fabricación de las placas electrónicas del proyecto:

Una vez finalizado el proceso de diseño mediante software de cada uno de los circuitos que van a englobar nuestro sistema, pasamos al proceso de fabricación de todos y cada uno de ellos de forma manual.

Concretamente, para nuestro proyecto vamos a emplear un proceso fotolitográfico. Una vez diseñado el fotolito, lo imprimimos en papel transparente (para ello hemos empleado papel vegetal) y dicho dibujo se transfiere a una placa de fibra de vidrio (u otra sustancia que sirva de soporte rígido) recubierta de una capa de cobre y sobre ésta una película fotosensible.

El material necesario para la fabricación de todos los circuitos que tenemos es el siguiente:

- Placa PCB, una cara (excepto la del sensor de conductividad que es a doble cara).
- Insoladora UV.
- Líquido revelador para PCB.
- Agua oxigenada.
- Agua fuerte.
- Agua del grifo (para suavizar el líquido atacante (Agua oxigenada + Agua fuerte)).
- Acetona industrial.
- Taladradora (para hacer los taladros a la placa general el sistema, las demás no llevan).

Una vez impreso el circuito en papel vegetal, procederemos a colocarlo encima de la parte de cobre de la PCB, para a continuación, aplicar un vacío en torno a 0.8atm y dejaremos la aisladora en funcionamiento un tiempo aproximado entre 1-2 minutos (generalmente será minuto y medio). Los rayos UV de la aisladora, eliminan la resina que cubre la cara fotosensible de la placa positiva, en aquellas zonas que están directamente expuestas a la luz.



Aquí podemos apreciar la aisladora UV que tenemos en el laboratorio, con la que se ha trabajado para fabricar todas las placas electrónicas del dispositivo que estamos llevando a cabo.

Una vez sacada la placa de la aisladora, se podrá apreciar con el reflejo de la luz, como las zonas cubiertas por el dibujo en papel vegetal tienen un color ligeramente diferente al resto de la placa.

Después de esto, pasamos a revelar la PCB con el líquido revelador. Para ello, sumergimos la placa en el líquido revelador que hemos preparado, dicho líquido actuará de capa protectora sobre las zonas de la placa que no han sido aisladas, evitando que, en un paso posterior, el ácido ataque y elimine el cobre que hay en ellas.

Pasados unos minutos, podremos observar como el líquido revelador, va intensificando su color a medida que la placa se va desprendiendo de su resina hasta hacerse visibles las zonas que han conservado la resina.

Una vez hecho esto, sacamos la placa del líquido revelador y la enjuagamos con agua del grifo, para posteriormente secarla con papel.

Una vez comentado lo anterior, sumergimos la placa en la bandeja del líquido atacante, el ácido que ésta contiene atacará y disolverá en unos minutos el cobre de las zonas que no han sido protegidas por el líquido revelador.

Finalmente, tan solo nos quedará enjuagar bien la placa ya revelada y secarla bien.



En la imagen previa, podemos observar como es el líquido revelador de PCB (izquierda) y el líquido atacante (derecha).

Tras el revelado de la PCB, sobre el circuito impreso aún permanece una capa de resina que protege al cobre de la oxidación. Esta capa nos impide soldar las pistas de cobre con los componentes del circuito o los cables que van a cada uno de los PADS, por lo que debemos proceder a su eliminación mediante el uso de acetona.

El siguiente paso (solo para la placa general que es la que necesita soldar componentes) será taladrar los PADS de cada uno de los componentes que componen la placa general del dispositivo. Estos PADS se corresponden con las patas de cada uno de los componentes que se incluyen en la placa.

Una vez hecho todo lo anterior, pasamos al proceso de soldadura. Para llevar a cabo todas y cada una de las soldaduras, se va a utilizar estaño.

Una vez acabadas todas las soldaduras, podemos dar por concluido el proceso de fabricación, aunque siempre es recomendable hacer comprobaciones antes de la puesta en funcionamiento del circuito, para evitar que haya cortos o malos contactos entre los componentes, debido a una mala soldadura.

Dichas comprobaciones se han realizado con un multímetro, comprobando continuidad, con el objetivo de comprobar una correcta conexión de todos los componentes.

Anexo E: Pruebas realizadas con ADN:

Para no extender mucho la memoria, decidimos incluir en un anexo las pruebas que se realizaron en el dispositivo con ADN de verdad y no con tinta como mostramos en la memoria del proyecto.

A continuación, se va a mostrar el resultado de realizar la electroforesis a ADN de verdad y se indicará al final como se vería todo con la incidencia de la luz ultravioleta sobre el gel con el ADN migrado.

Imagen del ADN recién vertido en los pocillos:

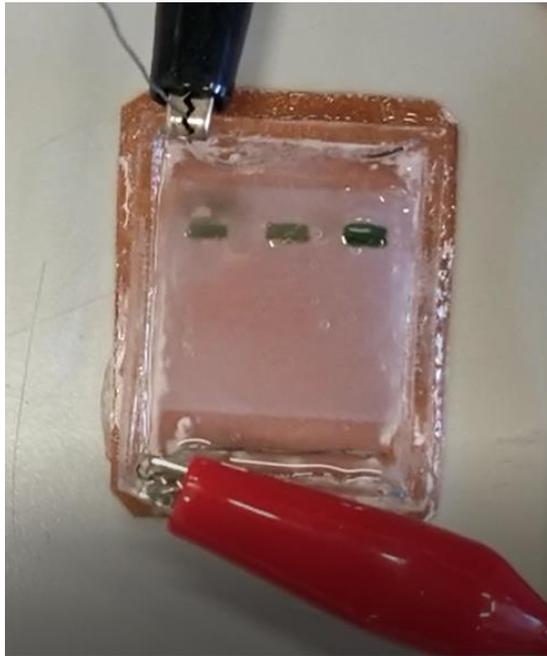


Imagen del ADN después de 2 minutos de electroforesis:



Imagen del ADN después de 4 minutos de electroforesis:

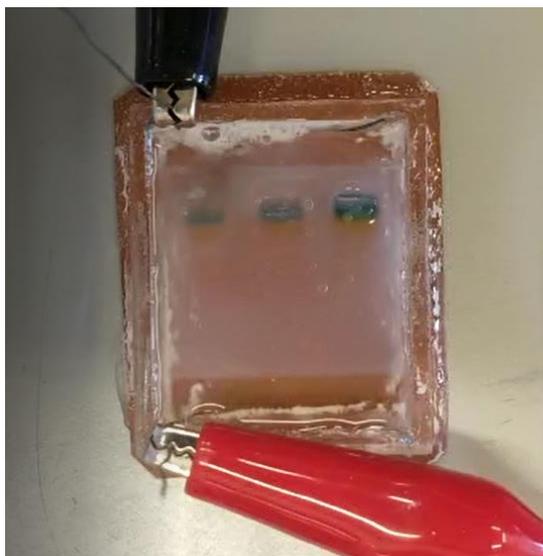


Imagen del ADN después de 6 minutos de electroforesis:



Imagen del ADN después de 8 minutos de electroforesis:



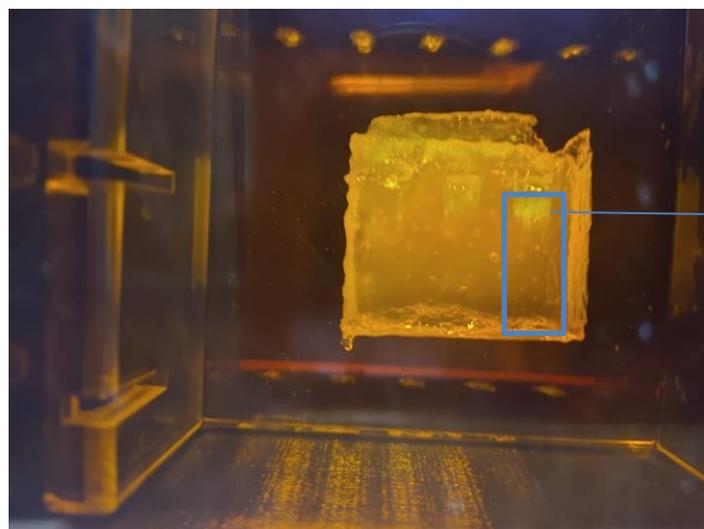
Imagen del ADN después de 10 minutos de electroforesis:



Imagen del ADN después de 12 minutos de electroforesis:



Imagen final del proceso después de aplicarle luz ultravioleta:



Ahí se puede apreciar como la banda de ADN a medida que se va migrando, va hacia abajo.

Para concluir, se ve como a lo largo del tiempo, en las sucesivas imágenes, la migración se realiza de forma eficiente y en la última imagen con la incidencia de la luz ultravioleta, podemos apreciar bandas hacia abajo del gel, de un color fosforescente, señal de que el ADN se ha estado migrando del polo negativo al positivo del gel, teniendo una mayor velocidad las partículas pequeñas que las grandes, ya que estas encuentran una mayor dificultad para atravesar el gel.