

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Química

Diseño y desarrollo de un sensor inteligente para la detección de bacterias en fluidos

Autor: Ana Belén Ortiz Flores

Tutores: Laura M^a Roa Romero

David Naranjo Hernández

Dep. Teoría de la Señal y Comunicaciones
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2016



ciber-66n

Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería Química

Diseño y desarrollo de un sensor inteligente para la detección de bacterias en fluidos

Autor:

Ana Belén Ortiz Flores

Tutores:

Laura M^a Roa Romero

Catedrática de Universidad

David Naranjo Hernández

Dep. de Teoría de la Señal y Comunicaciones

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2016

Trabajo Fin de Grado: Diseño y desarrollo de un sensor inteligente para la detección de bacterias en fluidos

Autor: Ana Belén Ortiz Flores

Tutores: Laura M^a Roa Romero
David Naranjo Hernández

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

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2016

El Secretario del Tribunal

*A todos los que me han
acompañado en este camino*

Agradecimientos

Agradezco a la Catedrática Dña. Laura María Roa Romero por permitirme llevar a cabo este estudio y de ese modo tener mi primer contacto con la Ingeniería Biomédica, lo que ha creado en mí gran interés por seguir aprendiendo y desarrollándome en esta área científica.

A David Naranjo Hernández le agradezco enormemente su gran ayuda; para hacerme entender lo que para mí era casi desconocido, por su amabilidad y disposición ante mis dificultades durante el desarrollo de este trabajo, y por guiarme hasta el final del mismo de la mejor forma.

Infinitas gracias a mis padres, Carmen y Manuel, por brindarme la oportunidad de llegar hasta aquí, ayudándome a crecer profesional y personalmente, apoyándome incondicionalmente en todos estos años.

Gracias a ti, Pablo, que llegaste cuando estaba cerca de la meta, pero cuando más impulso necesitaba.

Gracias a todas las personas maravillosas que he conocido durante estos años, son la asignatura que jamás olvidaré.

No puedo olvidar agradecerles a mis amigos, los de siempre. Los que no han dejado de apoyarme y felicitarme ante cada adversidad o triunfo en esta andadura.

Ana Belén Ortiz Flores

Sevilla, 2016

La enfermedad renal crónica (ERC), es la situación en la cual los riñones son insuficientes para mantener de manera adecuada la función renal en un largo periodo de tiempo, manifestándose como insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en su umbral más grave. La medida subsidiaria ante la IRCT, es un tratamiento sustitutivo mediante diálisis o trasplante renal.

En la práctica de medidas subsidiarias existen riesgos de infección, entre otros. En pacientes sometidos a tratamientos de diálisis es común que se produzcan complicaciones como infecciones bacterianas.

Las medidas actuales, basadas en técnicas tradicionales de cultivo, microscopía o citometría de flujo y pruebas bioquímicas, para la detección de esta patología presentan desventajas, ya que requieren: largos tiempos de ensayos, laboratorios especializados, instrumentación costosa y personal capacitado.

Ante la duda de padecer cualquier infección, el paciente debe buscar atención de especialistas con la mayor brevedad posible, ya que el tiempo es muy importante en el pronóstico de la enfermedad. Provocando esta situación, en muchos casos, perjuicio al paciente y al sistema sanitario debido a la saturación en centros hospitalarios.

Valorando esta problemática, surge la necesidad de encontrar un dispositivo capaz de detectar bacterias en un fluido que permita accesibilidad a todo tipo de usuarios. Teniendo en cuenta el auge de las TIC (Tecnologías de la Información y la Comunicación) en los últimos años, se debe hacer especial hincapié en las nuevas herramientas utilizadas en el entorno sanitario, como e-Salud. Este conjunto de herramientas se emplean en materia de prevención, diagnóstico, tratamiento, seguimiento, así como en la gestión de la salud, ahorrando costes al sistema sanitario y mejorando la eficacia de este.

En este Trabajo Fin de Grado se ha hecho una revisión de las técnicas de detección de bacterias, actuales y en fase de estudio, con el fin de encontrar una alternativa a los métodos tradicionales. Teniendo en cuenta las ventajas proporcionadas por la tecnología capacitiva, se decide desarrollar un sensor en base a esta. Partiendo de una adaptación de un dispositivo previo, cedido por el Grupo de Investigación de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Sevilla; se realiza una optimización de este dispositivo, se adapta con la parametrización adecuada de sus componentes, se desarrolla un sistema para la medición de respuesta y colocación óptima de electrodos, y se realizan varias pruebas experimentales en una bolsa de drenado, utilizada en tratamientos de diálisis. Las pruebas se hacen con dos disoluciones distintas, compuestas por agua destilada y solución de diálisis, con adición de diversas sustancias con distintas propiedades, variando su concentración.

Los resultados obtenidos indican que disoluciones con diferentes sustancias y concentraciones, modifican la capacidad del circuito y permiten detectar sustancias en todo el rango de frecuencia. En las distintas disoluciones, realizando la misma prueba con cada sustancia, se muestran discrepancias debido a la composición de la solución de diálisis y la del agua destilada. Pero los resultados obtenidos permiten comprobar buena sensibilidad, en fluidos con contenido en sales y a fluidos con distinto pH.

En este trabajo, se ha logrado una primera aproximación para la implementación de un sensor para la detección de bacterias en pacientes sometidos a diálisis con posibilidad de padecer infecciones, y se propone seguir trabajando para obtener mejores resultados y un dispositivo eficaz.

Chronic kidney disease (CKD), is the situation in which the kidneys are insufficient to adequately maintain renal function over a long period of time, manifesting as chronic renal disease (ESRD) in its most severe threshold. The subsidiary measure before the IRCT, is a dialysis therapy or kidney transplantation.

In the practice of subsidiary measures there are risks of infection, among others. In patients undergoing dialysis treatments is common complications such as bacterial infections occur.

Current measures, based on traditional farming techniques, microscopy or flow cytometry and biochemical tests for the detection of this disease have disadvantages as they require: long time trials, specialized laboratories, expensive instrumentation and trained personnel.

Uncertain suffering from any infection, the patient should seek specialist care as soon as possible, because time is very important in the prognosis of the disease. Causing this situation, in many cases, prejudice the patient and the health system due to saturation in hospitals.

Valuing this problem, the need to find a device capable of detecting bacteria in a fluid that allows accesibiliad to all users. Given the rise of ICT (information and communications technology) in recent years, we should make special stress upon new tools used in the healthcare environment, such as e-Health. This set of tools used in the prevention, diagnosis, treatment, monitoring and management of health, saving costs to the health system and improving the effectiveness of this.

In this Final Project it has done a review of techniques for detecting bacteria, current and under study in order to find an alternative to traditional methods. Given the benefits provided by the capacitive technology, it is decided to develop a sensor based on this. Based on an adaptation of a previous device, provided by the Research Group of Biomedical Engineering at the University of Seville; optimization of this device is performed, adapts the adequate parameters of its components, a system for measuring response and optimal placement of electrodes develops, and several experimental tests are performed in a drainage bag, used in dialysis treatments . Tests were made with two different solutions, composed of distilled water and dialysis solution with the addition of various substances with different properties, varying in concentration.

The results indicate that solutions with different substances and concentrations, modify the ability of the circuit and can detect substances in the entire frequency range. In the various solutions, performing the same test with each substance shown discrepancies due to the composition of the dialysis solution and distilled water. But the test results allow good sensitivity in fluids containing salts and fluids with different pH.

In this work, there has been a first approach to the implementation of a sensor for detecting bacteria in patients undergoing dialysis chance of developing infections, and intends to continue to work for better results and effective device.

Agradecimientos	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Índice	xv
Índice de Tablas	xvii
Índice de Figuras	xix
1 Introducción	1
1.1 <i>Hipotesis y objetivos</i>	3
1.2 <i>Estructura de la memoria</i>	4
2 Materiales y Método	5
2.1 <i>Requisitos de diseño</i>	5
2.2 <i>Metodología</i>	5
3 Estado del arte en la detección de bacterias	9
3.1 <i>Importancia de detección bacteriana precoz en pacientes renales</i>	9
3.2 <i>Tecnologías actuales de detección bacteriana en pacientes renales</i>	9
3.3 <i>Sistemas de detección de bacterias</i>	11
3.3.1 <i>Métodos de detección convencionales</i>	11
3.3.2 <i>Biosensores</i>	12
3.4 <i>Tecnología de sensorización capacitiva</i>	25
3.4.1 <i>Sensores capacitivos</i>	26
3.4.2 <i>Sensores capacitivos basados en oscilador</i>	27
3.4.3 <i>Elección de circuito oscilador para el estudio</i>	31
4 Resultados	33
4.1 <i>Resultados de simulación</i>	33
4.2 <i>Resultados de diseño</i>	39
4.3 <i>Resultados experimentales</i>	41
5 Conclusiones	53
Referencias	55
Anexo A	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2–1 Composición de la solución de diálisis PHYSIONEAL 35	7
Tabla 2–2 Composición de la solución de diálisis PHYSIONEAL 35	7
Tabla 3–1 Biosensores para la determinación de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
Tabla 3–2 Biosensores para la determinación de <i>Streptococcus aureus</i>	14
Tabla 4–1 Análisis de la influencia de R3 en el circuito	35
Tabla 4–2 Análisis de la influencia de L en el circuito	35
Tabla 4–3 Análisis de la influencia de C1 en el circuito	36
Tabla 4–4 Análisis de la influencia de C4 en el circuito	37
Tabla 4–5 Análisis de la influencia de C4 en el circuito	37
Tabla 4–6 Análisis de la influencia de C2 en el circuito	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Procesos de difusión y osmosis en diálisis [4].	2
Figura 2-1. Bolsa con solución de diálisis PHYSIONEAL 35	8
Figura 3-1. Disposición de las capas en estado normal.	15
Figura 3-2. Orientación del electrón cuando se aplica un campo magnético externo.	15
Figura 3-3. Gráfico obtenido en el test de sensibilidad del sensor GMR.	16
Figura 3-4. Dispositivo experimental.	16
Figura 3-5. Diagrama esquemático del sensor capacitivo CMOS.	17
Figura 3-6. Sección transversal de la interfaz sensorial.	18
Figura 3-7. Representación esquemática del CBCM.	18
Figura 3-8. Estructura de un bacteriófago.	18
Figura 3-9. Método de detección de capacitancia mutua.	19
Figura 3-10. Método de detección de auto capacitancia.	20
Figura 3-11. Procedimiento de dilución utilizando TSB.	20
Figura 3-12. Respuesta del sensor táctil en el contador RAW con el aumento de volumen.	21
Figura 3-13. Respuesta del sensor táctil en el contador RAW al líquido E.coli en diferentes concentraciones y al medio de cultivo.	21
Figura 3-14. Respuesta del sensor táctil en el contador RAW a muestra de orina mezclada con E.coli.	22
Figura 3-15. Proceso de fabricación del electrodo IDT.	23
Figura 3-16. Miniatura del sensor tipo película delgada basado en el sensor interdigital.	23
Figura 3-17. Impedancia característica del sensor interdigital con APTES y PmB.	24
Figura 3-18. Vista esquemática de la disposición de las bacterias en el electrodo.	25
Figura 3-19. Capacitancia según diámetro de bacteria.	25
Figura 3-20. Esquema electrodos.	26
Figura 3-21. Ejemplos de aplicación para sensores capacitivos.	27
Figura 3-22. Esquema partes de un sensor capacitivo.	28
Figura 3-23. Circuito para un oscilador discreto de Pierce de 1MHz.	29
Figura 3-24. Circuito para un oscilador de Pierce IC.	29
Figura 3-25. Circuito tanque LC: acción del oscilador y efecto del volante.	30
Figura 3-26. Forma de onda de salida	30
Figura 3-27. Esquemático del oscilador Colpitts	31
Figura 4-1. Esquema del circuito con oscilador de Colpitts	33
Figura 4-2. Esquemático del circuito con oscilador de Colpitts en Orcad Capture	34
Figura 4-3. Prototipo del circuito	39

Figura 4-4. Fresadora automática ProtoMatS62	39
Figura 4-5. Circuito impreso con pines soldados	40
Figura 4-6. Adaptación final del circuito conectado a la placa PIC32-PINGÜINO-OTG	40
Figura 4-7. Bolsa de desecho con agua destilada y electrodos conectados	41
Figura 4-8. Gráfico de la frecuencia obtenida añadiendo sal en distintas proporciones	42
Figura 4-9. Frecuencia medida en agua destilada frente a disolución con sal	43
Figura 4-10. Frecuencia medida en agua destilada frente a disolución con azúcar	43
Figura 4-11. Frecuencia medida en agua destilada frente a disolución con leche	44
Figura 4-12. Disolución agua destilada y urea	45
Figura 4-13. Disolución agua destilada y vinagre	46
Figura 4-14. Disolución de solución de diálisis y sal común	47
Figura 4-15. Disolución de solución de diálisis y azúcar	48
Figura 4-16. Disolución de solución de diálisis y leche	49
Figura 4-17. Disolución de solución de diálisis y vinagre	50
Figura 4-18. Disolución de solución de diálisis y urea	51

1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC), es la situación en la cual los riñones son insuficientes para mantener de manera adecuada la homeostasis del medio interno a causa de una lesión estructural irreversible presente en un largo periodo de tiempo (más de tres meses).

Los primeros síntomas pueden ser similares a los de otras muchas enfermedades menos serias, por ello es necesario realizar varios exámenes y pruebas médicas para asegurar la presencia de la enfermedad.

La ERC es un problema de salud pública. La manifestación más grave de la ERC, la insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) que es subsidiaria de tratamiento sustitutivo mediante diálisis o trasplante renal, presenta una incidencia y una prevalencia crecientes desde hace dos décadas [1].

Cuando se habla del IRCT, se refiere a la necesidad de comenzar tratamiento sustitutivo de la función renal y se corresponde en la clasificación con ERC estadio 5.

La hemodiálisis (HD) es uno de los tratamientos sustitutivos de la función renal. La hemodiálisis convencional se basa en el transporte por difusión, la hemofiltración en el transporte convectivo y la hemodiafiltración combina ambas. Siempre que sea posible, se accederá mediante fístula arterio/venosa en muñeca no dominante. Consiste en técnicas continuas de lenta eficacia para pacientes inestables y técnica convencional intermitente en pacientes estables y a largo plazo. No tiene contraindicaciones aunque pueden darse complicaciones [2].

La diálisis peritoneal es otra de las alternativas de tratamiento sustitutivo de la función renal. Es un método que se utiliza para extraer las impurezas y los líquidos de la sangre, en pacientes con insuficiencia renal aguda y crónica; se utiliza como membrana dializante el propio peritoneo del paciente, que se considera un filtro natural [3]. El peritoneo es la membrana que cubre la mayor parte de los órganos del abdomen.

Hay dos modalidades:

- Diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA): el más usado. El paciente cada 6 horas vacía la cavidad peritoneal (líquido sucio) y reemplaza el dializado. Los intercambios son continuos y el peritoneo nunca está vacío. No requiere equipo de diálisis.
- Diálisis peritoneal automatizada (DPA): con recambios nocturnos por equipo automatizado.

La diálisis peritoneal (DP), es una operación basada en la combinación de difusión y ósmosis. La difusión es el movimiento de partículas a través de una membrana semipermeable, desde una zona de mayor concentración hacia una zona de menor concentración. La ósmosis es un movimiento de líquidos, a través de una membrana semipermeable partiendo de una zona con alta concentración de soluto [3].

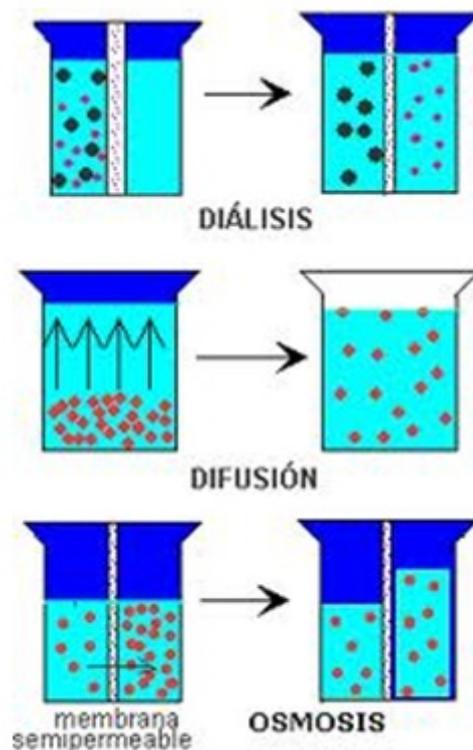


Figura 1-1. Procesos de difusión y osmosis en diálisis [4].

La DP consiste en una técnica intrabdominal, en la cual se utiliza el peritoneo como membrana dializante, por medio de un catéter que permite acceder a la cavidad peritoneal, permitiendo la realización de la técnica [5]. En la DP, la solución de diálisis que se administra en base acuosa, con características similares al plasma de la sangre; contiene glucosa, electrolitos normales y está libre de desechos; por tanto, los productos de desecho y el exceso de electrolitos en la sangre cruzan el peritoneo, hacia el líquido de diálisis, produciéndose así un intercambio [5].

Los procesos infecciosos son unas de las complicaciones más frecuentes en la insuficiencia renal crónica, sin menospreciar otras afecciones no menos importantes, como las cardiovasculares, anemia y osteodistrofia [5].

Las infecciones son la principal causa de morbilidad y la segunda causa de mortalidad en los pacientes en diálisis. Un elevado porcentaje de pacientes incidentes en diálisis tienen un inicio no programado y el uso de catéteres venosos sigue siendo elevado. Cuando se emplean estos últimos, se multiplica de forma considerable el riesgo de bacteriemia y las tasas de mortalidad ajustada para todas las causas infecciosas. En los datos del US Renal Data System (USRDS) de diálisis se ha observado que el riesgo de septicemia es significativamente más bajo en pacientes que inician tratamiento sustitutivo renal (TSR) con DP comparando su tasa de infección por paciente y año con la de pacientes incidentes en HD a través de catéter [5]. Hay que destacar el peligro de una septicemia, que en cuestión de horas, si no se detecta, puede acabar con la vida del paciente.

En la vida de cualquier persona la infección en general, acostumbra a tener un protagonismo fundamental por su repercusión en la vida diaria, dada la limitación que condiciona la fiebre, frecuente en la infección microbiana o en ausencia de ella, y la percepción de un estado físico con evidente decaimiento. Esta supone una de las razones principales por las que la población se ve obligada a acudir a consulta a un centro hospitalario. En pacientes con IRCT sometidos a DP donde nos hemos centrado, se presentan complicaciones infecciosas (respiratorias, renales, abdominales, cutáneas) semejantes al resto de la población sana, pero en ellos la diferencia es que su estado condiciona la respuesta a la agresión infecciosa, ya que es menor la capacidad de defensa al tener una inmunidad reducida y ser por ello más vulnerables.

Dado que contraer infecciones es una complicación frecuente en pacientes sometidos a diálisis peritoneal, la duda de padecer la enfermedad conlleva un trastorno en la vida cotidiana del paciente tener que acudir a su centro médico más de lo inevitable. Es por ello que urge la existencia de un dispositivo que haga sencilla la detección de la patología para cualquier usuario .

Entre los métodos de detección de bacterias, se encuentran los métodos tradicionales, que suelen englobar el examen directo, el cultivo y el antibiograma. Estos resultan tediosos y, en ocasiones, poco fiables, al ser muy sensibles y, por tanto, poco rentables por la necesidad de repetición de análisis.

Los métodos basados en el empleo de anticuerpos, aplican una metodología rápida y simple, más rentables y menos sensibles que los anteriores, y con opción de automatización y multimuestreo. Pero existen limitaciones en este método debido a la baja selectividad ante ciertos estreptococos y bacterias patógenas, añadiendo la baja fiabilidad en niños [6].

El método más conocido, entre los métodos de detección sobre técnicas inmunológicas, es el método ELISA. Se trata de procedimientos sencillos, pero requieren tiempo, instrumentación costosa y personal especializado [6].

Los biosensores pueden llegar a competir con las técnicas clásicas de análisis al permitir una determinación rápida, selectiva y económica. Estos dan lugar a resultados tan fiables como los métodos convencionales pero en menor tiempo. Lo más atractivos son los inmunosensores y genosensores, por ser más sencillos, menos costosos que los tradicionales y más eficaces, pero aún son demasiado costosos.

Se han desarrollado ya biosensores para la detección de bacterias como *S. Aureus* y *S. Pneumoniae*, basados en inmunoensayos acoplados a técnicas electroquímicas, aunque aún la sensibilidad conseguida no es suficiente para asegurar el cumplimiento de los reglamentos de la seguridad alimentaria.

Aunque con estos métodos se obtienen buenos resultados, conllevan una serie de desventajas que no los hacen adecuados para satisfacer necesidades actuales como rapidez, sencillez y bajo coste. Los principales inconvenientes de los métodos actuales son:

- Requieren largos tiempos de ensayos
- Laboratorios especializados
- Instrumentación costosa
- Personal capacitado

En los últimos años, el uso de las TIC ha crecido considerablemente en todos los ámbitos, resultando esto de gran utilidad en el de la salud. El uso de Internet u otros medios electrónicos para proporcionar servicios en el ámbito de la salud o crear y analizar información con la salud, engloba la e-Salud. La e-Salud supone numerosos beneficios para los pacientes y profesionales del sector sanitario, también para la organización de los centros hospitalarios [7]. La correcta utilización de estas herramientas en materia e prevención, diagnóstico, tratamiento, seguimiento o gestión de la salud, permiten ahorro de costes en el sistema sanitario con mayor eficacia del mismo.

La e-Salud está potenciada en parte por el uso de las redes inalámbricas de sensores corporales, que permiten la monitorización del paciente en cualquier lugar y tiempo, así como un diagnóstico y detección precoz de enfermedades. Habitualmente casi cualquier actividad de monitorización requiere un esfuerzo, tanto por el paciente como por los colectivos sanitarios. En la realización de cualquier prueba, se precisa que el paciente se desplace hasta un centro médico, lo que implica que tenga que modificar su actividad cotidiana. Esta situación se agrava mucho más cuando la prueba a realizar no se reduce a unos minutos de monitorización, sino que se deben recopilar datos a lo largo de una noche o incluso a lo largo de uno o varios días con el fin de obtener la suficiente información para llevar a cabo un diagnóstico fiable. Estos casos suelen requerir la hospitalización del paciente, lo que implica un perjuicio para el mismo y para los servicios médicos encargados de realizar la prueba, ya que se produce una saturación de los centros hospitalarios y aumento de costes sanitarios [8].

Los continuos avances en materia de dispositivos y programas informáticos, en conjunto con las redes inalámbricas, nos han situado a las puertas de una nueva era en la que pequeños dispositivos inalámbricos nos proporcionarán acceso a la información en cualquier momento y en cualquier lugar. De este modo, los pacientes pueden ser monitorizados desde su hogar, ofreciendo un mayor control y mejor calidad de vida [8].

1.1 Hipotesis y objetivos

En el contexto Científico Tecnológico actual, se plantea la hipótesis de desarrollar un sensor inteligente, no

invasivo, económico, sencillo y fiable con capacidad para detectar presencia de bacterias en fluidos de pacientes sometidos a DP en un margen de tiempo aceptable para su tratamiento.

El objetivo principal del presente proyecto es diseñar e implementar un prototipo preindustrial de un sensor para la detección precoz de bacterias que pueda ser aplicado en pacientes sometidos a diálisis peritoneal. Se espera que dicho prototipo sea una primera aproximación a un sensor económico y no invasivo.

Para lograr el objetivo principal se tratarán los siguientes subobjetivos:

- Desarrollar un estudio del estado del arte de las tecnologías empleadas en la detección de bacterias, actuales y en fase de estudio o desarrollo.
- Estudiar la tecnología más adecuada para la propuesta del proyecto.
- Diseño y simulación de un circuito basado en la tecnología seleccionada para valorar su respuesta.
- Diseño e implementación de las adaptaciones que se consideren necesarias, con la finalidad de realizar pruebas experimentales que permitan evaluar la tecnología propuesta.
- Evaluación y experimentación del sensor diseñado.

1.2 Estructura de la memoria

La memoria de este trabajo está dividida en cinco capítulos que se describen a continuación:

- Capítulo 1. Introducción sobre la enfermedad renal y la problemática existente en pacientes renales. Se mencionan posibles infecciones que pueden aparecer en tratamientos subsidiarios de la enfermedad. También se explica la importancia de las nuevas tecnologías en el ámbito de la salud y la motivación para la realización de este trabajo así como la hipótesis y objetivos propuestos.
- Capítulo 2. Materiales y métodos. Descripción de la tecnología utilizada, en este caso, la capacitiva. Describir la funcionalidad de los principales osciladores, Colpitts y Pierce. Explicando la metodología seguida para el desarrollo del trabajo y los materiales utilizados.
- Capítulo 3. Estado del arte en la detección de bacterias. Se explica la importancia de detección de bacterias en pacientes renales sometidos a DP, así como las técnicas de detección de bacterias utilizadas en la actualidad ante la problemática existente en estos pacientes. Se analizan tecnologías de sensorización existentes y en fase de estudio o desarrollo. Se justifica y explica la utilización de la tecnología capacitiva en este trabajo.
- Capítulo 4. Resultados. Se muestran los resultados obtenidos de la simulación del circuito seleccionado. Se muestran los resultados del diseño e implementación de la adaptación de un prototipo de circuito previo y los resultados de las pruebas experimentales realizadas con el sensor y la bolsa de drenado con la correspondiente disolución.
- Capítulo 5. Conclusiones. Se exponen las conclusiones obtenidas de las distintas pruebas experimentales, proponiendo las mejoras a realizar en el futuro para el sensor.

2 MATERIALES Y MÉTODO

En este capítulo se detallan los requisitos de diseño que debe tener el sensor, explicando la metodología que se lleva a cabo para el diseño del mismo. Por último, se describen las pruebas que se han realizado en el estudio experimental; detallando los programas informáticos, herramientas y materiales usados.

2.1 Requisitos de diseño

Partiendo del objetivo del presente trabajo, se imponen una serie de requisitos de diseño que debe satisfacer el sensor detector de bacterias en pacientes sometidos a diálisis:

- Capacidad de detectar cambios ante la presencia de distintas sustancias en un fluido en un corto periodo de tiempo.
- Sencillo y manejable.
- Económico.
- Fiable y robusto en las mediciones.
- No invasivo.
- Accesible a cualquier usuario para uso doméstico.

2.2 Metodología

Para llevar a cabo el diseño e implementación del sensor requerido se sigue una metodología cíclica, es decir, actuando de forma iterativa.

En primer lugar, se hace un revisión bibliográfica con el fin de estudiar las tecnologías disponibles para la detección de bacterias. Tras no encontrar ninguna existente que resuelva la problemática planteada, para la detección precoz de bacterias en fluidos de pacientes sometidos a DP, se propone la tecnología capacitiva para el diseño de un sensor, basado en un circuito oscilador, detector de bacterias. Se estudia la tecnología propuesta y se selecciona el oscilador adecuado para el circuito, justificando su funcionalidad, así como sus ventajas e inconvenientes frente a otros tipos.

Con el programa Orcad Capture, se realiza una simulación del circuito obteniendo una parametrización final que después se comprobará en un circuito real.

Se prosigue, con la construcción del circuito elegido. Esto se ha hecho mediante el programa informático Orcad Layout. En este, se han especificado las pistas y capas necesarias para soldar los componentes requeridos. Teniendo dicha información, se ha generado un código que se envía a un equipo adecuado para la impresión del circuito, en este caso, una fresadora automática ProtoMat S62.

Teniendo el prototipo final del circuito, se realizan pruebas reales mediante un osciloscopio, y se comprueba que el circuito no emite respuesta, por lo que finalmente se utiliza una adaptación.

Para este trabajo se ha realizado una adaptación de un dispositivo previo desarrollado en el Grupo de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Sevilla, por Pablo Parodi Félix en su PFC “Mejora del diseño

hardware y software de un sensor capacitivo para la medida de la frecuencia cardiaca” [9], para llevar a cabo la etapa de sensorización y desarrollar un sistema de medidas y electrodos, con el fin de realizar distintas pruebas experimentales con dicho sensor. En cada modificación se han hecho simulaciones y comprobaciones con osciloscopio antes de su implementación final, con el fin de conseguir el mejor resultado con el menor coste de corrección.

Después, se realiza el estudio experimental. Una vez instalado el dispositivo, se han realizado distintas pruebas con el fin de obtener conclusiones del estudio teórico que se ha llevado a cabo. Los materiales que se han utilizado son los siguientes:

- Circuito final implementado en placa PIC32-PINGÜINO-OTG
- Bolsa con solución para diálisis peritoneal
- Vasos de precipitado
- Pipetas desechables
- Espátula
- Sustancias (Sal común, azúcar, leche, urea, vinagre)
- Ordenador portátil con programas informáticos adecuados para el procesamiento de las señales medidas.

La sistemática ha sido comprobar la variabilidad de la señal ante la adición de distintas sustancias. Se añaden distintas concentraciones de sustancias similares a los desechos de los metabolitos de bacterias causantes de la infección y se toman medidas.

En principio, se hacen pruebas de una disolución compuesta con agua destilada y distintas sustancias, debido a que el agua destilada es una sustancia fácil de obtener y permite adquirir una previa experiencia antes de realizar pruebas con otros fluidos no tan fáciles de obtener, como la solución de diálisis. En todos los casos, se ha partido de una concentración 20% en peso y se han hecho diluciones con el fin de poder hacer cada prueba con la mayor continuidad posible.

Las sustancias añadidas han sido:

- Sal común
- Azúcar
- Leche
- Crema de manos con 5% de Urea
- Vinagre

Se toman estas sustancias por su facilidad para conseguir y por sus diferentes propiedades en cuanto a conductividad, pH, color y composición.

En todas ellas, se comienza con un 20% y se diluye a 15%, 10%, 5%, 2% y 1%.

En una balanza de precisión se pesan, con ayuda de una espátula y pipetas desechables, las cantidades correspondientes de agua y sustancia a añadir, comenzando con un 20% pp obtenido de pesar 40 gramos de sustancia y 160 gramos de solución, extrayendo para la siguiente dilución la cantidad de correspondiente de disolución, añadiendo la cantidad correspondiente de agua hasta conseguir las proporciones deseadas.

Se introduce la disolución, preparada y correctamente homogeneizada, por uno de los catéteres de la bolsa con una jeringuilla, se coloca correctamente la bolsa con electrodos en el soporte y se toman medidas de frecuencia con el sensor.

Las pruebas se realizan en dos tandas, en la primera tanda la disolución se compone del soluto y agua destilada como disolvente; y en la segunda tanda la disolución se compone del soluto y solución de diálisis como disolvente.

Para comenzar, se ha llenado la bolsa con, aproximadamente, 200 ml de agua destilada, y se han tomado medidas para, posteriormente, comparar con la señal emitida cuando la bolsa está llena de una disolución con

una sustancia específica a diferentes concentraciones, de este modo comprobar la sensibilidad del dispositivo y, por tanto, su efectividad.

La bolsa con solución para diálisis utilizada para este trabajo es de tipo PHYSIONEAL 35 de la casa BAXTER, S.L.. Su función es eliminar el agua y los productos de desecho de la sangre. Además, corrige los niveles anormales de los distintos componentes de la sangre.

PHYSIONEAL 35 está disponible en diferentes concentraciones de glucosa (1,36%, 2,27% o 3,86%), la utilizada será de 1,36%. Cuanto mayor sea la cantidad de glucosa de la solución, mayor cantidad de agua se eliminará de la sangre.

PHYSIONEAL 35 se receta a pacientes con afecciones como las siguientes:

- Insuficiencia renal temporal o permanente
- Retención grave de agua
- Alteraciones graves de la acidez o de la alcalinidad (pH) y del nivel de sales en sangre
- Algún tipo de intoxicación debida a medicamentos para los que no hay otros tratamientos disponibles.

Esta solución tiene una acidez (pH) similar a la de la sangre, que ronda 7,4.

PHYSIONEAL 35 se trata de una solución incolora, transparente y estéril para diálisis peritoneal. El envase es una bolsa de PVC con doble cámara. Las dos cámaras se encuentran separadas por un precinto permanente. La solución mezclada contiene los siguientes principios activos:

Tabla 2–1 Composición de la solución de diálisis PHYSIONEAL 35

Glucosa monohidrato (g/l)	15,0
Equivalente a glucosa anhidra (g/l)	13,6
Cloruro de sodio (g/l)	5,67
Cloruro de calcio dihidrato (g/l)	0,257
Cloruro de magnesio hexahidrato (g/l)	0,051
Bicarbonato sódico (g/l)	2,10
Solución de S-Lactato de sodio (g/l)	1,12

Otros componentes son: agua para inyectables y dióxido de carbono.

La composición en mmol/l de la solución mezclada es:

Tabla 2–2 Composición de la solución de diálisis PHYSIONEAL 35

Glucosa anhidra (mmol/l)	75,5
Sodio (mmol/l)	132
Calcio (mmol/l)	1,75
Magnesio (mmol/l)	0,25
Cloruros (mmol/l)	101

Bicarbonato (mmol/l)	25
Lactato (mmol/l)	10

En la figura se puede ver el aspecto de la bolsa con la solución:

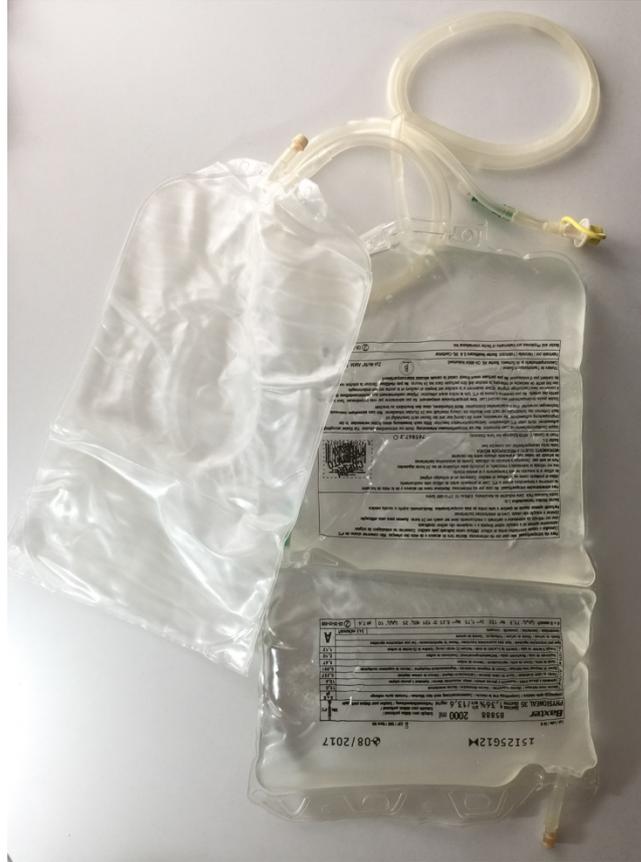


Figura 2-1. Bolsa con solución de diálisis PHYSIONEAL 35

Mencionar que, después de cada prueba la bolsa se lava correctamente y se seca para no contaminar la siguiente disolución ni obtener resultados falsos.

Antes de comenzar a medir se estudia la geometría y posición de los electrodos en la bolsa de desecho (Bolsa vacía de la figura 1), donde se realizaran las medidas.

Para la recepción de datos medidos, es necesario conectar el dispositivo al ordenador. Para ello, se hace uso del modulo Bluetooth que tiene la placa, al utilizarse un ordenador con sistema operativo MAC OSX se requiere la instalación de una máquina virtual para arrancar el sistema operativo Windows, VirtualBox, y de ese modo poder trabajar con los programas informáticos necesarios, incompatibles con MAC OSX. Se instala un emulador de terminal de libre adquisición llamado Cool Term, se comprueba la conectividad con el dispositivo y la recepción de datos.

Al recibir las señales, los datos obtenidos se procesan mediante el programa informático Matlab. Se ha creado una aplicación que permite mostrar por pantalla gráficamente las mediciones tomadas, y realizar algunas operaciones matemáticas sencillas, que pueden resultar de utilidad. Para ello, es necesario tener los datos en un documento de extensión .txt y llamarlo desde Matlab. También se procesan los datos con una hoja de cálculo, del programa informático de Excel, así como la obtención de gráficas.

Fianalmente, se sacan conclusiones de los resultados obtenidos en las distintas pruebas realizadas proponiendo mejoras futuras.

3 ESTADO DEL ARTE EN LA DETECCIÓN DE BACTERIAS

Actualmente, la mayoría de los métodos de detección disponibles se basan, en técnicas tradicionales de cultivo, microscopía o citometría de flujo y pruebas bioquímicas. Aunque se obtengan buenos resultados, requieren largos tiempos de ensayos, laboratorios especializados, instrumentación costosa y personal capacitado [10].

Para ello, se requiere diseñar procedimientos que cualquier paciente pueda llevar a cabo y obtener resultados entendibles, de manera que si resulta positiva la presencia bacteriana pueda acudir rápidamente a un centro médico, o bien, si no existe tal presencia, pueda descartarlo. En este capítulo se hace una revisión bibliográfica los sistemas de detección utilizados, y se analizan las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

Tras revisar distintas técnicas de sensorización para la detección de bacterias, se justifica la selección de la tecnología capacitiva para el presente trabajo. En este capítulo, se explica la forma de medir la capacidad y las partes principales del circuito, así como los osciladores más importantes. Al final del capítulo se exponen algunas aplicaciones de los sensores capacitivos.

3.1 Importancia de detección bacteriana precoz en pacientes renales

La enfermedad renal crónica empeora lentamente durante periodos largos de tiempo, por lo que la pérdida de función renal puede ser tan lenta que ni siquiera se noten los síntomas hasta que los riñones casi hayan dejado de trabajar.

La manera más fiable, hasta la actualidad, para medir la enfermedad renal es la medición del índice de filtración glomerular; la velocidad a la que la sangre entra, se limpia, y después sale del riñón. Un índice de menos de 60 ml/min en un lapso de tres meses indica, como ya se indicó anteriormente, enfermedad renal crónica terminal.

La enfermedad renal crónica se trata de una enfermedad que no tiene cura. Pero es posible ralentizar el daño al riñón en la mayoría de casos, con tratamientos sustitutivos de la función renal o trasplante.

En pacientes con enfermedades crónicas como la IRCT surge la necesidad de saber, de forma rápida y sencilla, si existe presencia bacteriana en sus fluidos, ya que una cantidad de horas es suficiente para que la situación del paciente se agrave.

3.2 Tecnologías actuales de detección bacteriana en pacientes renales

Tanto en hemodiálisis como en diálisis peritoneal existen complicaciones que pueden agravar la situación de un paciente que padezca IRCT. En este tipo de practicas existe riesgo de que puedan aparecer afecciones como son [2]:

- Enfermedad cardiovascular
- Hiperglucemia e hiperinsulinismo
- Peritonitis: se trata de una complicación grave y frecuente. El 70% de los casos tiene origen estafilocócica. Suele ser suficiente el tratamiento antibiótico peritoneal, pero una tardía detección puede acarrear causas fatales.
- Peritonitis esclerosante
- Desnutrición proteica
- Aumento de presión abdominal
- Enfermedad quística adquirida
- Enfermedad ósea adinámica

La peritonitis es la inflamación del peritoneo, en esta cavidad se encuentran protegidos los órganos. Normalmente, se produce por la entrada de gérmenes a través del catéter. Es muy importante detectar a tiempo esta infección.

Ante la presencia de bacterias, el peritoneo presentará ascitis. Ascitis es la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal.

Actualmente, la ascitis se diagnostica [11]:

1. Evaluando el grado de la **función hepática**.
2. **Ecografía abdominal:** con el objetivo de descartar otras patologías.
3. **Paracentesis diagnóstica:** consiste en la extracción de líquido ascítico (líquido en el abdomen acumulado de forma inapropiada) mediante una aguja o catéter fino. Para ello, se tumbará en una camilla en posición de cúbito supino (sobre su espalda) y, tras desinfectar la zona de punción, se le aplicará anestesia local en la zona de la punción. Una vez limpia la zona, el facultativo le realizará la punción para extraerle líquido, generalmente en la parte inferior izquierda de su abdomen. En ocasiones es necesario localizar el punto de punción, para lo cual se puede utilizar un ecógrafo para localizar la mejor zona para la punción. Puede que se tenga que administrar medicación para evitar complicaciones a otros niveles (como en los riñones) [12].

Tras extraer muestra del líquido ascítico, se realizará una prueba diagnóstica en laboratorio:

1. Recuento celular: es una prueba muy útil. La causa más frecuente de un recuento elevado de leucocitos es la peritonitis bacteriana espontánea (PBE).
2. Gradiente albúmina en suero y en líquido ascítico (GASA): sirve para descartar que la causa de la ascitis sea la hipertensión.
3. Cultivo bacteriano.
4. Proteínas totales.
5. Tinción de Gram.
6. Citología: es de alto valor cuando se sospecha de carcinomatosis peritoneal.
7. Tuberculosis.

La paracentesis diagnóstica con un apropiado estudio del líquido ascítico es esencial en todos los pacientes que presentan ascitis, antes de comenzar cualquier terapéutica para excluir otras causas de ascitis y poder identificar la peritonitis en el cirrótico.

Esta técnica no suele derivar complicaciones, no obstante, todas las técnicas médicas tienen riesgos. Algunos de ellos son:

- Penetración al interior de un asa intestinal
- Hematoma de la vaina del recto
- Hematomas mesentéricos
- Laceración de asas
- Perforación de la vejiga
- Filtración prolongada del líquido ascítico en el lugar de la punción

Entorno al 50% de los pacientes con IRCT presentan ascitis, en la mayoría de los casos peritonitis debida a

bacterias. Por lo que es muy importante la detección temprana de estos casos [13].

Actualmente, la técnica comúnmente utilizada es la paracentesis diagnóstica.

3.3 Sistemas de detección de bacterias

En campos como la industria alimentaria, diagnóstico clínico, medio ambiente y control de aguas, resulta relevante la identificación de bacterias en el laboratorio, ya que la determinación de infección o contaminación es crucial para proceder a la aplicación de cierta medida de control. Esta necesidad de identificación provoca un gran desarrollo de técnicas para ello. Hasta el momento, los métodos más conocidos y empleados en la detección de bacterias están basados en el cultivo, métodos inmunológicos y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.3.1 Métodos de detección convencionales

Estos métodos suelen englobar el examen directo, el cultivo y el antibiograma. El procedimiento más rápido sería el examen directo, ya que mediante observación microscópica de la muestra en un portaobjeto podría identificarse el agente biológico. El cultivo de muestras requiere el crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo para su posterior identificación, en este procedimiento se utilizaría la tinción de Gram, se trata de una técnica de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas, es un proceso lento, pudiendo llevar varios días o semanas. Estos métodos resultan tediosos y, en ocasiones, poco fiables, teniendo en cuenta que son también muy sensibles y, por tanto, poco rentables por la necesidad de repetición de análisis[14].

3.3.1.1 Métodos basados en el empleo de anticuerpos

Estos métodos aplican una metodología rápida y simple, más rentables y menos sensibles que los anteriores, y con opción de automatización y multimuestreo. Se han desarrollado sencillos métodos de antigenuria, demostrando que componentes antigénicos en la orina como *S. pneumoniae* y *Legionella pneumophila*, dan un diagnóstico fiable y rápido. En los años 90 se desarrolló un método sencillo y rápido basado en la inmunocromatografía de membrana, *Binax NOW®*, capaz de detectar *Streptococcus mitis* (*S. mitis*), *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) y *Legionella pneumophila* en la orina de pacientes infectados. Pero existen limitaciones en este método debido a la baja selectividad ante ciertos estreptococos y bacterias patógenas, añadiendo la baja fiabilidad en niños [14].

Otro método está basado en la separación inmunomagnética (IMS), mediante el cual sería posible capturar y extraer una bacteria patógena de una muestra, evitando tener que pasar etapas de preconcentración. El método más conocido, entre los métodos de detección sobre técnicas inmunológicas, es el método ELISA. Este consiste en detectar un antígeno mediante un anticuerpo marcado con enzima capaz de detectar un producto observable, como podría ser un cambio de color, pudiendo medir directamente mediante espectrometría. Se trata de procedimientos sencillos, pero requieren tiempo, instrumentación costosa y personal especializado [14].

3.3.1.2 Métodos basados en biología molecular

La mayoría de estos se basan en la hibridación de los ácidos nucleicos o PCR. Para detectar e identificar microorganismos con esta técnica, se extraen ácidos nucleicos directamente del organismo y se analiza. Aunque solo pueden detectar la presencia de un microorganismo, deberían brindar mayor sensibilidad, más rapidez y ser menos costosos [14].

En los últimos años, se incrementó la demanda en el diseño y desarrollo de biosensores electroquímicos para abordar problemas de análisis importantes en la actualidad, teniendo como objetivo anteponerse al proceso analítico tradicional.

Entre los sistemas de identificación y detección de bacterias surgen los *biosensores*, que permiten la detección de bacterias a tiempo real, rápidamente y de forma sencilla [14].

El creciente interés en el desarrollo de sensores aplicables en la medicina, guarda relación con las ventajas que

ofrecen para satisfacer las demandas existentes como:

- Necesidad de herramientas menos costosas.
- Miniaturización de los dispositivos.
- Simplicidad y eficiencia.
- Medidas a tiempo real e in situ.

Esta demanda es un importante motivo para seguir trabajando en la investigación y desarrollo de biosensores. Surgiendo a finales del siglo XX como una poderosa alternativa a las técnicas analíticas convencionales [15].

A continuación, se mostraran algunos ejemplos de biosensores que se han desarrollado hasta el momento. Un ejemplo, Zhang y col. [16] describen un método con gran sensibilidad basado en un inmunosensor electroquímico para detectar *E.coli* en aguas. Se trata de un sensor amperométrico, el cual presenta ciertas ventajas, como alta sensibilidad, tamaño, robustez, rapidez, bajo coste y versátil para realizar análisis in situ. Mediante el empleo de un inmunosensor amperométrico, Sharma y col. [17], lograron detectar *Vibrio cholerae O1* en aguas subterráneas, de mar, aguas de grifo y fecales; en tan sólo 55 minutos. Otra aplicación desarrollada mediante un sensor amperométrico fue monitorizar el crecimiento de coliformes en leche, de forma rápida y selectiva, los investigadores fueron Lee y col. [18]. Se hace posible la determinación de concentración de bacterias *E.coli* debido a la variación de la corriente causada por la reacción redox del azul de metileno producida por el metabolismo bacteriano en las muestras. Se demostró que era posible ser aplicado en el análisis de muestras en las centrales lecheras.

3.3.2 Biosensores

Algunos de los métodos de determinación bacteriana descritos siguen presentando ciertas limitaciones, como la de no alcanzar los niveles de detección que ofrecen los métodos convencionales. Aún así, el futuro de los métodos de detección e identificación de bacterias y otros tipos de microorganismos patógenos tiende hacia el desarrollo de biosensores que puedan competir con las técnicas clásicas de análisis al permitir una determinación rápida, selectiva y económica [12].

3.3.2.1 Biosensores para la detección de *Streptococcus pneumoniae*

El neumococo, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), es una bacteria Gram-positiva encapsulada e inmóvil, perteneciente al grupo α -hemolítico del género *Streptococcus*. Tiene forma oval y extremo distal lanceolado y suele presentarse en forma de parejas, por lo que antiguamente se le denominaba *Diplococcus pneumoniae*. Se trata de un microorganismo microaerófilo, catalasa negativo y perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas [11].

Este microorganismo, es el causante de importantes enfermedades e infecciones en humanos (neumonía, otitis, peritonitis, sinusitis...) y de procesos invasivos severos (meningitis, sepsis...). Los grupos más vulnerables ante este tipo de microorganismos patógenos son ancianos, niños y personas inmunodeprimidas. El hábitat preferida de este neumococo se sitúa en la nasofaringe. Es el principal microorganismo causante de Neumonía adquirida en la comunidad (NAC).

Hasta el momento, los métodos para el diagnóstico de neumonía neumocócica se han basado en cultivos, estos análisis resultan complejos, tediosos y poco fiables. Requieren al menos 48h para obtener un resultado.

Puesto que la neumonía neumocócica tiene una tasa de mortalidad de hasta el 30% dependiendo de la bacteriemia, edad y enfermedades subyacentes del paciente [20], se reitera más la necesidad de desarrollar un sistema de detección rápida, el cual permita iniciar cuanto antes un tratamiento adecuado. Los biosensores dan lugar a resultados tan fiables como los métodos convencionales pero en menor tiempo. Lo más atractivos son los inmunosensores y genosensores, por ser más sencillos, menos costosos y más eficaces. En la siguiente tabla se muestran algunos sistemas sensoriales descritas hasta el momento para la detección de esta bacteria:

Tabla 3–1 Biosensores para la determinación de *Streptococcus pneumoniae*

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características Analíticas
Inmunoensayo basado en la conjugación del polisacárido de la pared celular de <i>S. Pneumoniae</i> y la posterior incubación con Abs específicos	Inmunosensor de fibra óptica	-	-
Sándwich dot-ELISA	ELISA	Líquido cefaloraquídeo	LD: 1.25 µg mL ⁻¹
Genosensor basado la inmovilización de las sondas de DNA sobre SPCEs mediante interacción Biotina-Strp y marcaje con AP	CV (-0.25 - +0.20 V) (3-IP)	-	LD: 0.49 fmol
Genosensor basado la inmovilización de las sondas de DNA sobre SPCEs mediante interacción Biotina-Strp	Amperometría (E _{app} = -1.40 V vs. Ag/AgCl)	-	IL: 5 – 100 pg µL ⁻¹ LD: 5 pg µL ⁻¹
Inmunosensor para la toxina <i>ply</i> tipo sándwich basado en la inmovilización de los Abs sobre SPCEs mediante enlace Biotina- Strp y marcaje enzimático con AP	CV (-0.25 - +0.20 V) (3-IP)	Orina	IL: 0.25 – 5.0 ng mL LD: 0.12 ng mL ⁻¹
Inmunosensor para detección de <i>ply</i> específica de <i>S. pneumoniae</i> basado en la inmovilización de Abs a la superficie de un electrodo de oro mediante el empleo de monocapas	SWV (3-IP)	-	IL: 0.1 – 10 ng mL ⁻¹
Test inmunocromatografía basado en Abs específicos para la detección del polisacárido C de <i>S. pneumoniae</i>	Detección colorimétrica	Esputo	LD: 0.75 ng mL ⁻¹
Genosensor basado en el empleo de SPCEs modificados con Strp y sondas biotiniladas para la determinación del gen <i>lytA</i> específico de <i>S. pneumoniae</i>	ASV (3-IP/Ag ⁺)	-	IL: 7 – 700 fg µL ⁻¹ LD: 7 fg µL ⁻¹

3.3.2.2 Biosensores para la determinación de *Staphylococcus aureus*

El estafilococo aureus, es una bacteria anaerobia facultativa, gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada [21]. Está distribuida por todo el mundo, se estima que una de cada tres personas están colonizadas por ella, aunque no quiere decir que estén infectadas. Forma parte de la flora de la piel y se acomoda en la cavidad oral, nariz y tracto gastrointestinal; hasta el 30-50% de la población humana es portadora.

Puede producir enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas, mayormente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades graves como meningitis, endocarditis,

sepsis o neumonía. Si la bacteria se ingiere, puede afectar al aparato gastrointestinal. Las cepas de este microorganismo son resistentes a la penicilina, siendo necesario antibióticos como aminoglucósidos, cefalosporinas, oxacilina o nafcilina; para combatirlos. Si el origen de la infección parte de catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos, será conveniente eliminar estas puertas de entrada.

Esta bacteria es capaz de vivir y crecer en condiciones extremas, a temperaturas de entre 15-45°C, en intervalos de pH de 4.2-9,3 o a concentraciones de NaCl (Cloruro de sodio) elevadas (15%), estas condiciones favorecen el crecimiento en muchos alimentos [22].

Son diversos los motivos que hacen necesario el desarrollo de sistemas para su detección. Actualmente, la identificación se realiza mediante métodos convencionales tales como cultivo bacteriano y pruebas bioquímicas. Se han desarrollado ya biosensores para la determinación de esta bacteria, basados en inmunoensayos acoplados a técnicas electroquímicas, aunque aún la sensibilidad conseguida no es suficiente para asegurar el cumplimiento de los reglamentos de la seguridad alimentaria. En la siguiente tabla se muestran algunos sistemas de detección desarrollados para detectar esta bacteria:

Tabla 3–2 Biosensores para la determinación de *Streptococcus aureus*

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Caract. Analíticas
Inmunosensor basado en el empleo de MBs modificadas con grupos aldehído y Abs específicos de la ProtA	IMS-MS/SPR	-	IL: 1.0x10 ⁶ – 1.0x10 ⁷ cfu mL ⁻¹ LD: 106 cfu mL ⁻¹
Inmovilización de anti-SEB marcado con HRP en superficie modificada con nAu, quitosan y MWCNT	Conductimetría	Leche	IL: 0.5 – 83.5 ng mL ⁻¹ LD: 0.5 ng mL ⁻¹
Identificación del carácter catalasa positivo del <i>S. aureus</i>	Espectrofotometría UV/Vis (450 nm)-test cromatográfico para la determinación de H ₂ O ₂	Tofu	LD: 2x10 cfu mL
Inmovilización de aptámeros anti <i>S. aureus</i> en superficie modificada con SWCNT	Potenciometría	Piel de cerdo	LD: 8x10 ² cfu mL ⁻¹
Inmovilización de anti <i>S. aureus</i> sobre electrodo de Pt mediante entrecruzamiento con PEI-GA	Amperometría (E _{app} = 0.80 V vs. Ag/AgCl) (NADP-K ₃ Fe(CN) ₆)	Leche, queso y carne	IL: 101 – 108 cfu mL ⁻¹ LD: 10 cfu mL ⁻¹

3.3.2.3 Biosensores basados en técnicas no electroquímicas:

3.3.2.3.1 Detección y cuantificación de bacterias patógenas. Usando sensor de gran resistencia magnética.

Actualmente, como se ha mencionado en secciones anteriores, existen métodos como:

- Método ELISA (análisis de inmunoabsorción enzimática)
- PCR
- Método óptico (el cual sufre mucho ruido causado por la luz parásita)

El GMR (giant magnetic resistance sensor) es sensible, barato y pequeño en comparación con otros sensores. Estos biosensores proporcionan ventajas con respecto a las técnicas de fluorescencia.

En estas bacterias son marcadas con nano partículas magnéticas de 40nm recubiertas con un anticuerpo

adecuado. Entonces, cuando un campo magnético externo se aplica a las nano partículas magnéticas se produce un campo magnético local y este provocará cambios en la resistencia del GMR. Por tanto, mediante la cantidad de campo magnético producido puede cuantificarse la cantidad de bacterias [23].

Las partículas nano magnéticas se recubren con un anticuerpo adecuado para conseguir la unión con la bacteria. Debido al campo magnético local creado se disminuirá la resistividad del sensor, y de este modo podrá cuantificarse el número de bacterias [23].

La resistencia estándar de los sensores GMR tienen una resistencia estándar de 5k Ω , la salida es insensible a frecuencias de 1MHz, producen una salida de campo constante y pueden operar hasta temperaturas de 125 °C.

El principio de trabajo del sensor consiste en alternar distintas capas de material ferromagnético y anti ferromagnético. Se forma de tres capas:

- Capa fija: donde la orientación (“spin”) de los electrones es fijo.
- Capa de conducción.
- Capa libre: donde los electrones se mueven libremente.

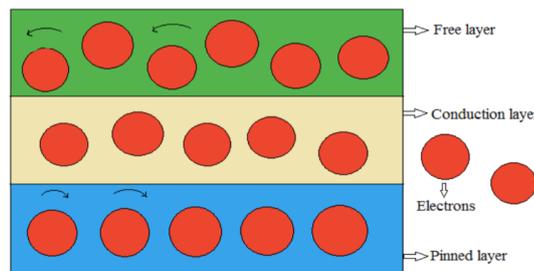


Figura 3-1. Disposición de las capas en estado normal.

La dirección de magnetización de las capas magnéticas en la película del GMR tendrá un acoplamiento anti ferromagnético. Los electrones en las capas magnéticas y no magnéticas de la película tendrán opuestas orientaciones de giro.

Los electrones de conducción en los materiales magnéticos tienen características especiales de giro. Cuando el material es magnetizado en una dirección, y el electrón gira hacia abajo en el material es magnetizado en dirección opuesta. Si un campo externo es aplicado, la dirección de giro del electrón en la capa libre cambiará y se alineará con la dirección de giro del electrón en la capa fija, disponiéndose del siguiente modo:

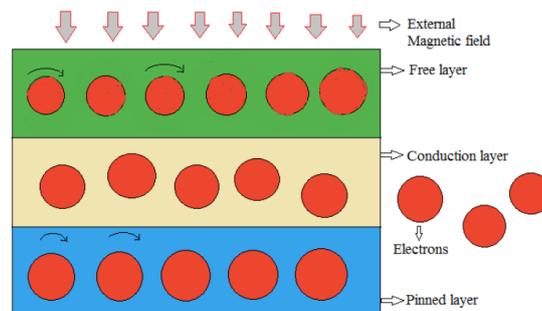


Figura 3-2. Orientación del electrón cuando se aplica un campo magnético externo.

Como podemos ver en la figura, cuando un campo magnético externo es aplicado la orientación de giro del electrón en la capa libre se alinea con la capa fija. Ahora los electrones de la capa fija pueden moverse a la

capa libre y viceversa ya que la orientación es la misma. Entonces, el camino libre de los electrones aumenta e indica que hay más flujo de corriente debido a la resistencia del sensor GMR cuando un campo magnético externo es aplicado. En el siguiente gráfico puede observarse la sensibilidad del sensor.

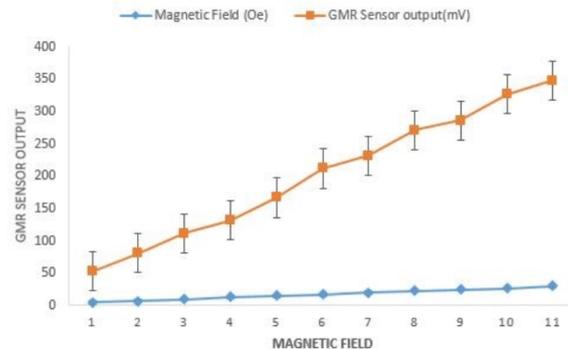


Figura 3-3. Gráfico obtenido en el test de sensibilidad del sensor GMR.

Se proponen sensores magnéticos, para actuar como núcleo para sensores basados en la inmovilización de antígenos (a través de una reacción antígeno-anticuerpo) sobre la superficie del sensor. Es esencial inmovilizar los agentes biológicos para su detección [23].

Una vez que las bacterias se han unido a la superficie del sensor, el anticuerpo específico recubierto con super perlas paramagnéticas circula a través del sistema uniendo de nuevo los antígenos, y se obtiene una estructura anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Se aplica un campo magnético externo y las nano partículas magnéticas producen un dipolo magnético local y esta respuesta es medida por el sensor GMR [23].

Las nano partículas magnéticas ofrecen atractivas posibilidades en el campo de la biomedicina. Abarcan un amplio rango de tamaños, desde unos pocos nanómetros hasta cientos de nanómetros, se podrían comparar con células (10-100 μ m), virus (20-450nm) y proteínas (5-50nm) o un gen (2nm ancho, 10-100nm longitud) [23].

El proceso de muestreo se basa en colocar la muestra a medir en el fondo del recipiente sostenedor, este previamente recubierto con un anticuerpo artificial. Los antígenos se asocian al anticuerpo artificial y la bacteria será inmoviliada en la superficie del recipiente. Ahora las nano partículas magnéticas se asocian a la bacteria. Cada una se marca con una nano partícula magnética. Para atraer todas las partículas al fondo del recipiente, se aplicará un campo magnético apropiado. Como las nano partículas no atacan a las bacterias podrán ser retiradas mediante una técnica de limpieza adecuada [23].

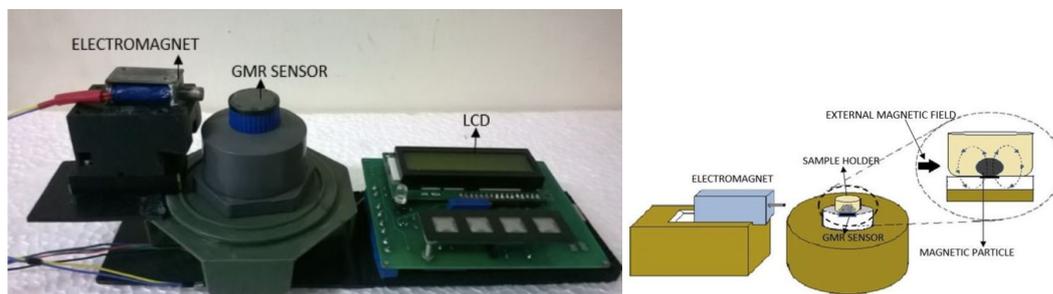


Figura 3-4. Dispositivo experimental.

Concluyendo, las diferencias de concentraciones de nano partículas magnéticas han sido mezcladas con hexano y centrifugadas para posteriormente testearlas con el sensor GMR. El dispositivo tiene gran sensibilidad, y la superficie sensorial ha sido cubierta con diferentes materiales como óxido de silicón, nitruro de silicón y poliestireno. Los resultados indican que el mu-metal (aleación de Fe-Ni de alta permeabilidad) puede reducir el ruido debido a los factores ambientales. En el futuro se espera trabajar en este proyecto para marcar las bacterias y cuantificar la cantidad de ellas que viven en la muestra [23].

3.3.2.3.2 Sistema de detección de bacterias mediante sensor capacitivo con tecnología CMOS.

En esta sección se trata el diseño e implementación de un Semiconductor Oxido-Metal Complementario (CMOS) basado en un sistema sensorial integrado empleando bacteriófagos (virus que infectan exclusivamente a las bacterias) u organismos bacteriófagos como elementos de reconocimiento para la detección de bacterias letales como E.Coli y Salmonella [24].

El sistema se basa en monitorear los cambios en las señales de capacitancia que se dan cuando las bacterias objeto atacan la interfaz sensorial. El sistema se ha diseñado según la tecnología DALSA 0.8 μ m, que consiste en inter-digitalizar la estructura del condensador y la detección de la señal y procesar el circuito. La detección de la señal y el procesamiento se hacen mediante Carga Basada en la Medida de la Capacitancia (CBCM). Los organismos bacteriófagos son inmovilizados en la superficie del condensador y juntos forman la interfaz sensorial. Se puede lograr una sensibilidad de 29.3mV/fF. El sistema opera con 5V en DC y consume un promedio de 1,7 mW [24].

Existen numerosos casos de intoxicación alimentaria en personas y animales domésticos, por ello es necesaria la vigilancia de organismos bacterianos como E.coli y Salmonella tanto en productos de la agricultura como en comida preparada. Una posible metodología para hacer frente a la problemática es el desarrollo de un pequeño, simple y práctico sistema sensorial para monitorizar a tiempo real el organismo bacteriano.

Se describe un microsistema sensor de bacterias a tiempo real que promete una gran versatilidad y aplicabilidad en seguridad alimentaria, seguridad nacional y diagnósticos clínicos. Este sistema sensorial confía en el uso de bacteriófagos específicos, los cuales son virus que reconocen los receptores específicos en la superficie de la bacteria con extrema selectividad y sensibilidad. Los fagos se atan ala superficie bacteriana e inyectan su material genético. En muchos casos, la inyección del material genético también causa la muerte en la bacteria.

La tecnología CMOS capacitiva ofrece, para este sensor, algunas ventajas como su pequeño tamaño, rápida respuesta y bajo coste en la producción en masa [24].

En la siguiente figura se puede ver como sería el diseño del sensor capacitivo CMOS:

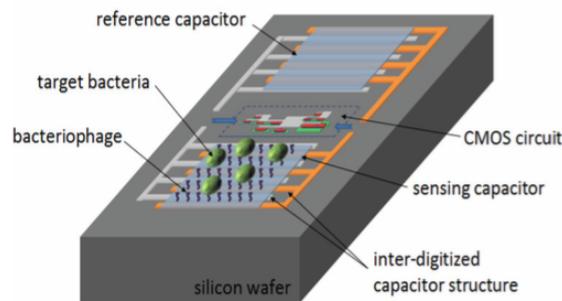


Figura 3-5. Diagrama esquemático del sensor capacitivo CMOS.

El sensor emplea una arquitectura con diferentes condensadores usando condensadores sensoriales y condensadores de referencia para lograr mejorar la resolución y el ruido. Tanto el sensorial como el de referencia tienen idénticas estructuras inter-digitalizadas requeridas para la inmovilización de los fagos y proteger contra la hidratación. Las bacterias objeto consiguen asociarse a los fagos inmovilizados del condensador sensorial, el cual cambia la capacitancia del conjunto de condensadores interrumpiendo el campo eléctrico existente entre las agujas inter-digitalizadas como se muestra en la figura.

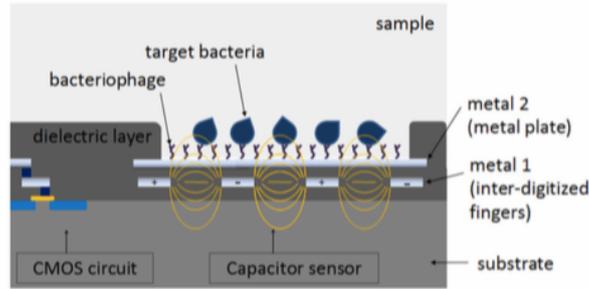


Figura 3-6. Sección transversal de la interfaz sensorial.

De este modo el circuito mide la diferencia de capacitancia entre el condensador sensorial y de referencia y prevé al circuito de un voltaje de salida.

El circuito CMOS está diseñado para convertir los cambios en las señales de capacitancia, con una resolución de unos pocos de femtoFaradio en señales de voltaje medibles. Se usa un circuito basado en la Medida de la Carga Basada en la Capacitancia (CBCM), teóricamente el circuito puede detectar hasta 1aF de cambio en la capacitancia [24].

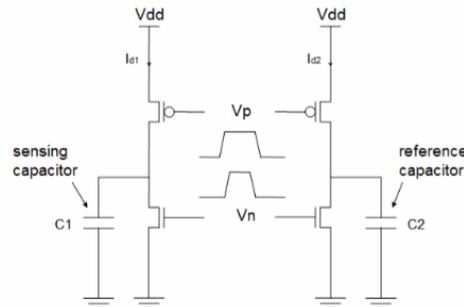


Figura 3-7. Representación esquemática del CBCM.

Los transistores son conducidos por dos señales de no solapamiento (V_p y V_n) para evitar la corriente cruzada entre la fuente de alimentación (V_{dd}) y la tierra.

Tradicionalmente, la tecnología de fagos es centralizada en la descontaminación y hoy en día se usan como receptores de reconocimiento de bacterias.

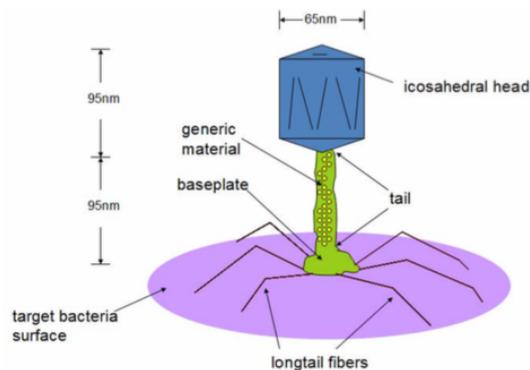


Figura 3-8. Estructura de un bacteriófago.

Los bacteriófagos son virus que reconocen receptores específicos con extrema selectividad y sensibilidad en la superficie de las bacterias. Se ha aprovechado la ventaja de estos virus para reconocer las bacterias objeto

mediante los receptores funcionales localizados en sus colas. Los fagos son ubicuos en la naturaleza, inofensivos a los seres humanos, mucho más baratos y más fáciles producir que los anticuerpos, presentan una vida útil más larga que estos últimos. Pueden ser inmovilizados de manera semejante los anticuerpos o pruebas de ADN. Por esta razón, el dispositivo presentado es simple, rápido y de bajo coste comparado con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el método ELISA [24].

3.3.2.3.3 Estudio experimental a la respuesta se un sensor capacitivo táctil a la bacteria E.Coli.

La *Escherichia coli* o E.Coli es el patógeno dominante en Infecciones del Tracto Urinario (UTIs) en más del 80% de los casos. Como se ha mencionado ya, los métodos tradicionales para detectar este tipo de infecciones son caros y lentos. En esta sección se estudia la posibilidad de diagnosticar UTIs mediante el uso de un sensor capacitivo [25].

Las infecciones del tracto urinario (UTIs) son las infecciones bacterianas más comunes en las cuales una o más partes del tracto urinario se acaban infectando. La bacteria intestinal E.coli, infecta entorno al 80%-85% de todas las infecciones del tracto urinario. *Staphylococcus saprophyticus* es encontrada en el 15% de los casos. Otras como *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* también con causantes de UTIs [25].

El diagnóstico de UTIs se realiza normalmente con métodos convencionales de análisis. Pero la concentración mínima de la bacteria para su detección es 10^5 colonias/mL. Es un método costoso, lento (24-48h) y tedioso. Existen tiras medidoras, pero no tienen suficiente sensibilidad. Estas tiras detectan una enzima llamada *leukocyte esterase* que indica alta actividad de leucocitos. UTIs pueden causar serias secuelas si no se tratan. Por lo tanto, es de vital importancia un dispositivo capaz de detectar rápidamente este tipo de infecciones. Las pruebas experimentales se realizan con un líquido de laboratorio con crecimiento de bacterias E.coli.

Los sensores táctiles capacitivos se han ido haciendo populares por razones de usabilidad, robustez, coste y eficiencia. Actualmente, se usan en un amplio rango de aplicaciones para ordenadores, dispositivos industriales y teléfonos móviles. Este tipo de sensor trabaja en detectar el cambio de la capacitancia cuando un objeto, tal como un dedo humano, toca el sensor. Hay dos tipos principales de métodos sensoriales capacitivos, capacitancia mutua y auto-capacitancia. En el siguiente capítulo se estudia con más detalle la tecnología capacitiva.

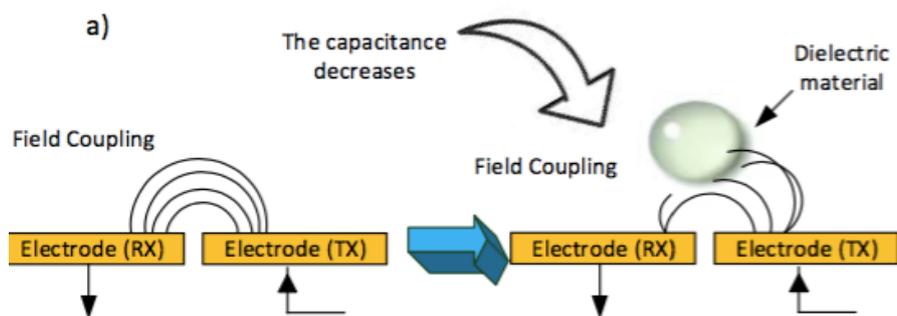


Figura 3-9. Método de detección de capacitancia mutua.

En **capacitancia mutua**, un campo electromagnético es generado y detectado en el receptor cuando una corriente eléctrica es aplicada en el transmisor. Cuando un objeto toca el área del sensor, algunos campos son absorbidos y, la capacitancia disminuye. Este tipo de capacitancia, permite medir al sistema cada nodo individualmente y detectar múltiples toques. Este método se usa con algunos materiales (dieléctricos), los cuales permiten la carga si están juntos. Si un dedo u otro objeto conductor vuelve a cerrar los dos objetos conductores, la carga entre campos de los dos objetos cambiará [25].

En **auto-capacitancia**, C_p es una capacitancia parásita. Cuando un objeto se aproxima al área del sensor, C_T (capacitancia táctil) se añade al sensor. Cuando un dedo o un dieléctrico toca la pantalla, cambia la auto-

capacitancia del electrodo. Cada electrodo representa diferentes pares coordinados y están conectados individualmente al controlador. Este decide la posición del toque según que fila o columna está más cerca de la localización del toque [25].

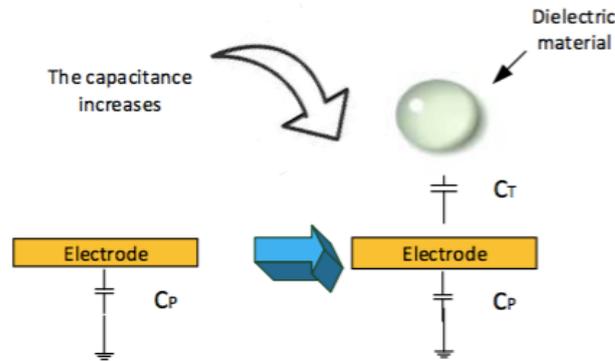


Figura 3-10. Método de detección de auto-capacitancia.

Las pruebas experimentales llevan a utilizar la auto-capacitancia en este tipo de sensor.

Para la preparación de la muestra objeto se usa un medio de cultivo compuesto de una solución enriquecida usada para el crecimiento de organismos, en este caso para *Escherichia coli*. En este experimento se usa caldo triptico de soja (TSB). La *E.coli* se mezcla con el medio de cultivo a 150 rpm durante 24 horas antes de su uso. Se hacen diluciones de la muestra con TSB para adquirir la dilución deseada [25].

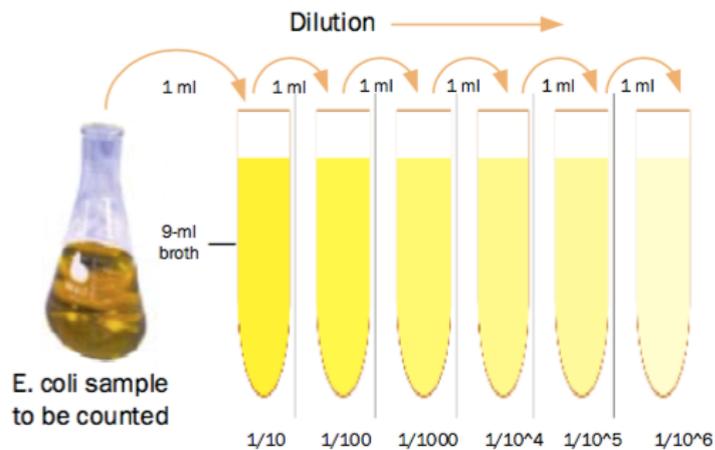


Figura 3-11. Procedimiento de dilución utilizando TSB.

Se utilizó un regulador universal CY3280-20x66 CapSense y un módulo simple de pantalla táctil CY3280-BSM Cypress, instalando el software adecuado en un ordenador. Se cubren los componentes electrónicos de la pantalla táctil con polipropileno (PP). Un paciente voluntario cede muestra de orina, la cual es testada 3 horas después de ser obtenida [25].

Con una pipeta, se echa gota a gota cada solución en la superficie de la pantalla táctil. Mediante un contador (RAW Count value) se compara cada muestra con el estado inicial del contador. Se realiza seis veces la prueba para cada muestra, con el fin de obtener resultados concluyentes. Cuando la capacitancia se mantiene constante (para 100 microlitros), se puede determinar la sensibilidad del sensor [25].

Se realizaran pruebas con el medio de cultivo, con el líquido *E.coli* y con la muestra de orina tomada, para poder comparar los resultados.

A) Medio de cultivo:

Se estudia en primer lugar la respuesta del sensor táctil al medio de cultivo usado para diluir la muestra. El resultado será comparado con la respuesta del sensor al líquido E.coli. En la siguiente figura puede verse como el contador RAW aumenta según aumenta el volumen. Se observa que la capacitancia cambia exponencialmente hasta un volumen de 100 microlitros donde se mantiene constante.

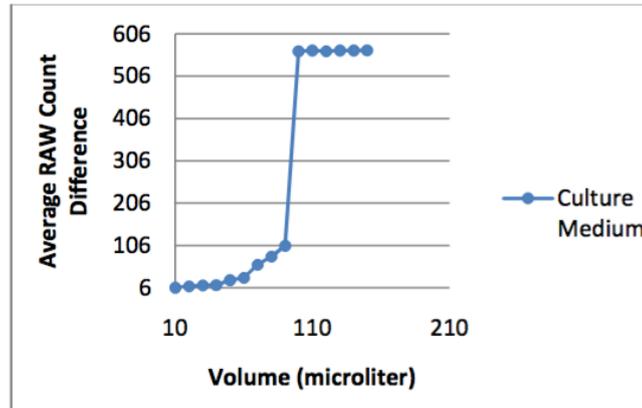


Figura 3-12. Respuesta del sensor táctil en el contador RAW con el aumento de volumen.

B) Líquido E.coli:

El líquido E.coli fue cultivado en caldo triptico de soja (TSB). Fueron necesarias 10^{-1} diluciones para obtener el número de colonias E.coli usadas en esta prueba. La respuesta del sensor al líquido E.coli, como puede verse en la siguiente figura, es idéntica a la respuesta con el medio de cultivo. Entonces, el contador RAW se incrementa según aumenta la concentración E.coli.

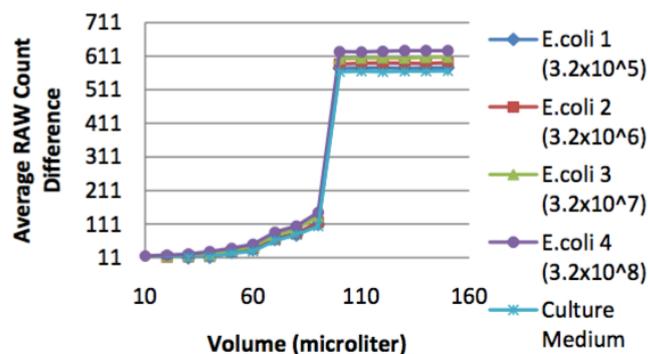


Figura 3-13. Respuesta del sensor táctil en el contador RAW al líquido E.coli en diferentes concentraciones y al medio de cultivo.

C) Muestra de orina con líquido E.coli:

Ahora se mezclan 9900 microlitros de orina con 100 microlitros de E.coli en cuatro concentraciones diferentes. En la siguiente figura puede verse como la muestra de orina mezclada con E.coli da resultados más altos comparando con el líquido E.coli.

La respuesta es similar a las pruebas anteriores. La sensibilidad calculada fue de 22 conteos por pF.

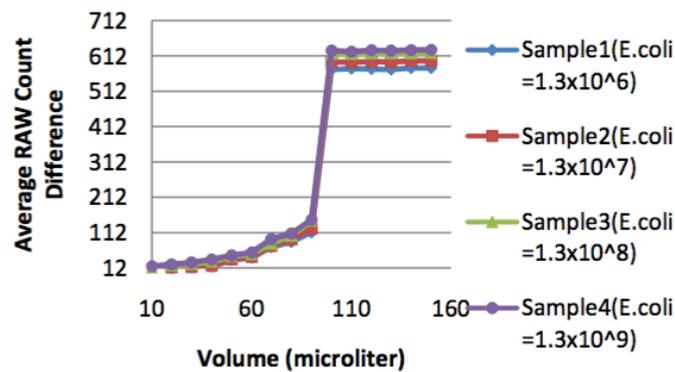


Figura 3-14. Respuesta del sensor táctil en el contador RAW a muestra de orina mezclada con E.coli.

Para concluir, cabe decir que la respuesta del sensor a las soluciones usadas en las pruebas es consistente. El sensor usando la tecnología capacitiva es viable para diagnosticar UTIs. Una de las limitaciones se debe al sistema eléctrico del circuito, es posible que se den altas lecturas si el voltaje incrementa.

3.3.2.3.4 Caracterización y evaluación representada de un sensor con una delgada película para detectar bacterias Gram-negativas.

Alrededor del 90-95% de bacterias Gram-negativas producen endotoxinas, las cuales son un asunto importante para las industrias alimentarias. E.coli y salmonella son ejemplos de gram-negativas encontradas comúnmente en muchos de los alimentos crudos. Recientemente, la E.coli brotó en Alemania y Europa llevándose consigo 31 fallecidos e infectando a cientos de personas. La causa del brote fue la consumición de habas en una granja del norte de Alemania. Las endotoxinas y los polisacáridos (LPS) son parte de la membrana exterior de las células gram-negativa donde ocurre la actividad endotóxica. La detección de endotoxinas ha sido investigada usando diferentes técnicas, pero hasta ahora se han usado métodos tradicionales, lentos y costosos. En esta sección, se describe un novedoso sensor con microelectrodo digital para la detección de endotoxinas [26].

El primer diseño del sensor con fina película interdigital fue fabricado en un microscopio con unas dimensiones de $25 \times 75 \text{ mm}^2$ por técnicas de "micromachining". Previamente limpiada la placa de cristal, se depositan 300 \AA de Cromo (Cr) y 700 \AA de Oro (Au) en la superficie de la placa de cristal por un evaporador E-beam. Después el electrodo interdigital (IDT) fue sellado por fotolitografía usando un fotoresistente positivo, haciendo de máscara para la capa mojada del metal. Finalmente, del sensor obtenido se elimina parte del fotoresistente [26].

El segundo diseño de la estructura planar de la fina película interdigital, fue fabricada por fotolitografía y grabada con técnicas de Silicona/Dióxido de silicón (Si/SiO_2) en forma de lámina. Esta fabricación tiene un sustrato rígido que aporta ventajas en medidas sin contacto. Los sellos varían según la longitud de onda espacial de la estructura interdigital, mientras que el ancho de los electrodos y el área sensorial se mantiene constante en valores de 25 \mu m y $2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm}$ respectivamente [26].

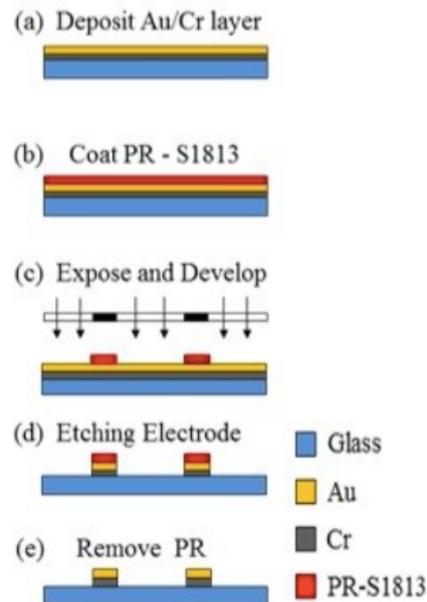


Figura 3-15. Proceso de fabricación del electrodo IDT.

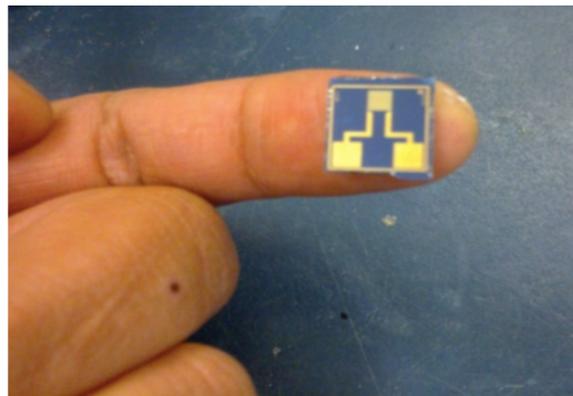


Figura 3-16. Miniatura del sensor tipo película delgada basado en el sensor interdigital.

Todos los sensores se cubren con 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), un grupo amino funcional. APRES ha sido ampliamente usado en aplicaciones biológicas para inmovilización de proteínas. Previamente a la adición de APTES, todos los sensores son inmersos en etanol (96%) durante 1h y enjuagados con agua destilada, luego se pasan por una corriente de nitrógeno. Los sensores limpios son inmersos en una solución (5% v/v) de APTES en etanol (96%) durante 1h a temperatura ambiente. Estos se vuelven a pasar por una corriente de nitrógeno y se esterilizan a 120°C durante 2h. Luego se inmovilizan cubriéndolos con Polymyxin B (PmB) que es un péptido antimicrobial que producen las bacterias gram-positivas. Los sensores se incuban en PmB a temperatura ambiente y algo de agitación durante 24h. El sistema experimental se realiza con un automuestreador LabView con interfaz de alta precisión LCR 821. La frecuencia de operación está entre 12Hz-100Hz con excitación de voltaje de 1 V_{rms} . Los experimentos se conducen a evaluar las estructuras de lipopolisacaridos (LPS) de LPS 0111:B4. Diferentes concentraciones de polisacáridos en el rango de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ – 1000 $\mu\text{g/ml}$ se preparan para los experimentos. Cada muestra se replica tres veces para asegurar reproducibilidad y se hace un promedio [26].

Los resultados de las impedancias características de cada sensor (sensor de cristal y sensor de silicona) se muestran en la siguiente figura, comparando también con respecto del aire.

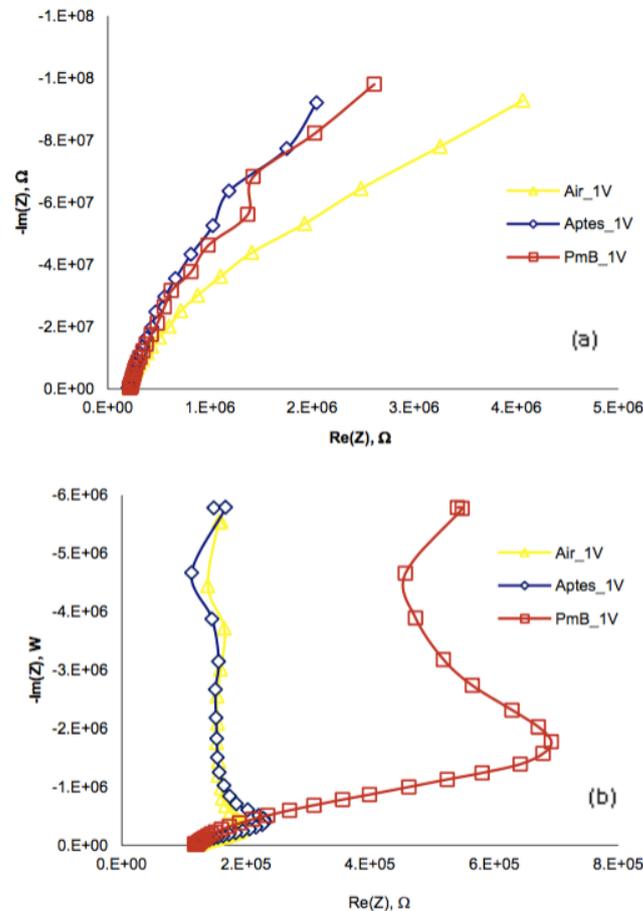


Figura 3-17. Impedancia característica del sensor interdigital con APTES y PmB.

Se puede ver como la impedancia característica de diferentes concentraciones de LPS, para el sensor de silicona, muestra mejores resultados que con el sensor de cristal. Aunque ambos requieren mejorar la sensibilidad y selectividad. Las impedancias características fueron obtenidas usando un método de espectroscopia [26].

3.3.2.3.5 Biosensor de impedimetría para la detección de bacterias.

Los biosensores basados en impedancia tratan de un microelectrodo interdigitalizado. La detección por impedimetría se basa en un principio simple, cuando un medio dieléctrico entra en contacto con un campo eléctrico resulta un cambio en la impedancia. Las propiedades dieléctricas de la bacteria son el objetivo de este estudio. Normalmente, un bioreceptor es inmovilizado en la superficie del sensor para capturar el objetivo y llevarlo dentro del campo eléctrico del sensor. La impedancia de los microelectrodos interdigitalizados ha sido previamente modelada por modelos de circuitos equivalentes (ECMs). Las suspensiones de bacterias han sido también modeladas basándose en ecuaciones derivadas y ECMs. Pero es necesario combinar modelos de biosensores y bacterias para investigar y optimizar la representación de un biosensor para la detección de bacterias.

En esta sección, se revisa un modelo de elemento finito electrostático. El modelo se usa para analizar la sensibilidad del sensor propuesta para detectar bacterias de diferentes diámetros. El objetivo del estudio es ayudar a entender y desarrollar los biosensores de impedancia, por lo que su sensibilidad mejorara hasta los niveles necesarios para la exitosa detección de bacterias [27].

El programa informático ELECTRO v.6.2. se usa para desarrollar y analizar el modelo electrostático. ELECTRO consiste en un simulador 2D de campo electrostático.

El modelo 2D del sensor propuesto es creado en ELECTRO, el modelado se basa en la situación ideal en la cual m bacterias son alineadas en una sola fila en el espacio G , entre los electrodos.

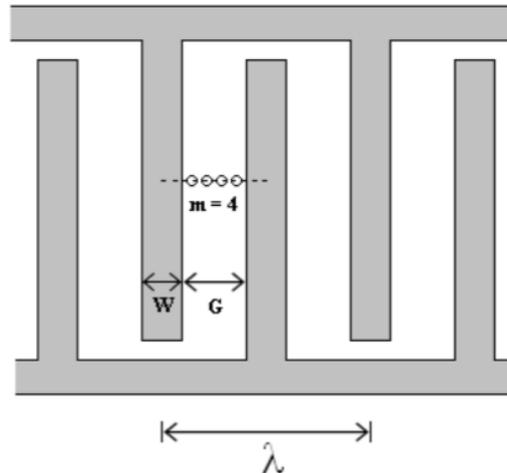


Figura 3-18. Vista esquemática de la disposición de las bacterias en el electrodo.

La sensibilidad del sensor para diferentes dimensiones de bacterias se investiga introduciendo distintos diámetros, d , sobre la superficie del sensor. Y resulta que, la capacitancia, C_0 , para un sensor de electrodos de $3\mu\text{m}$ de ancho y un espacio de $4\mu\text{m}$, comparando con el caso de que la bacteria no este presente en el sensor ($d=0$), C_0 inicialmente decae con el incremento del diámetro [27].

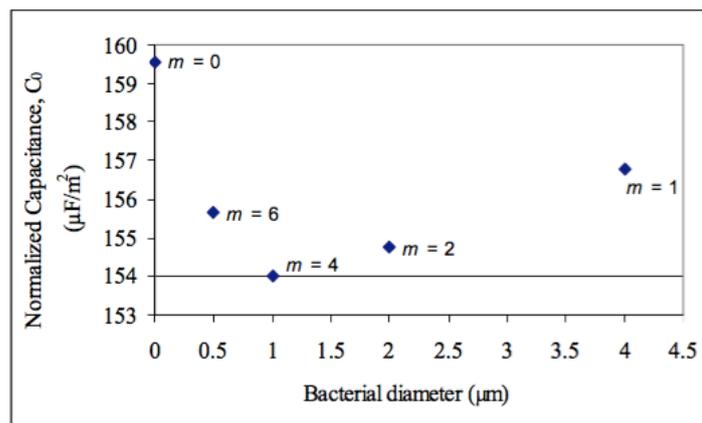


Figura 3-19. Capacitancia según diámetro de bacteria.

El modelo electrostático de un biosensor de impedancia ha demostrado que el biosensor puede ser optimizado para la detección de bacterias de distintos tamaños.

3.4 Tecnología de sensorización capacitiva

La tecnología capacitiva nos permite tener un sensor robusto y sensible a las mediciones, a la vez que sus componentes son sencillos y no generan grandes costes.

Se decide, por ello, hacer uso de la tecnología capacitiva para este tipo de sensor. Las ventajas que presenta este tipo de tecnología son [20]:

- El precio del sensor sería reducido al utilizar componentes electrónicos estándar.
- Los sensores capacitivos son ampliamente utilizados en la industria y con bastante eficiencia, por ello se considera que adaptarlo para otro sector como el sanitario, podría ser beneficioso.
- Cumplen por su propia configuración interna el requisito de evitar el contacto entre los electrodos y el paciente.

- La resolución de los sensores capacitivos en distancias cortas es bastante elevada.
- El parámetro más relevante para producirse alteraciones en la frecuencia de trabajo en los sensores capacitivos, son las variaciones del dieléctrico producido entre los electrodos.

3.4.1 Sensores capacitivos

Los sensores capacitivos son dispositivos electrónicos basados en la variación de la capacidad entre sus conductores (electrodos), que suelen ser dos placas metálicas, entre los que se encuentra un material aislante llamado dieléctrico [28].

Cada material posee su constante dieléctrica según sus propiedades.

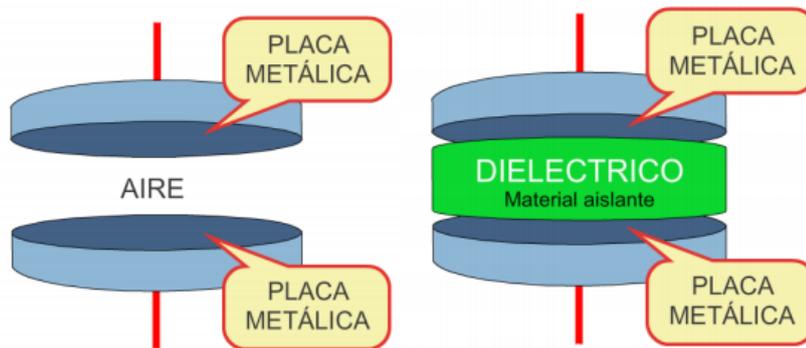


Figura 3-20. Esquema electrodos.

Los materiales dieléctricos que se polarizan dentro de un campo eléctrico son capaces de almacenar cargas, y la constante dieléctrica indica cuánto más se polariza respecto del vacío.

Se detallan valores de constante dieléctrica de algunos materiales comunes utilizados en la industria:

- Acero: 98
- Agua: 80
- Alcohol: 25.8
- Caucho: 2.5 a 35
- Polietileno: 2.3
- Aire: 1.000264

Cuanto más alto es el valor de la constante dieléctrica, más fácil se polarizará el material, y más cargas se necesitan para equilibrar el campo, por lo que almacena más energía y mayor será la capacidad. La capacidad siempre es una cantidad positiva, que depende del dieléctrico como de la geometría de los electrodos. Para el caso de los sensores capacitivos, detectan mejor los materiales con alta constante dieléctrica [28].

Estos sensores se emplean para la identificación de objetos, funciones contadoras, y toda clase de control de nivel de carga de materiales sólidos, líquidos o como sensores de humedad. También son utilizados para muchos dispositivos con pantalla táctil, como teléfonos móviles o computadoras ya que el sensor percibe la pequeña diferencia de potencial entre membranas de los dedos eléctricamente polarizados de una persona adulta.

La principal ventaja de estos dispositivos es que no necesitan el contacto físico para detectar. A continuación, se mencionaran otras ventajas y desventajas de estos dispositivos.

Algunas ventajas a destacar son:

- Detectan sin necesidad de contacto físico.

- Vida útil larga.
- Cadencias de funcionamiento elevadas.
- Multitud de configuraciones de instalación.
- Capacidad de “ver” a través de algunos materiales.

Cuentan con desventajas como:

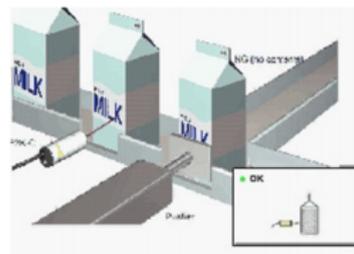
- Alcance de detección corto dependiente del material a detectar.
- Muy sensibles a factores ambientales.
- Puesta en servicio, ya que dependiendo del material a detectar es importante ajustar la sensibilidad. Para materiales con constante dieléctrica baja (papel) habría que aumentarla y para materiales con constante dieléctrica alta (metales o líquidos) habría que disminuirla. Es por ello que requieren bastante control.

Los sensores capacitivos resultan de gran utilidad en el sector industrial, ya que permite la detección de materiales aislantes y conductores, como metales. El material a detectar puede ser sólido o líquido, polvoriento o granulado, etc. El alcance depende de la constante dieléctrica del material, normalmente cualquier material con constante dieléctrica mayor de 2 podría detectarse.

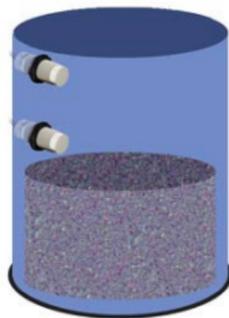
Algunos ejemplos de aplicaciones cotidianas de sensores capacitivos son las siguientes:



Detección de llenado de polvo



Detección de líquidos envasados



Detección nivel en tanque



Detección de nivel indirecto

Figura 3-21. Ejemplos de aplicación para sensores capacitivos.

3.4.2 Sensores capacitivos basados en oscilador

Los sensores capacitivos basados en oscilador, actualmente destacan dentro de la tecnología capacitiva. La forma más sencilla de medir la capacidad es mediante osciladores. El principio de trabajo de estos es generar una señal sinusoidal, donde una bobina y un condensador han impuesto la frecuencia. La frecuencia de oscilación es un parámetro determinante para evaluar la capacidad a medir [29].

Aparte de las ventajas mencionadas anteriormente, cabe destacar:

- En frecuencias elevadas poseen gran sensibilidad frente a variaciones en la capacidad medida.

- Ante vibraciones, cambios de temperatura, cambio de tensión de alimentación u otros factores externos; la frecuencia se mantiene estable.

Un sensor capacitivo está compuesto por distintos elementos, los cuales se pueden ver en el esquema siguiente:

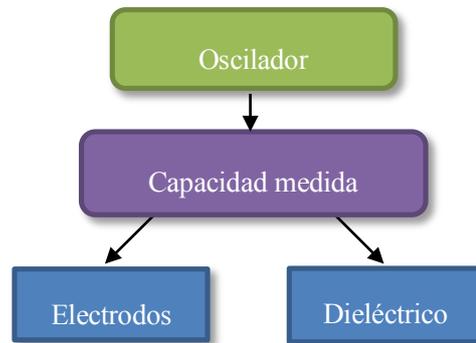


Figura 3-22. Esquema partes de un sensor capacitivo.

El primer elemento, el **oscilador**, consiste en un circuito electrónico, que utilizando componentes activos (transistor, circuito operacional) y una red resonante (bobina, condensador), produce una señal electrónica repetitiva que puede ser una onda senoidal, cuadrada, triangular, etc. El circuito que forma el oscilador permite, a través de una fuente de baja frecuencia o corriente continua, obtener señales de corriente alterna. La esencia del oscilador es generar una señal periódica propia, sin necesidad de tener que aplicar señal de entrada [29].

Mediante cambios en la capacidad producida entre los electrodos, se pueden obtener variaciones en la frecuencia de trabajo aprovechando la sensibilidad del sensor.

La **capacidad medida** se compone de dos partes, electrodos y dieléctrico existente entre ellos. Son componentes esenciales para determinar aplicaciones y sensibilidad del sensor.

- **Electrodos:** en un sensor capacitivo, los electrodos se describen como dos placas metálicas con forma geométrica y tamaño determinado, conectados a la salida del oscilador. Según la señal alterna emitida por el oscilador variará la capacidad medida. Tienen la función de crear un condensador entre las dos placas.
- **Dieléctrico:** se trata de un aislante que tiene la propiedad de formar dipolos eléctricos en su interior bajo la acción de un campo eléctrico. Evita el paso de corriente, y tiene la función de aumentar la capacitancia del condensador formado entre los electrodos.

Tras describir la composición de un oscilador y sus elementos, se estudian los osciladores de radiofrecuencia que son los más adecuados a las exigencias del presente trabajo. Los osciladores de radiofrecuencia más adecuados son los siguientes:

- Osciladores Pierce
- Osciladores Colpitts (LC)

3.4.2.1 Osciladores Pierce

Las configuraciones más comunes para osciladores, usando cristales, son; el discreto, de circuito integrado (IC) y el medio puente RLC. El discreto de Pierce es adecuado si se requiere buena estabilidad en la frecuencia y un circuito sencillo. Si prevalece la necesidad de bajo coste y capacidad de interface digital sencilla, será mejor opción un oscilador Pierce con circuito integrado. La mejor opción, para asegurar estabilidad de la frecuencia, es el medio puente RCL [29].

La principal ventaja del **oscilador discreto de Pierce** es que, este diseño desarrolla alta potencia de la señal de salida mientras que disipa poca potencia en el cristal, lo cual es una ventaja. Otra ventaja es que la estabilidad de frecuencia a corto plazo es muy buena (la carga Q en el circuito de entrada es casi tan alta como la Q interna). La única desventaja es que, el oscilador requiere un amplificador de alta ganancia, es necesario

utilizar un solo transistor de alta ganancia o amplificador de etapas múltiples.

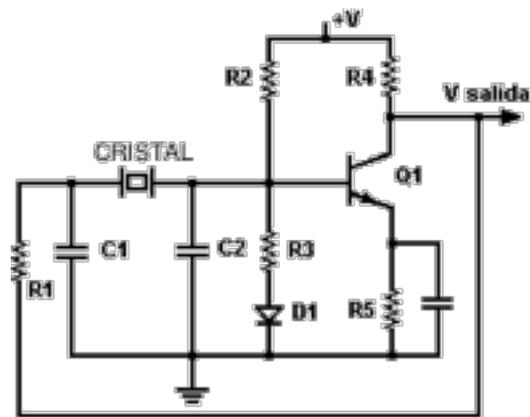


Figura 3-23. Circuito para un oscilador discreto de Pierce de 1MHz.

El **oscilador con circuitos integrados de Pierce**, proporciona menos estabilidad de frecuencia, pero implantándolo con un diseño digital sencillo de IC reduce el costo sobre los diseños discretos. Para asegurar que empiecen las oscilaciones, se invierte la entrada y salida del primer amplificador, y el segundo amplificador convierte la salida del primero a una oscilación completa del punto de corte de saturación, reduciendo los tiempos de descarga y crecimiento como el búfer de la salida del primer amplificador.

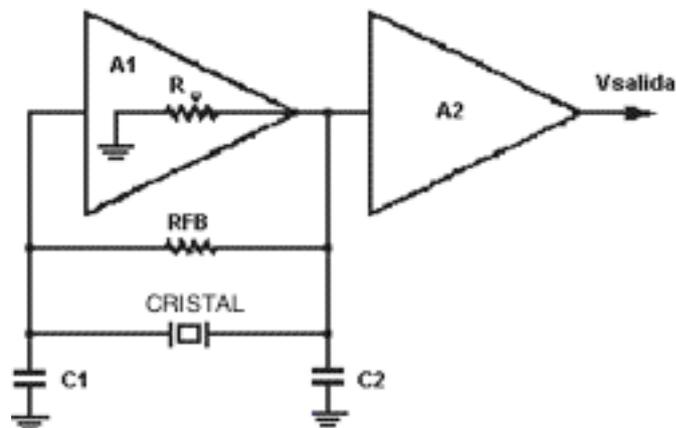


Figura 3-24. Circuito para un oscilador de Pierce IC.

Resumiendo, los osciladores Pierce utilizan un cristal de cuarzo, el cual confiere al circuito gran estabilidad en frecuencia una vez que está en resonancia. Por esa razón, es complicado obtener osciladores con frecuencia variable, lo que hace que sea poco adecuado para la aplicación que se estudia, en la que se necesita un amplio margen de frecuencia donde el sensor capacitivo pueda operar correctamente.

Puede usarse un componente cerámico en vez de cristal de cuarzo, mejora el rango de frecuencia donde operar pero pierde estabilidad en frecuencia. Destacar también que tienen gran sensibilidad a la temperatura ambiental, otro factor a tener en cuenta para descartar en la aplicación que se quiere.

3.4.2.2 Oscilador de Colpitts (LC).

Este tipo de osciladores utilizan un circuito tanque LC para los componentes que determinan el valor de la frecuencia. La operación de este circuito tanque involucra un intercambio de energía entre cinética y potencial. En la figura se muestra la secuencia de operación del circuito tanque LC. La corriente se inyecta en el circuito (instante t_1), intercambiándose la energía entre inductor y capacitor, produciendo el voltaje de salida de corriente alterna correspondiente (desde t_2 a t_4). En la figura se muestra la onda de voltaje de salida.

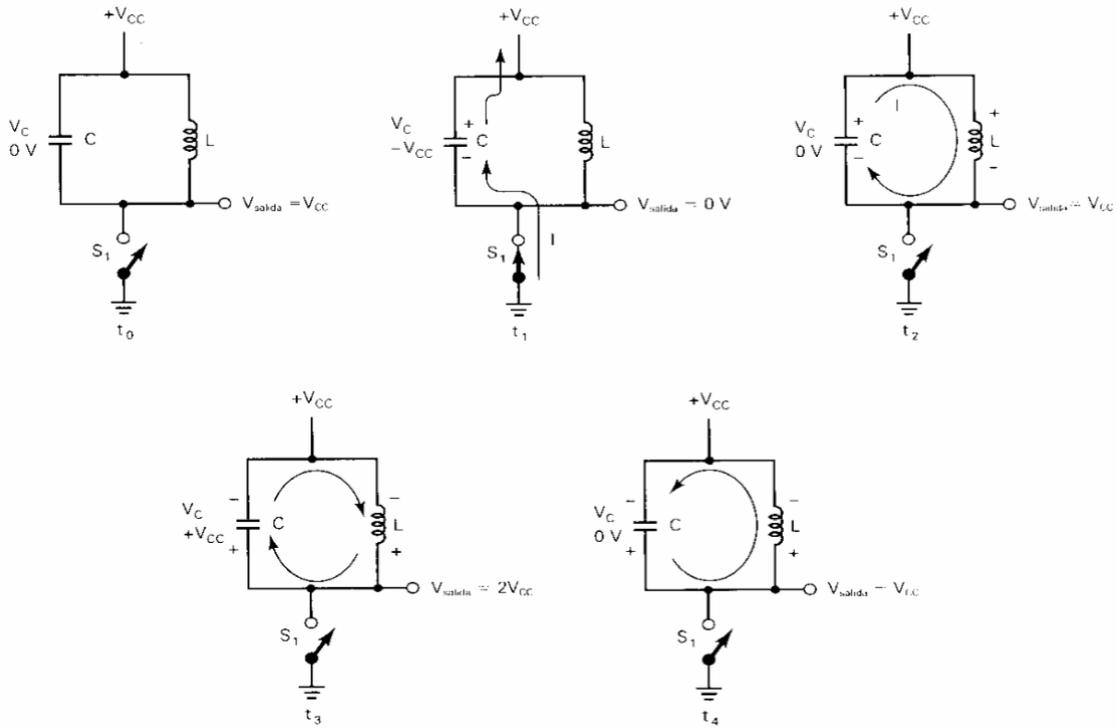


Figura 3-25. Circuito tanque LC: acción del oscilador y efecto del volante.

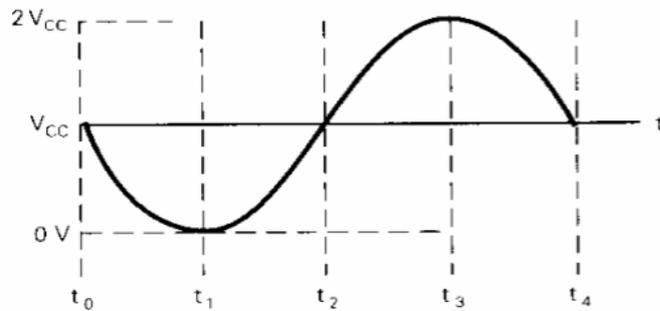


Figura 3-26. Forma de onda de salida

La frecuencia de operación de un circuito tanque LC es la frecuencia de resonancia de la red LC en paralelo, y el ancho de banda es una función del factor de calidad Q del circuito [29]. Para un circuito tanque LC con Q=10 la frecuencia de resonancia se puede aproximar por la siguiente ecuación de la frecuencia de resonancia.

$$f_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \tag{3-1}$$

Entre los osciladores LC los más utilizados son el oscilador Colpitts y el oscilador Hartley. A continuación, se estudia en detalle el circuito de Colpitts por ser el que más se ajusta a las necesidades del sensor.

El oscilador Colpitts se basa en la utilización de un divisor capacitivo en lugar de bobina con punto intermedio variable. En la figura se puede ver como Q1 proporciona la amplificación, Cc proporciona la ruta para la retroalimentación regenerativa, L1, C1a y C1b son los componentes para determinar frecuencia, Vcc es la fuente de voltaje de c.c.

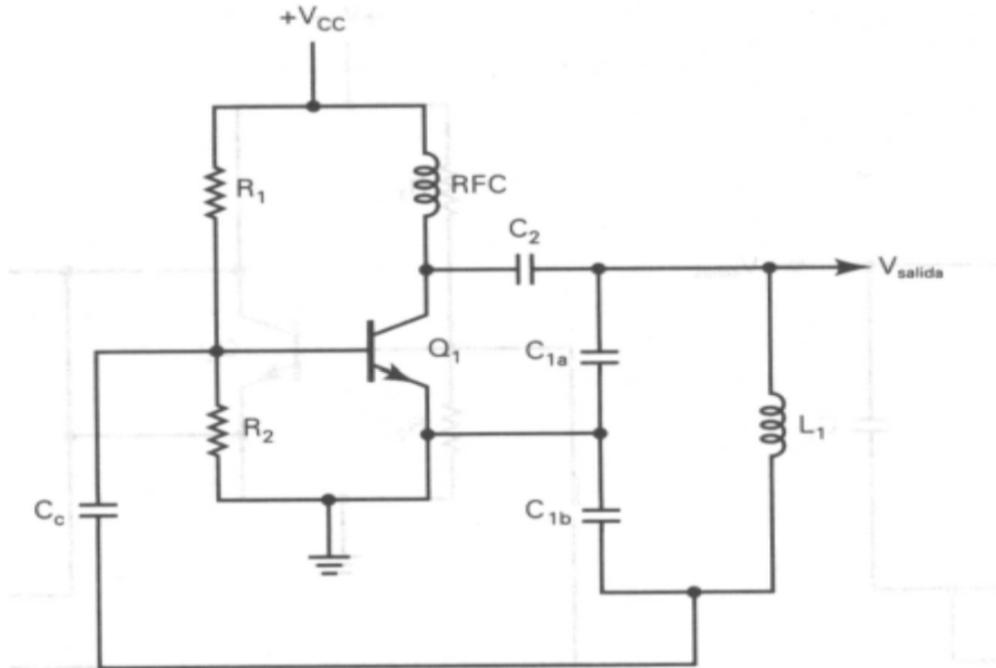


Figura 3-27. Esquemático del oscilador Colpitts

La frecuencia de oscilación del oscilador Colpitts se puede aproximar con la ecuación anterior 1, siendo C:

$$C = \frac{C_{1a}C_{1b}}{C_{1a} + C_{1b}} \quad (3-2)$$

3.4.3 Elección de circuito oscilador para el estudio

El circuito elegido para este trabajo es el oscilador de Colpitts. Como ya se dijo anteriormente, se trata de un circuito electrónico, basado en un oscilador LC, que genera señales alternas de alta frecuencia (superiores a 400Hz). La señal generada tendrá forma senoidal. Este circuito obtiene una señal de salida sin necesidad de que exista una señal de entrada.

Los cambios en la capacidad del circuito tanque provocan que la frecuencia de oscilación se modifique, ya que la frecuencia depende directamente de los valores de bobina y capacidad, como se ha mostrado en las ecuaciones.

4 RESULTADOS

En este capítulo se explica el procedimiento seguido en el diseño y experimentación del sensor. En primer lugar, se muestran los resultados obtenidos del diseño del circuito; en segundo lugar, se realiza una primera simulación del circuito con oscilador de Colpitts; y por último, se muestran los resultados experimentales que llevarán a obtener conclusiones sobre el estudio realizado en este trabajo.

4.1 Resultados de simulación

El circuito elegido para el estudio ha sido con el oscilador de Colpitts. Ya se comparó en capítulos anteriores frente a otros osciladores, determinando que este es el más adecuado para el objeto de este estudio.

Un esquema del oscilador sería el siguiente:

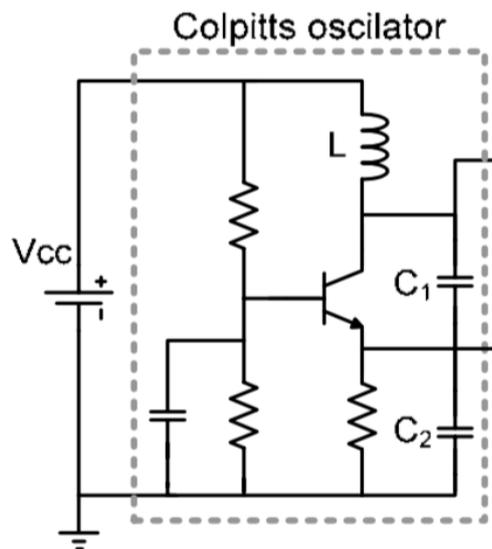


Figura 4-1. Esquema del circuito con oscilador de Colpitts

Para realizar la simulación del circuito, se dibuja con el programa informático Orcad Capture, como se muestra en la siguiente figura:

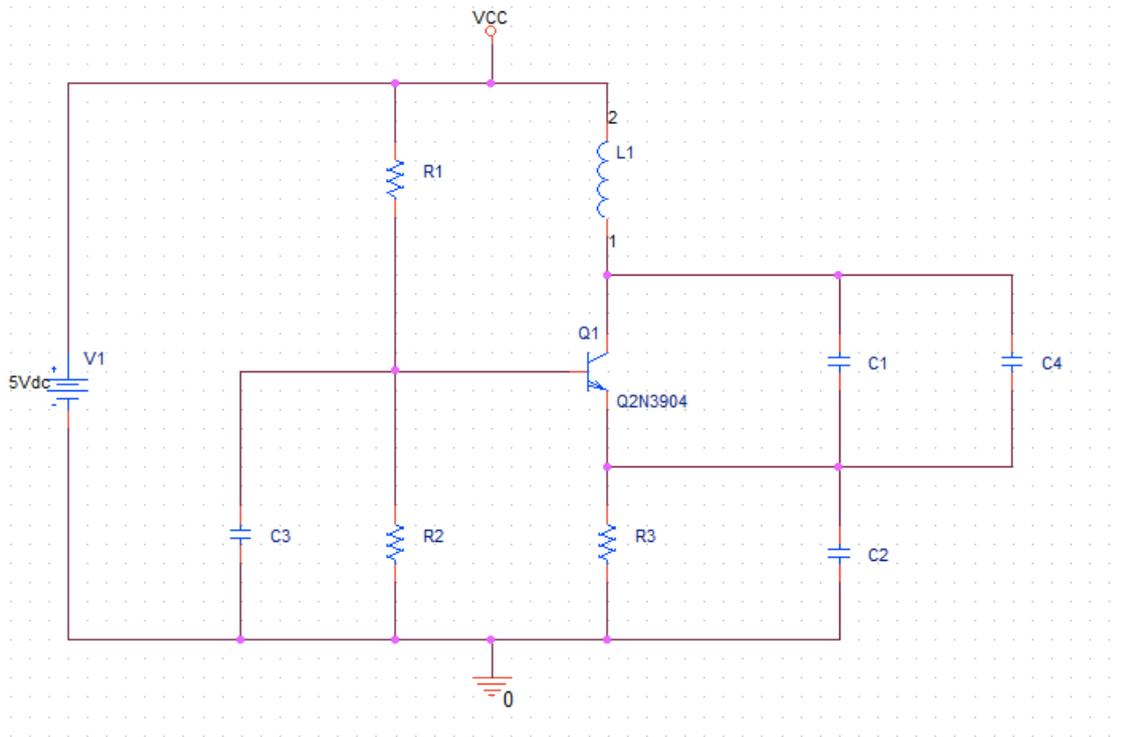


Figura 4-2. Esquemático del circuito con oscilador de Colpitts en Orcad Capture

Partiendo de los siguientes valores para cada elemento del circuito:

- Transistor Q2N3904
- Condensador 1, $C1=5\text{pF}$
- Condensador 2, $C2=10\text{nF}$
- Condensador 3, $C3=100\text{nF}$
- Condensador 4, $C4=50\text{pF}$
- Resistencia 1, $R1=6\text{k}\Omega$
- Resistencia 2, $R2=4\text{k}\Omega$
- Resistencia 3, $R3=200\text{k}\Omega$
- Bobina, $L1=330\mu\text{H}$
- Fuente de tensión, $VDC=5\text{Vdc}$

Se realiza un análisis englobando la variación de valores de cada elemento, hasta llegar al punto de operación más óptimo del circuito.

En primer lugar, se analiza si la presencia de $R3$ es importante y su sensibilidad a distintos valores. Se comienza eliminando esta resistencia, y se comprueba que el circuito pierde la señal, por lo que no es viable prescindir de $R3$.

Para el valor inicial, resulta una señal con tiempo de estabilización aceptable, esto se cumple hasta $100\text{k}\Omega$. Con valores menores ($50\text{k}\Omega$, $40\text{k}\Omega$, $20\text{k}\Omega$...) la señal va empeorando, hasta que se pierde.

Por lo tanto, se sabe que a valores bajos se obtiene una mala señal, y quitar la resistencia no es una opción. Lo más acertado es mantener la resistencia con el valor inicial, $200\text{k}\Omega$, para obtener una buena señal y respuesta.

Por otro lado, se analiza C3. Este elemento tiene influencia en el tiempo de estabilización del circuito. Para el valor inicial, 100nF, el tiempo de estabilización es bueno, pero si se disminuye a 50nF, mejora notablemente. Al seguir disminuyendo, hasta 10nF, la señal de respuesta empeora y el tiempo no mejora considerablemente. Entonces, se opta por perder algo de tiempo de estabilización y no perder calidad en la señal de respuesta. Se establece un valor de 50nF para este condensador.

Las resistencias R1 y R2 permiten establecer tensión continua en el circuito. Forman el punto de polarización del transistor. La suma entre ambas resistencias se fija en 10k Ω , y se comprobará a continuación que es recomendable que R1 sea mayor que R2. En la siguiente tabla se puede ver como responde el circuito, según las distintas combinaciones de valores para R1 y R2.

Tabla 4–1 Análisis de la influencia de R3 en el circuito

R2 (k Ω)	R1(k Ω)	Respuesta
1	9	Tiempo de estabilización casi inexistente. Buena señal.
2	8	Tiempo de estabilización aumenta. Buena señal.
3	7	Tiempo de estabilización aumenta. Señal empeora ligeramente.
4	6	La señal de respuesta transitoria aumenta y el error de estabilización es mayor.
5	5	La señal de respuesta transitoria aumenta y la respuesta estacionaria tarda más en alcanzarse.
6	4	Ídem.
7	3	Ídem.
8	2	Ídem.
9	1	La señal de respuesta estacionaria es muy pequeña y la señal de respuesta transitoria muy grande.

Para la combinación de valores, R2=1k Ω y R1=9k Ω ; se obtiene el mejor resultado.

La variación del valor de la bobina, afecta directamente a la frecuencia de oscilación. Por lo tanto se toman valores por encima y por debajo del inicial, y se recopilan datos de frecuencia. En la siguiente tabla se muestran los resultados de la frecuencia resultante:

Tabla 4–2 Análisis de la influencia de L en el circuito

L (uH)	f (MHz)
2000	0,47
1500	0,55
750	0,75

550	0,9
480	0,95
450	1
420	1,02
390	1,08
360	1,11
330	1,16
300	1,22
280	1,26
260	1,32
240	1,36
220	1,43
200	1,5
180	1,57
160	1,65
170	1,6

Se puede observar que para valores altos de inductancia, la frecuencia tiende a cero; y para valores bajos de inductancia la bobina consigue altas frecuencias.

Adoptando un valor de 330uH para L1, se analizaran los condensadores presentes en el circuito.

El condensador encargado de asegurar la oscilación, será C1. A continuación, se estudia como afecta al circuito con distintos valores, y se valorará la posibilidad de eliminarlo.

Tabla 4-3 Análisis de la influencia de C1 en el circuito

C1 (pF)	Respuesta
5	Buena.
4	No afecta, la respuesta sigue siendo buena.
3	No afecta, la respuesta sigue siendo buena.
2	No afecta, la respuesta es buena y la frecuencia es más limpia.
1	Afecta a la respuesta, produciendo frecuencia

	con ruido.
0 (Se elimina)	Se produce resonancia en el circuito.

Se descarta la opción de eliminar dicho condensador, debido a la resonancia. Por lo que se deduce que debe existir, aunque tenga un valor bajo.

La capacidad que se creará entre las placas, debida a la presencia de bacterias en el líquido ascítico, será la correspondiente a C4. Se analizará la respuesta del circuito a distintos valores y la sensibilidad entre cada transición. Para la sensibilidad se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{|f_2 - f_1|}{\frac{f_2 + f_1}{2}} \quad (4-1)$$

Tabla 4-4 Análisis de la influencia de C4 en el circuito

C4 (pF)	Respuesta
10	Se produce resonancia.
20	La oscilación no es correcta.
30	La respuesta transitoria aumenta y el circuito oscila peor, $f > 2\text{MHz}$.
40	La respuesta es buena, la frecuencia aumenta.
50	La respuesta es buena y el circuito oscila correctamente.
60	El circuito oscila correctamente, pero la frecuencia disminuye.
75	El circuito oscila correctamente, pero la frecuencia disminuye.
100	El circuito oscila correctamente, pero la frecuencia disminuye. Si se varía el valor de L a 90uH, frecuencia aumenta.

Para el análisis de sensibilidad, se tomarán valores de 50pF a 100pF, con transiciones de 5pF. Se observará entorno a que valores se produce una mayor sensibilidad.

Tabla 4-5 Análisis de la influencia de C4 en el circuito

C4 (pF)	f1 (MHz)	C4 (pF)	f2 (MHz)	Sensibilidad
50	1,67	55	1,6	0,043
55	1,6	60	1,54	0,038
60	1,54	65	1,46	0,053
65	1,46	70	1,43	0,021

70	1,43	75	1,38	0,036
75	1,38	80	1,34	0,029
80	1,34	85	1,3	0,03
85	1,3	90	1,27	0,023
90	1,27	95	1,24	0,024
95	1,24	100	1,21	0,024

Se puede observar que la variación de sensibilidad más importante, se experimenta en valores bajos de C4.

En último lugar, se analiza la influencia de C2 en el circuito. Se sabe que un valor elevado se despreciará frente a C1.

Tabla 4–6 Análisis de la influencia de C2 en el circuito

C2 (nF)	Respuesta
10	El circuito oscila correctamente.
20	El circuito oscila correctamente.
30	El circuito oscila correctamente.
40	El circuito oscila correctamente.
50	El circuito oscila correctamente, el tiempo de estabilización es bueno.
60	El circuito oscila correctamente, el tiempo de estabilización mejora con respecto al anterior.
75	El circuito oscila correctamente, el tiempo de estabilización mejora.
100	El circuito oscila correctamente pero el tiempo de estabilización es alto.

La parametrización obtenida para este circuito es la siguiente:

- Condensador 1, C1=5pF
- Condensador 2, C2=10nF
- Condensador 3, C3=50nF
- Condensador 4, C4=50pF
- Resistencia 1, R1=9k Ω
- Resistencia 2, R2=1k Ω
- Resistencia 3, R3=200k Ω

- Bobina, $L1=330\mu\text{H}$
- Fuente de tensión, $VDC=5Vdc$

4.2 Resultados de diseño

Como se comentó en la metodología, se construye el circuito basado en oscilador con Orcad Layout y se obtiene un prototipo del circuito. Teniendo el circuito impreso, se sueldan pines de modo que los componentes puedan cambiarse con facilidad, ya que el comportamiento del circuito puede demostrar que se necesiten modificaciones.

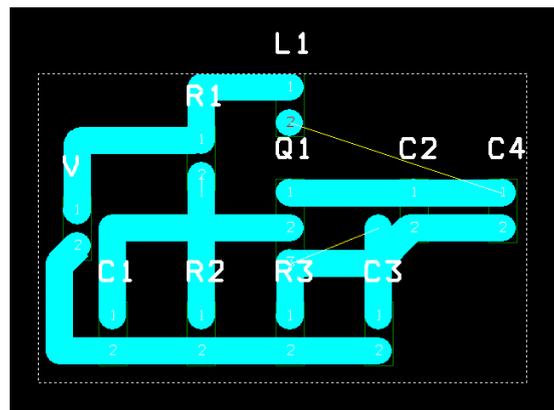


Figura 4-3. Prototipo del circuito



Figura 4-4. Fresadora automática ProtoMatS62

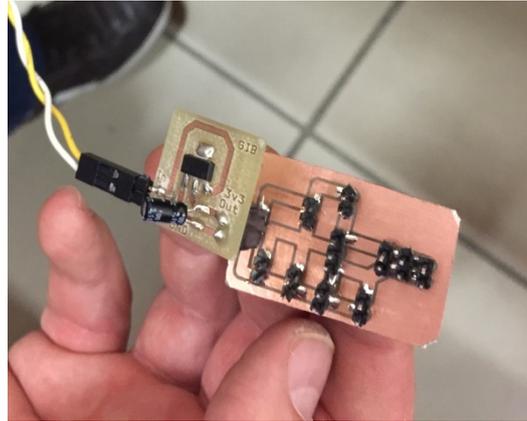


Figura 4-5. Circuito impreso con pines soldados

Una vez teniendo el circuito impreso, se realizan pruebas con osciloscopio, y el circuito no responde correctamente, por ello se recurre a utilizar una adaptación de otro circuito.

De estudios realizados por otros compañeros y el grupo de investigación de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Sevilla, se sabe que el circuito ha necesitado modificaciones y mejoras, el prototipo utilizado será una adaptación de un sensor previo desarrollado en el Grupo de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Sevilla, por Pablo Parodi Félix en su PFC “Mejora del diseño hardware y software de un sensor capacitivo para la medida de la frecuencia cardiaca” [9].

El dispositivo final está compuesto por la placa básica inicial con pines y tres microchips: módulo Bluetooth, dos circuitos operacionales (seguidor de tensión y comparador). El módulo Bluetooth es el encargado de enviar señal inalámbrica al ordenador con los valores de frecuencia obtenidos en cada prueba, se trata de una radio Bluetooth Clase 2, RN42 I-RM de ROVING Networks.

El circuito está implantado a una placa PIC32-PINGÜINO-OTG. La placa PIC32-PINGÜINO-OTG pertenece a una plataforma de hardware y software libre, la cual permite experimentar con microcontroladores [30]. En la siguiente figura se muestran ambas placas conectadas:

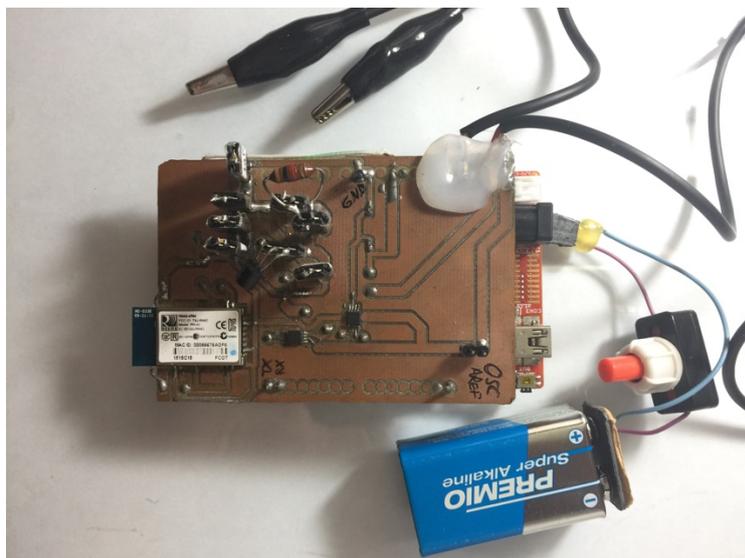


Figura 4-6. Adaptación final del circuito conectado a la placa PIC32-PINGÜINO-OTG

Para facilitar su encendido/apagado se ha instalado un interruptor entre la pila y el circuito, de modo que al finalizar el experimento no es necesario desconectar la pila del dispositivo. La pila utilizada para proporcionar energía al dispositivo, se trata de una pila eléctrica de 9V.

El circuito final se completa con los componentes que hay disponibles y realizando pruebas reales, queda del siguiente modo:

- Transistor Q2N3904
- Condensador 1, se decide eliminar por que su pequeño valor no afecta al circuito.
- Condensador 3, $C3=1\text{nF}$
- Resistencia 1, $R1=2\text{k}\Omega$
- Resistencia 2, $R2=1\text{k}\Omega$
- Resistencia 3, $R3=2\text{k}\Omega$
- Bobina, $L1=1\text{mH}$
- Fuente de tensión, $VDC=9\text{Vdc}$

4.3 Resultados experimentales

Se han usado dos electrodos rectangulares con 10 cm de largo y 4 cm de ancho, uno en cada lado de la bolsa de drenado, que es donde se tomarán las medidas. Se eligen estas medidas por la geometría de la bolsa y disponibilidad de volumen de líquido.

Como se puede observar en la figura, se ha colocado un electrodo rectangular de 10x4 cm en cada lado de la bolsa de desecho (parte inferior). Como ya se comentó, se usa cinta térmica adhesiva (la cual es metálica) para hacer la función de electrodos.

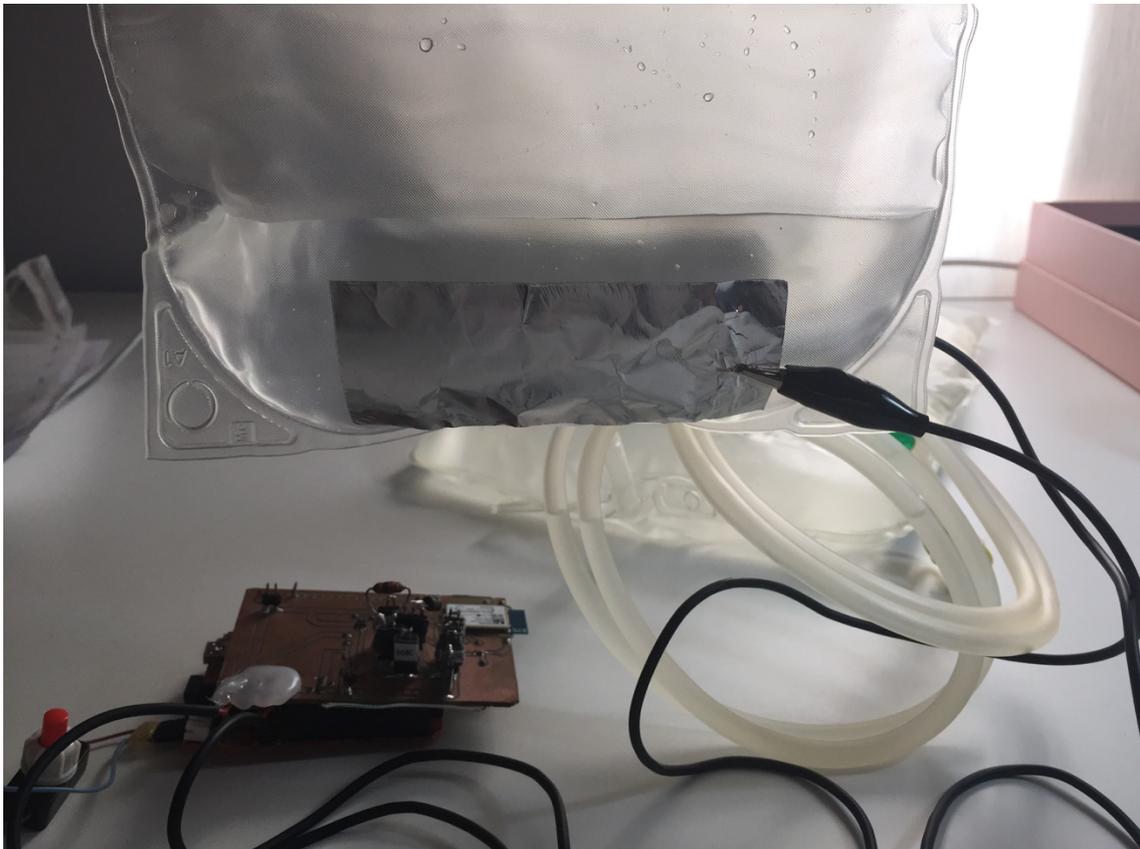


Figura 4-7. Bolsa de desecho con agua destilada y electrodos conectados

Para no alterar la lectura, se sostiene la bolsa en vertical con un soporte fabricado para ello, intentando que se mantenga constante la distancia entre los electrodos y la misma posición del fluido.

La lectura tomada se guardó en un archivo de extensión .txt, y se procesa con un código de MATLAB que puede consultarse en el Anexo A.

Después de comparar con el procesamiento de datos en hoja de calculo Excel, de Microsoft; se decide usar este por resultar más cómodo y ofrecer algunas ventajas en cuanto al graficado.

Se elige 20%pp como valor de partida en la concentración porque se comprueba que con la mayoría de las sustancias a partir de esa concentración la disolución se satura y no es posible conseguir una mezcla homogénea.

Las pruebas que se muestran a continuación se han realizado en dos tandas, en la primera tanda la disolución se compone del soluto y agua destilada como disolvente; y en la segunda tanda la disolución se compone del soluto y solución de diálisis como disolvente.

Los datos recogidos se procesan en los programas informáticos de Matlab y hoja de cálculo Excel. En Matlab, se llama a un archivo de texto que contiene la lectura tomada, con el nombre ejemplo%d.txt siendo la letra d el número de archivo que se le halla asignado. El programa reporta una gráfica mostrando la tendencia de los valores leídos.

La primera sustancia que se añade como soluto, en distintas proporciones, es sal común. Para el caso de la sal común, se tiene una disolución incolora visualmente semejante al agua, los resultados se muestran en el gráfico. Se puede observar que a medida que la concentración disminuye el valor de la frecuencia aumenta.

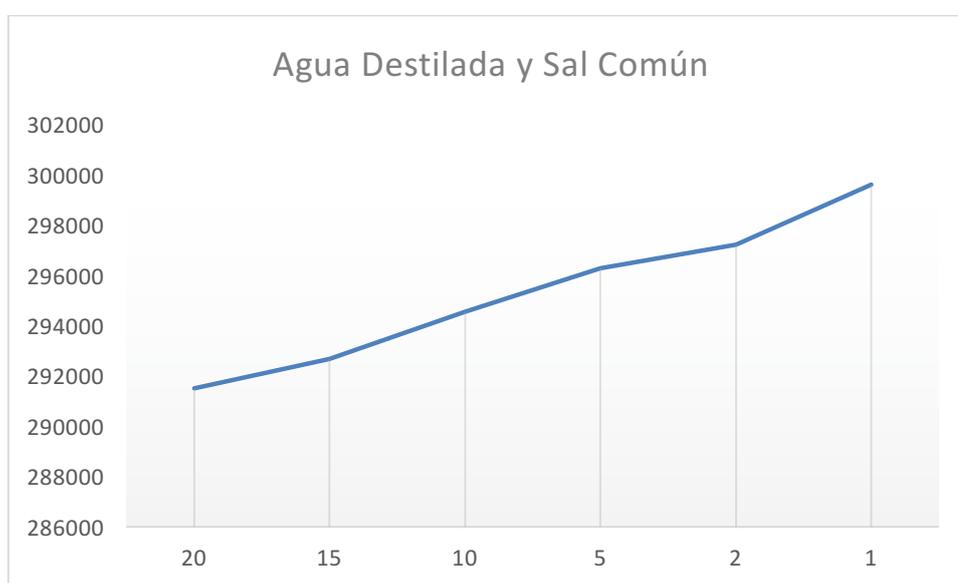


Figura 4-8. Gráfico de la frecuencia obtenida añadiendo sal en distintas proporciones

La frecuencia media obtenida para cada concentración es:

- Agua destilada y sal al 20%pp: 291,512 kHz
- Agua destilada y sal al 15%pp: 292,681 kHz
- Agua destilada y sal al 10%pp: 294,559 kHz
- Agua destilada y sal al 5%pp: 296,278 kHz
- Agua destilada y sal al 2%pp: 297,213 kHz
- Agua destilada y sal al 1%pp: 299,610 kHz

Al ser un resultado lineal permite determinar la concentración de la sustancia añadida, en este caso sal común, para todo el rango de frecuencias.

Para poder comprobar si el circuito detecta cambios al añadir sustancias distintas al agua, se comparan estos resultados con la frecuencia obtenida al medir la bolsa conteniendo únicamente agua destilada, se muestra en el siguiente gráfico. Se observa como la frecuencia medida en agua exenta de sal es significativamente menor que la frecuencia medida con las distintas concentraciones de sal.

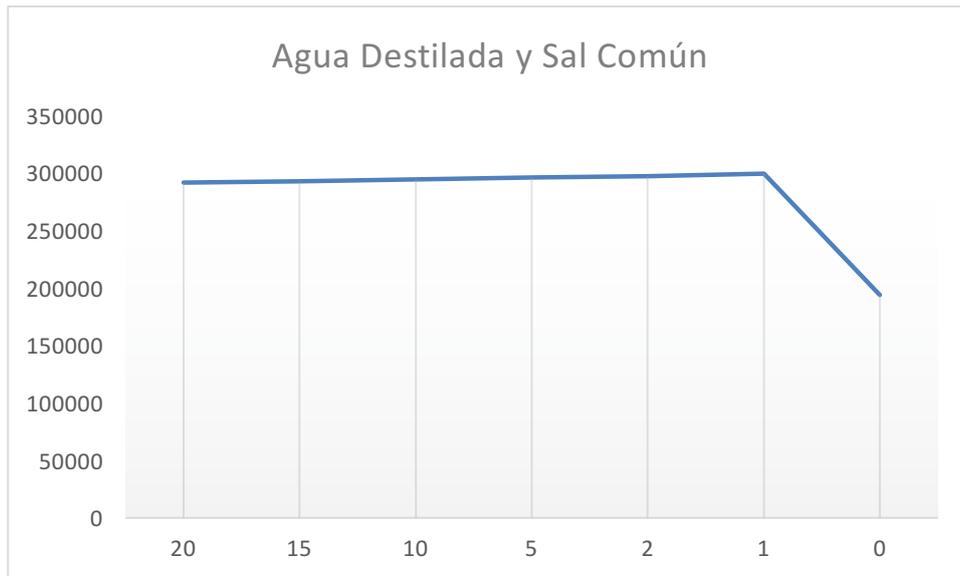


Figura 4-9. Frecuencia medida en agua destilada frente a disolución con sal

Es notoria la variación que hay entre la frecuencia medida cuando se le añade sal y cuando la bolsa solo contiene agua destilada (0%pp) donde el valor medido de frecuencia es 194,076 kHz. Lo que permite comprobar que el sensor es capaz de detectar cambios ante la adición de sustancias en esta disolución.

Se repite la prueba, en este caso, con azúcar comercial. Al tener el azúcar menos densidad que la sal ($\rho=0,72 \text{ kg/m}^3$), se obtiene un volumen mayor de disolución. La disolución es incolora. La tendencia de la frecuencia de oscilación obtenida indica que en el rango comprendido entre 5% pp y 15% pp la sensibilidad del sensor es buena, ya que a altas concentraciones se mide alta frecuencia y a bajas también, solamente en valores medios disminuye y se producen variaciones. Se puede observar el resultado en el siguiente gráfico.



Figura 4-10. Frecuencia medida en agua destilada frente a disolución con azúcar

En este caso, se realiza la prueba con leche y agua destilada. El procedimiento seguido es el mismo que en los experimentos anteriores y, como se puede observar en el gráfico, se detectan picos en la señal medida a distintas concentraciones.



Figura 4-11. Frecuencia medida en agua destilada frente a disolución con leche

La frecuencia media obtenida para cada concentración es:

- Agua destilada y leche al 20%pp: 293,339 kHz
- Agua destilada y leche al 15%pp: 294,232 kHz
- Agua destilada y leche al 10%pp: 293,484 kHz
- Agua destilada y leche al 5%pp: 294,160 kHz
- Agua destilada y leche al 2%pp: 293,571 kHz
- Agua destilada y leche al 1%pp: 293,691 kHz

La disolución obtenida con leche tiene un tono blanquecino y turbio. El resultado para esta prueba no presenta una tendencia lineal. Aún así, el resultado obtenido proporciona información útil para determinar las zonas de mayor sensibilidad del sensor, en este caso, a altas y bajas frecuencia. Sería una aplicación de utilidad para que, teniendo un valor de frecuencia de oscilación medido, se pueda saber en el rango de concentración que se encuentra la disolución.

Se repite el experimento con una crema de manos que contiene 5% de urea, con el fin de probar la sensibilidad del dispositivo a esta sustancia. Se consigue una disolución blanquecina y densa.

Como puede observarse en el gráfico, para altas concentraciones la frecuencia medida es mayor que en bajas concentraciones, siguiendo una tendencia en descenso de los valores medidos según se hacen diluciones.

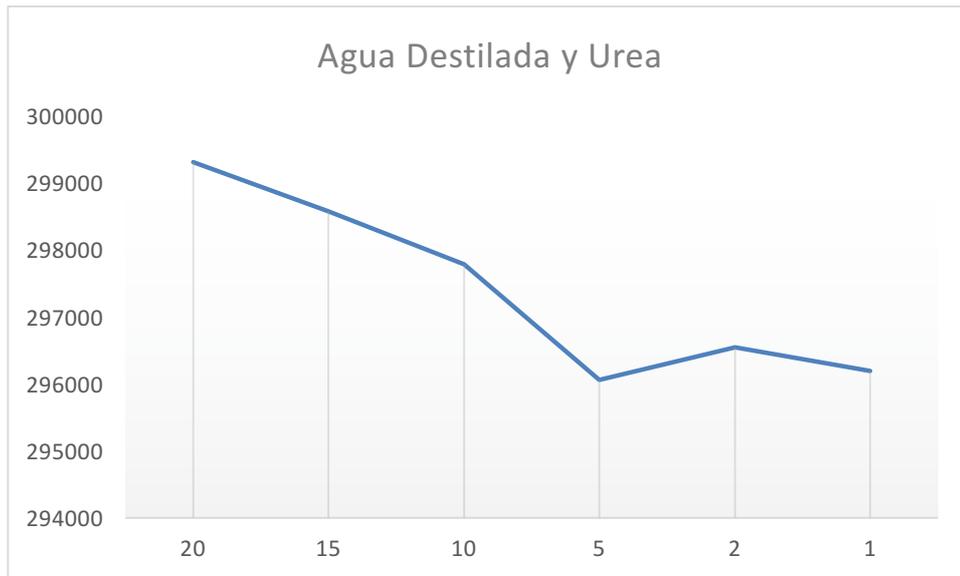


Figura 4-12. Disolución agua destilada y urea

La frecuencia media obtenida para cada concentración es:

- Agua destilada y urea al 20%pp: 299,307 kHz
- Agua destilada y urea al 15%pp: 298,573 kHz
- Agua destilada y urea al 10%pp: 297,778 kHz
- Agua destilada y urea al 5%pp: 296,063 kHz
- Agua destilada y urea al 2%pp: 296,540 kHz
- Agua destilada y urea al 1%pp: 296,192 kHz

El resultado que se obtiene es semejante a la disolución compuesta por sal y agua, pero en este caso el máximo de frecuencia medida se da a concentraciones altas y el mínimo a la concentración menor. En el caso de 5% pp se obtiene un valor que se aleja de la tendencia de la recta, se puede deber a un error en el momento de la medición o perturbaciones externas, es por ello que no influencia la conclusión sacada del conjunto de puntos en general.

En el siguiente caso, se muestra la experiencia realizada con vinagre, con el fin de obtener una disolución con pH ácido y observar el comportamiento sensorial del circuito ante estas condiciones. La disolución tiene un tono levemente amarillento.

En el siguiente gráfico puede observarse como a concentraciones altas de vinagre la frecuencia de oscilación es más baja que a concentraciones menores, en las cuales se sigue una tendencia más lineal teniendo el máximo a la menor concentración.

Esta prueba ha resultado de utilidad para analizar la influencia de la modificación del pH en la disolución, consiguiendo, con la adición de vinagre, una disolución ácida.

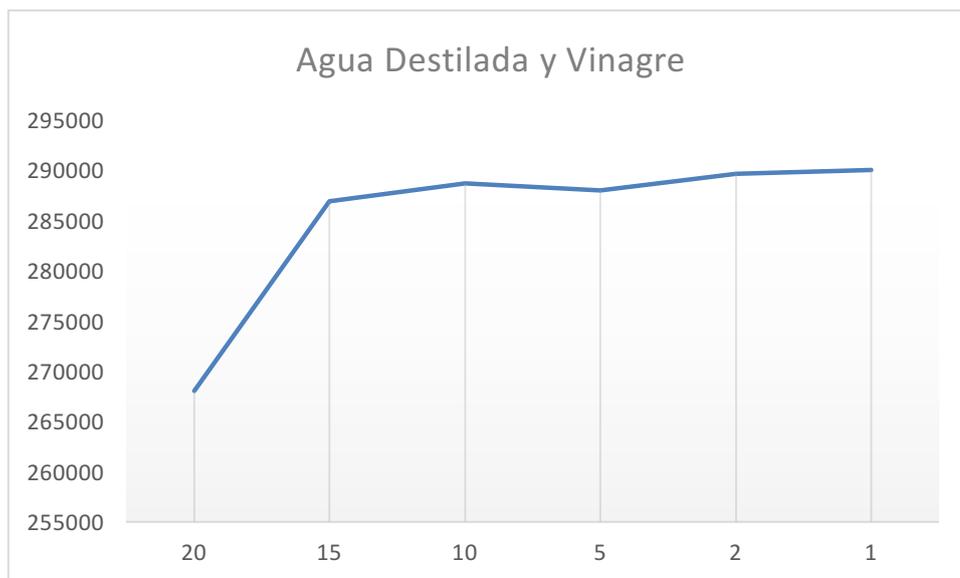


Figura 4-13. Disolución agua destilada y vinagre

La frecuencia media obtenida para cada concentración es:

- Agua destilada y urea al 20%pp: 268,050 kHz
- Agua destilada y urea al 15%pp: 286,882 kHz
- Agua destilada y urea al 10%pp: 288,631 kHz
- Agua destilada y urea al 5%pp: 287,955 kHz
- Agua destilada y urea al 2%pp: 289,580 kHz
- Agua destilada y urea al 1%pp: 289,987 kHz

El resultado muestra que a altas concentraciones la medida de frecuencia es más sensible a distintas concentraciones, puede pensarse que en disoluciones por debajo del 20%pp el sensor no tendrá buena sensibilidad.

Habiendo tomado un primer contacto en el circuito experimentando con agua destilada, compuesto fácil de conseguir, se repiten los experimentos con solución de diálisis. El procedimiento seguido es el mismo, con la misma parametrización en el circuito y toma de medidas para los mismos puntos de concentración.

Se comienza con una disolución compuesta por solución de diálisis y sal común, en las mismas proporciones que se la prueba realizada en el caso de agua destilada y sal común, explicado con anterioridad. En el gráfico puede observarse como la frecuencia de oscilación disminuye a concentraciones bajas de sal, lo que muestra un comportamiento contrario al caso del agua destilada.

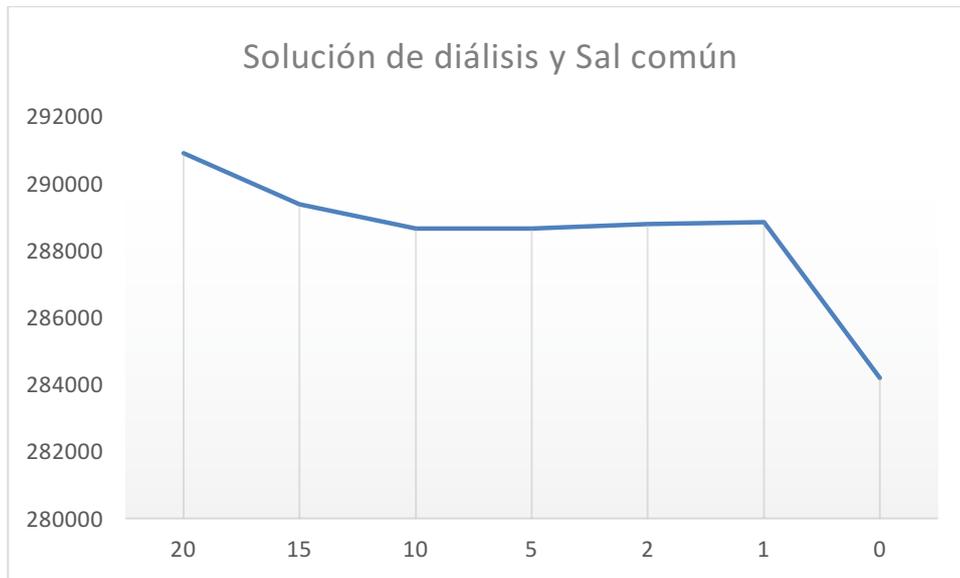


Figura 4-14. Disolución de solución de diálisis y sal común

Se compara, este caso concreto, con la frecuencia que se obtiene cuando la bolsa contiene únicamente solución de diálisis, correspondiente al punto 0% pp del eje horizontal. La frecuencia media medida para la solución de diálisis al 0% pp ha sido de 284,188 kHz.

La frecuencia media medida para cada concentración ha sido de:

- Solución de diálisis y Sal común al 20%pp: 290,888 kHz
- Solución de diálisis y Sal común al 15%pp: 289,365 kHz
- Solución de diálisis y Sal común al 10%pp: 288,641 kHz
- Solución de diálisis y Sal común al 5%pp: 288,643 kHz
- Solución de diálisis y Sal común al 2%pp: 288,764 kHz
- Solución de diálisis y Sal común al 1%pp: 268,837 kHz

La tendencia opuesta entre las diferentes disoluciones, puede deberse a la composición de la solución de diálisis. Esta solución contiene diferentes sales a diferencia del agua destilada, a la cual se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación.

Para la adición de azúcar, el dispositivo muestra una alta sensibilidad en el rango comprendido entre 2% pp y 20% pp. Cabe destacar, que la solución de diálisis contiene glucosa lo que justifica la diferencia con la disolución de agua destilada y glucosa. Es posible que la concentración de azúcar deba ser mayor, que en el caso del agua destilada, para que el sensor pueda detectar esta sustancia, premisa que en este caso se cumple ya que la solución de diálisis contiene glucosa. En el siguiente gráfico pueden verse los resultados obtenidos.



Figura 4-15. Disolución de solución de diálisis y azúcar

La frecuencia media medida para cada concentración ha sido de:

- Solución de diálisis y Azúcar al 20%pp: 287,563 kHz
- Solución de diálisis y Azúcar al 15%pp: 287,295 kHz
- Solución de diálisis y Azúcar al 10%pp: 287,292 kHz
- Solución de diálisis y Azúcar al 5%pp: 288,531 kHz
- Solución de diálisis y Azúcar al 2%pp: 290,176 kHz
- Solución de diálisis y Azúcar al 1%pp: 289,740 kHz

En la siguiente prueba, a la solución de diálisis se le añade leche. A diferencia del caso anteriormente explicado, para la disolución de agua destilada y leche, ahora puede verse una clara tendencia al aumento de la frecuencia de oscilación medida al disminuir la concentración de soluto. Esta contrariedad muestra que la composición de la solución de diálisis provoca un cambio en la frecuencia medida con respecto a la disolución de agua destilada. En la siguiente gráfica puede observarse el comportamiento del circuito ante este cambio.

En este caso la zona más sensible para la detección está en las altas concentraciones de azúcar.

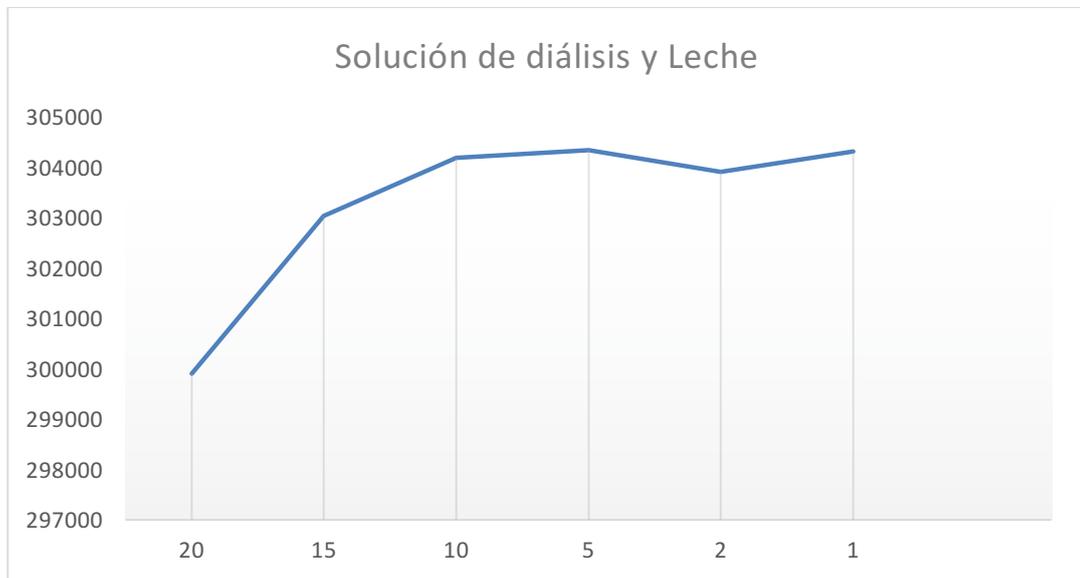


Figura 4-16. Disolución de solución de diálisis y leche

La frecuencia media medida para cada concentración ha sido de:

- Solución de diálisis y Leche al 20%pp: 287,563 kHz
- Solución de diálisis y Leche al 15%pp: 287,295 kHz
- Solución de diálisis y Leche al 10%pp: 287,292 kHz
- Solución de diálisis y Leche al 5%pp: 288,531 kHz
- Solución de diálisis y Leche al 2%pp: 290,176 kHz
- Solución de diálisis y Leche al 1%pp: 289,740 kHz

En la siguiente prueba, se añade vinagre (de uso culinario) a la solución de diálisis. Los resultados obtenidos no permiten sacar conclusiones certeras, ya que a medida que disminuye la concentración disminuye la frecuencia media de oscilación pero a valores intermedios empieza a seguir una tendencia positiva hacia concentraciones menores. Teniendo en cuenta el resultado antes obtenido, en el caso del agua destilada, y el resultado obtenido con solución de diálisis, puede parecer que el sensor resulta muy sensible en disoluciones ácidas, ya que la tendencia es menos lineal que en el caso de disoluciones ligeramente ácidas, como en el caso de la leche. Puede observarse en el siguiente gráfico.

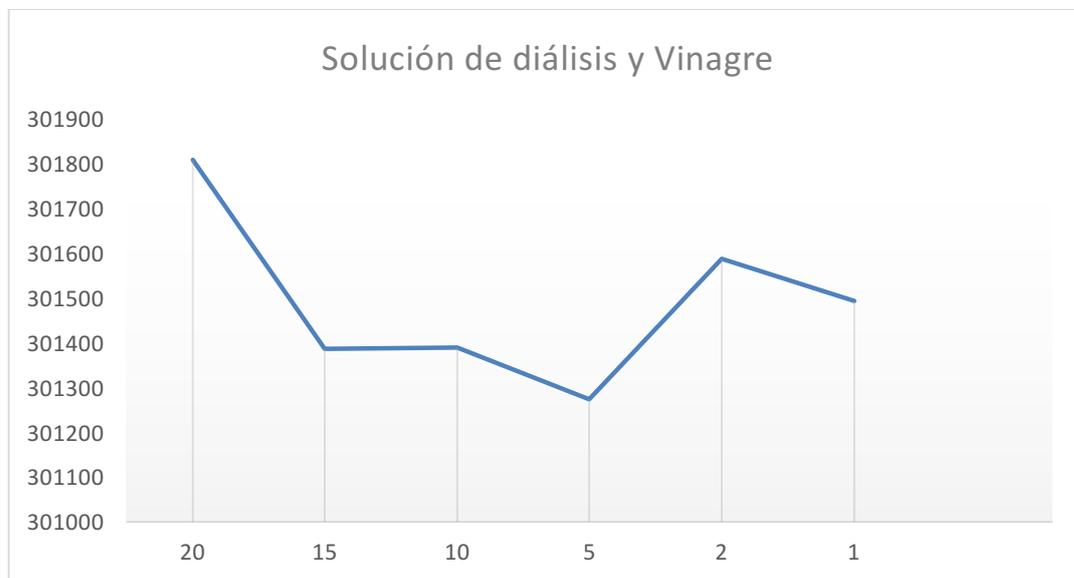


Figura 4-17. Disolución de solución de diálisis y vinagre

La frecuencia media medida para cada concentración ha sido de:

- Solución de diálisis y Vinagre al 20%pp: 301,807 kHz
- Solución de diálisis y Vinagre al 15%pp: 301,385 kHz
- Solución de diálisis y Vinagre al 10%pp: 301,389 kHz
- Solución de diálisis y Vinagre al 5%pp: 301,272 kHz
- Solución de diálisis y Vinagre al 2%pp: 301,586 kHz
- Solución de diálisis y Vinagre al 1%pp: 301,492 kHz

La última prueba que se realiza es adicionando crema de manos con un contenido en urea del 5%. Los resultados obtenidos muestran baja frecuencia de oscilación medida a altos valores de concentración y alta frecuencia de oscilación medida a valores menores de concentración, aunque en valores muy bajos resultan valores de frecuencia media medida menor que en concentraciones intermedias. En la siguiente gráfica pueden verse los resultados comentados.

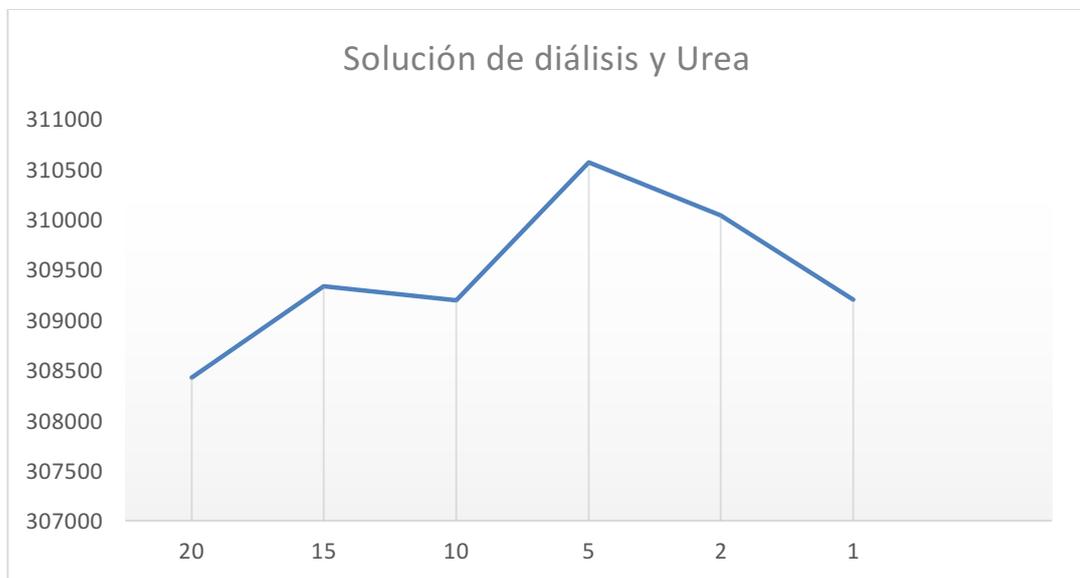


Figura 4-18. Disolución de solución de diálisis y urea

Se observa que el resultado obtenido no permite obtener una conclusión certera sobre la sensibilidad del dispositivo en estas condiciones, lleva a pensar que la composición de la solución de diálisis altera la medida con respecto a la disolución compuesta con agua destilada. Otra posible causa del resultado puede ser la difícil homogeneización de la crema que contiene urea con la solución, por su textura y diferencia de densidad. Por lo que, es posible que el sensor no resulte de gran utilidad para la detección de algunas sustancias presentes en la solución de diálisis.

Sin embargo, este comportamiento podría indicar que el dispositivo es sensible a concentraciones en torno al 5%. Este hecho permitiría su empleo en una aplicación cuyo objetivo no fuera detectar la concentración en sí, sino la detección de una determinada concentración.

5 CONCLUSIONES

Para finalizar, en este capítulo, se extraen conclusiones sobre el estudio llevado a cabo en la importancia de la enfermedad renal y sus complicaciones, así como de la revisión bibliográfica de los métodos actuales de detección de bacterias. Finalmente se sacan conclusiones en relación con los resultados obtenidos tras haber realizado el estudio experimental. También se proponen algunas mejoras futuras para el diseño y la funcionalidad del sensor.

Teniendo presente la importancia de la enfermedad renal, la problemática que supone el insistente riesgo de infección en pacientes sometidos a tratamientos subsidiarios, como diálisis peritoneal, y la carencia de métodos de detección que solucionen los problemas que presentan los actuales como son largos tiempos de ensayos, laboratorios especializados, instrumentación costosa y personal capacitado [1]. Se reitera la necesidad de trabajar en el diseño de un dispositivo que permita la detección de bacterias en un fluido, cumpliendo requisitos como rapidez, sencillez, bajo coste, sensibilidad y accesibilidad.

En esta primera aproximación de un sensor detector de bacterias utilizando la tecnología capacitiva, se demuestra que el sensor tiene capacidad para detectar distintas sustancias presentes en un fluido.

Para el caso de la sal se obtienen muy buenos resultados ya que permite obtener datos en todo el rango de frecuencia y sigue una tendencia lineal en todo momento, tanto para el agua destilada como para la solución de diálisis, siendo de utilidad para fluidos con contenido en sales.

La respuesta del sensor para soluciones ácidas es muy sensible, lo que resulta positivo para detección de bacterias en fluidos con pH ácido como es el líquido ascítico de un paciente sometido a diálisis que presenta infección.

En disoluciones ligeramente ácidas como es la del disolvente con adición de leche, la respuesta lleva a la necesidad de comprobación con otras sustancias similares, debido a la obtención de resultados muy distintos en las dos disoluciones tratadas. Aunque la respuesta con picos de frecuencia en el agua destilada permite establecer una zona de gran sensibilidad del sensor a altas y bajas frecuencias.

Para la detección de urea se tiene un primer resultado favorable, en el que se muestra linealidad para las distintas concentraciones y posibilidad de determinar estas en todo el rango de frecuencias. En el segundo caso el resultado no es tan favorable, pero se atribuye este a la difícil homegeneización de esta sustancia en la solución de diálisis, lo que puede llevar a falsas medidas en la frecuencia resultante.

En general, el resultado de esta primera aproximación es positivo. El sensor muestra sensibilidad ante la presencia de sustancias con distintas propiedades, simulando las condiciones en las que se mediría un fluido con presencia de metabolitos procedentes de las bacterias contenidas.

Como trabajo futuro, se propone la continuación de pruebas experimentales con sustancias más específicas y semejantes a los metabolitos que desechan las principales bacterias causantes de las infecciones más comunes en pacientes sometidos a diálisis con riesgo de contraer infecciones, así como la aplicación en líquido ascítico real.

Por ello, se puede concluir que el sensor desarrollado cumple con los requisitos de diseño mencionados, al ser capaz de detectar cambios en la frecuencia medida ante la presencia de distintas sustancias, no invasivo, cómodo y fácil de usar, presentando un bajo coste y posibilidad de mejora en cuanto a la especificidad de sustancias y sensibilidad ante cada una de ellas.

REFERENCIAS

- [1] S. Soriano Cabrera. Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica. NEFROLOGÍA. Volumen 24. Suplemento N° 6, 2004.
- [2] J. Curbelo, D. Vega. Manual Curso Intensivo MIR Asturias. Nefrología y Urología, 2016.
- [3] M. Trincado, R. Pérez, M. Pérez, I. Páez, E. Sardiñas, N. García, J. Pérez, A. Martínez, R. Reyes. Manual de Enfermería Nefrourológica. 2000.
- [4] La membrana celular (13 de Marzo de 2011). Desde <http://www.slideshare.net/bioblogbh/la-membrana-celular7249888/8?smtNoRedir=1>. Página web visitada 28 de Septiembre de 2016.
- [5] J.L. Martín. Indicaciones y contraindicaciones de la diálisis peritoneal. Hospital Universitario “Virgen del Rocío”. Sevilla. 1998.
- [6] B. Esteban. Bioplataformas electroanalíticas para (multi)detección de marcadores, factores de virulencia y bacterias de relevancia clínica y alimentaria. 2004.
- [7] C. Wyatt, Y. Liu. Basic concepts in medical informatics. Journal of Epidemiology and Community Health, vol. 56, no. II. 2002. Pag.: 808-812.
- [8] H. Ramos, F. Macia, D. Marcos. Redes Inalámbricas de Sensores Inteligentes. Aplicación a la Monitorización de Variables Fisiológicas. Departamento de Tecnología Informática y Computación, Universidad de Alicante. 2009.
- [9] P. Parodi. PFC: “Mejora del diseño hardware y software de un sensor capacitivo para la medida de la frecuencia cardiaca”, 2016.
- [10] Grupo CTO. Manual de Medicina y Cirugía CTO 8ª Ed. Nefrología.
- [11] R. Ortega, P. Ginès, J. Uriz, A. Cárdenas, B. Calahorra, D. De las Heras, M. Guevara, R. Bataller, W. Jimenez, V. arroyo, J. Rodés. Terlipressin therapy with and without albumin for patients with hepatorenal syndrome: Results of a prospective, nonrandomized study. Hepatol, 2002. Cap. 36 Pag.:941-948.
- [12] Sensor capacitivo (29 de Abril de 2016). Desde https://es.wikipedia.org/wiki/Sensor_capacitivo. Página web visitada 3 de Agosto de 2016.
- [13] Enfermedad renal crónica. Desde <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000471.htm>. Página web visitada 23 de Abril de 2016.
- [14] B. Esteban Fernández de Ávila. Bioplataformas electroanalíticas para (multi)detección de marcadores, factores de virulencia y bacterias de relevancia clínica y alimentaria. 2004.
- [15] A. J. Baeumner. Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2003. Pag.: 434-445.
- [16] X Zhang, P. Geng, H. Liu, Y. Teng, Y. Liu, Q. Wang, W. Zhang, L. Jin, L. Jiang. Nanomaterial-based sensors for detection of foodborne bacterial pathogens and toxins as well as pork adulteration in meat products. 2009. Pag.: 2155-2159.
- [17] K. Sharma, A. K. Goel, L. Singh, V. K. Rao. Immunological Biosensor for Detection of *Vibrio cholerae* O1 in Environmental Water Samples. 2006. Pag.: 1155-1159.
- [18] Y. G. Lee, H. Y. Wu, C. L. Hsu, H. J. Liang, C. J. Yuan, H. D. Jang. Sensor B-Chem. 2009. Pag.: 575-580.
- [19] E. Baldrich, F. Muñoz, S. Martínez. Dispositivo inductivo detector de presencia bacteriana. Patente WO 2011086216 A1. 2011.

- [20] J. Aponte, LM. Roa. Diseño e Implementación de un dispositivo V1 para la detección de la apnea del sueño. Trabajo Final de Máster Oficial en Automática, Robótica y Telemática. 2011-2012.
- [21] M. Hurtado, M. de la Parte, A. Brito. Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. 2002. Pag.: 112–118.
- [22] F. Hamadi, F. Asserne, S. Elabed, S. Bensouda, M. Mabrouki, H. Latrache. Food Control. 2014. Pag.: 104-108.
- [23] S. Bharath, A. R. Sam, K. Kalaivani. Detection and quantification of pathogenic bacteria using giant magnetic resistance sensor. Technological Innovation in ICT for Agriculture and Rural Development (TIAR). 2015. Pag.: 160-164.
- [24] L. Yao, M. Hajj-Hassan, E. Ghafar-Zadeh, A. Shabani, V. Chodavarapu, M. Zourob. CMOS capacitive sensor system for bacteria detection using phage organisms. Electrical and Computer Engineering. 2008. Pag.: 877-880.
- [25] J. P. Bergström, T. Dong. An Experimental Study on capacitive touch sensor's response to E. coli bacteria. Mechatronics - Mechatronika (ME), 2014 16th International Conference on, Brno, 2014. Pag.: 433-436.
- [26] A. R. Mohd. Characterizations and performance evaluations of thin film interdigital sensors for Gram-negative bacteria detection. Sensing Technology (ICST), 2011 Fifth International Conference on, Palmerston North. 2011. Pag.: 181-186.
- [27] M. S. Webster, I. V. Timoshkin, S. J. MacGregor. R.A. Fourace, M. Matthey. Analysis of the Sensitivity of an Impedimetric Biosensor for the Detection of Bacteria. Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena. 2009.
- [28] Redes Inalámbricas de Sensores Inteligentes. Aplicación a la Monitorización de Variables Fisiológicas. Héctor Ramos Morillo, Francisco Maciá Pérez, Diego Marcos Jorquera. Departamento de Tecnología Informática y Computación, Universidad de Alicante. 2009.
- [29] J. Aponte. Diseño e Implementación de un dispositivo V1 para la detección de la apnea del sueño. Trabajo Final de Máster Oficial en Automática, Robótica y Telemática. 2012
- [30] R. Alvarez. Introducción a la Plataforma "Pinguino" (Arduino con PIC). Desde <http://tecbolivia.com/index.php/articulos-y-tutoriales-microcontroladores/23-introduccion-a-la-plataforma-qpinguinoq-arduino-con-pic>. Página web visitada 12 de Junio de 2016.
- [31] M. S. Webster, I. V. Timoshkin, S. J. MacGregor. R.A. Fourace, M. Matthey. Analysis of the Sensitivity of an Impedimetric Biosensor for the Detection of Bacteria. Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena, 2009.

ANEXO A

```
clc %borra pantalla
clear all %borra las variables
close all %cierra todas las figuras

indice_fichero=3;

%Se leen los datos del fichero
fichero=sprintf('ejemplo%d.txt',indice_fichero); %crea el nombre donde %d
% sustituye el valor entero de la variable pasada por parámetro
fid=fopen(fichero,'r'); %abre el fichero para lectura, se controla con fid
ii=1; %se crea la variable ii y se le asigna el valor 1
tline = fgetl(fid); %fgetl(fid) lee y avanza una línea del fichero
while tline~-=-1 %fgetl(fid) devuelve -1 si ya no hay más líneas
    %se ejecuta el código mientras tline es distinto a -1 (~=)
    % igual sería ==
    % menor <
    % mayor >
    % menor o igual =<
    % mayor o igual >=
    vector_datos(ii) = sscanf(tline,'%d'); %convierte el contenido de la línea a entero
    %y lo mete en la posición ii del vector_datos
    tline = fgetl(fid); %fgetl(fid) lee y avanza una línea del fichero
    ii=ii+1; %se incrementa el valor del índice para recorrer todas las líneas
end
fclose(fid); %cierra el fichero

tamagno=max(size(vector_datos)); %el número de datos

%Generamos un fichero de matlab con los datos
fichero=sprintf('ejemplo%d.m',indice_fichero); %genera el nombre del fichero
%de matlab con los datos
fid=fopen(fichero,'w'); %se abre el fichero para lectura
```

```
for ii=1:1:tamagno
    %se ejecutan las instrucciones desde ii=1, hasta ii=tamagno en
    %incrementos de 1    valor inicial:incremento:valor final
    fprintf(fid,'vector_datos(%d)=%d;\n',ii,vector_datos(ii)); %en el fichero
    %escriben los datos línea a línea
    vector_x(ii)=ii;
    vector_prueba(ii)=0;
end
fclose(fid);
```

```
%Se representan los datos
figure(1)
title('Agua destilada')
hold on
plot(vector_x,vector_datos,'r')
plot(vector_x,vector_prueba,'w')
%xlim([xminima xmaxima])
%ylim([yminima ymaxima])
```

```
suma=0;
for ii=1:1:tamagno
    suma=suma+vector_datos(ii);
end
media=(suma/tamagno)*20;

texto=sprintf('El valor medio es %.4f,media);
disp(texto)
```

```
concentracion(1)=20;
concentracion(2)=15;
concentracion(3)=10;
concentracion(4)=5;
concentracion(5)=2;
concentracion(6)=1;
frec_osc(1)=291,5127703;
```

```
frec_osc(2)=292,6812162;
```

```
frec_osc(3)=294,5593243;
```

```
frec_osc(4)=296,2787838;
```

```
frec_osc(5)=297,2131081;
```

```
frec_osc(6)=299,6100676;
```

```
figure(2)
```

```
hold on
```

```
plot(concentracion,frec_osc,'ok') %puntos 'o' verdes 'k'
```