



ECyT  
UNSAM

PROYECTO FINAL INTEGRADOR - INGENIERÍA BIOMÉDICA

# *Desarrollo de un dispositivo para la aplicación controlada de fuerzas de tracción en cultivos celulares*

ESTUDIANTE: Camila Ruiz

LEGAJO: CYT - 5592

SUPERVISOR: Dr. Ing. Leonardo Casal

CO-SUPERVISOR: Dra. Ana Gonzalez Wusener

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de biomateriales biomecánica y bioinstrumentación (Lab3Bio), área que química. Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín.

FECHA: 01/03/2021

A mi abuela Monona,  
que siempre estará presente.

# Agradecimientos

A mi Mama por ser un ejemplo a seguir y ayudarme a ser quien soy hoy.

A mi director Leonardo Casal por la paciencia y compañerismo en todo el proceso.

A Ana Gonzales por su colaboración y dedicación durante todo el proyecto.

A Ignacio Ruiz que junto a Leonardo y Ana decidieron creer en mí para participar de este proyecto.

A Elida Hermida y todo el grupo de investigación del Lab3Bio por ayudarme y formar un hermoso ambiente de trabajo.

A los estudiantes de ingeniería biomédica por el compañerismo y la buena onda de todos.

A Guillermo Lamura por su ayuda y consejos durante toda la carrera.

A Agustina Portu por ayudarme durante todo el proceso.

A la Fundación Argentina de Nanotecnología por el uso del AFM y en especial a Bernardo Villares.

A mi familia y amigos por apoyarme incondicionalmente en todo momento.

## Resumen

Se desarrolló el primer prototipo de un dispositivo con el potencial para aplicar fuerzas mecánicas equiaxiales de manera estática o variable en cultivos celulares para el estudio de la mecanobiología celular. El prototipo está compuesto por una membrana flexible, sobre la cual se podrán cultivar las células, que se deforma al aplicar vacío de forma controlada, utilizando una bomba miniatura y una válvula proporcional. Las membranas producidas resultaron con una deformación lineal hasta más del 20% del estiramiento y un módulo elástico similar al tejido biológico blando. A la misma se le realizaron diferentes tratamientos para favorecer la adhesión celular y se demostró su citocompatibilidad. Se implementó un generador de presión que permite aplicar diferentes señales de deformación seleccionables por el usuario. Por último, se propuso un método basado en el procesamiento de imágenes para cuantificar la deformación de la membrana y se obtuvo una relación lineal entre el vacío aplicado y la deformación obtenida. El dispositivo desarrollado cumple con los requisitos propuestos para ser usado en un laboratorio de mecanobiología.

# Contenido

Carátula .....	1
Agradecimientos .....	3
Resumen .....	4
I. Introducción .....	8
Mecanobiología y mecanotransducción celular .....	8
Avances en la mecanobiología: rigidez del sustrato y aplicación de fuerza .....	9
Dispositivos utilizados en mecanobiología .....	11
Sistemas de carga compresiva .....	11
Estiramiento longitudinal .....	11
Flexión de sustrato .....	11
Distensión del sustrato en el plano .....	12
Distensión del sustrato circular fuera del plano .....	12
Fluido de corte .....	13
Cizallamiento .....	13
Dispositivos comerciales .....	13
Flexcell Inc .....	14
IonOptix .....	14
Menicon LifeScience .....	15
StrexCell .....	15
Aspecto normativo .....	18
II. Objetivo .....	19
Marco del proyecto .....	19
Objetivo .....	19
III. Componentes y funcionamiento del dispositivo .....	20
IV. Sustrato celular: membrana flexible .....	22
Producción .....	22
Caracterización mecánica .....	22
Tratamientos superficiales .....	23
Caracterización superficial .....	25
Conclusión .....	29
V. Soporte de la membrana: diseño y mecanizado .....	30
Diseño de la base y la tapa .....	30
Mecanizado y material de las piezas .....	31

Conclusión .....	31
VI.    Generador de señales de presión .....	32
Bomba de vacío.....	32
Sensor de presión negativa .....	33
Válvula proporcional .....	34
Circuito de control.....	35
Microcontrolador .....	36
Teclado y display .....	37
Conclusión .....	37
VII.   Generador de señales de presión: firmware e interfaz de usuario .....	39
Firmware.....	39
Bloque de Interfaz de usuario .....	39
Conclusión .....	41
VIII.  Sistema de control.....	42
Estructura del control.....	42
Sintonización .....	42
Cálculo de error .....	46
Conclusión .....	47
IX.    Medición de deformación de la membrana .....	48
Marcado de la membrana .....	48
Independencia entre la deformación y la traslación.....	50
Relación presión deformación .....	51
Conclusión .....	52
X.     Comparativa de precios .....	53
Dispositivos comerciales.....	53
Cálculo de costos del dispositivo desarrollado .....	54
XI.   Discusión.....	55
Publicaciones.....	55
Sustrato flexible .....	55
Piezas del dispositivo .....	55
Generador de señales de presión.....	55
Firmware (lazo de control) e interfaz de usuario.....	55
Medición de la deformación de la membrana .....	56
Alcances del proyecto.....	56

Limitaciones del proyecto .....	56
Tareas a futuro .....	57
XII. Conclusión .....	59
Glosario .....	60
Referencias.....	62
Anexo I.....	64
Anexo II.....	69

# I. Introducción

## **Mecanobiología y mecanotransducción celular**

Tradicionalmente se ha considerado que el comportamiento de las células es controlado por la composición química del ambiente extracelular. Actualmente, existe un consenso en que los aspectos físicos del medioambiente contribuyen en numerosos procesos celulares, tanto normales como patológicos. Las células son capaces de percibir las fuerzas mecánicas del ambiente en el que se encuentran. En las últimas décadas, el estudio del modo en que las células interpretan las fuerzas mecánicas permitió resaltar la importancia de estos procesos, lo que dio lugar a la disciplina conocida como mecanobiología [1]. Dentro de la mecanobiología, se denomina mecanotransducción al proceso por el cual las células sensan señales mecánicas, y las convierten en respuestas bioquímicas [2] [3]. En este sentido, las células son capaces de percibir la deformación mecánica y responder de forma adecuada mediante la expresión de proteínas específicas, moviéndose, adhiriéndose a la matriz circundante, y también dividiéndose o diferenciándose en otros tipos celulares.

Las células logran percibir esta deformación a través de complejos especializados de la membrana plasmática, con los que se adhieren a otras células o a una matriz extracelular. Estos receptores de adhesión están formados por proteínas transmembrana, llamadas integrinas, que permiten anclar la célula a una matriz y por las llamadas moléculas de adhesión, que permiten anclar la célula a otras células [4]. Tanto las integrinas como las moléculas de adhesión están acopladas a proteínas del citoesqueleto, los filamentos de actina, a través del denominado “complejo de adhesión”, el cual es un conjunto altamente organizado de moléculas (Fig. 1). La formación de estos complejos de adhesión es importante en la señalización celular para dirigir la migración, proliferación, diferenciación, organización y mantenimiento de tejidos en reparación. Las fuerzas mecánicas del entorno celular promueven en estos complejos de adhesión cambios conformacionales en diferentes proteínas, que correlacionan con la fuerza aplicada. Son estos cambios conformacionales los que desencadenan una compleja señalización intracelular, que regula los importantes procesos celulares mencionados anteriormente.

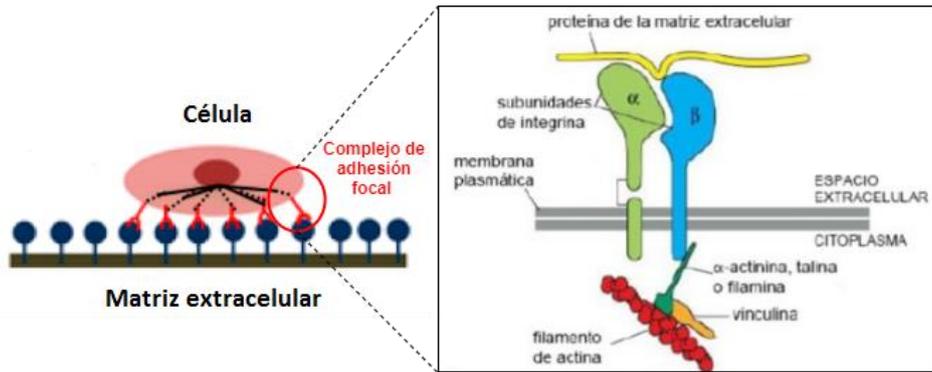


Figura 1: Esquema de la formación de complejos de adhesión focal (adaptada de [4]).

## Avances en la mecanobiología: rigidez del sustrato y aplicación de fuerza

Uno de los primeros hallazgos de la mecanobiología fue comprender que el comportamiento celular variaba según las características mecánicas del sustrato utilizado para el cultivo celular. Esto dio una primera evidencia de cómo las cualidades mecánicas del entorno influyen en el comportamiento celular.

Por ejemplo, se observó que células madre mesenquimales de ratón cultivadas en sustratos con diferente dureza se diferenciaban según el valor de su módulo elástico. En el caso de las células madre cultivadas en sustratos blandos, con un módulo elástico de 2,5 kPa, se diferenciaron en tipos celulares de tejidos blandos como son las células adiposas pertenecientes a tejidos grasos. Por el contrario, las cultivadas en sustratos más rígidos, de módulo elástico de 100 kPa, se diferenciaron en células óseas pertenecientes a tejidos rígidos como el del hueso (Fig. 2) [5].

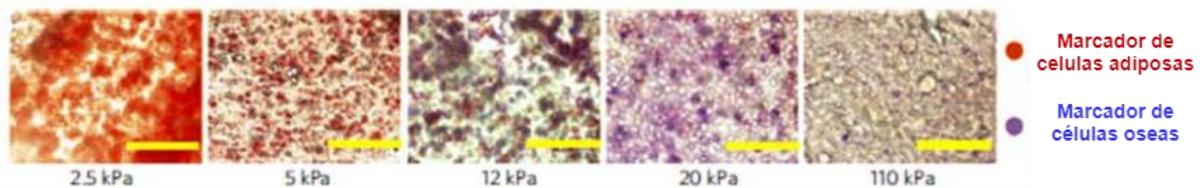


Figura 2: imágenes en microscopio de células madre cultivadas en sustratos con diferente rigidez (extraída de [5]).

Hoy en día la gran mayoría de los ensayos con células se realizan en materiales rígidos como el vidrio o el plástico, sin tener en cuenta que la rigidez de estos materiales podría alterar el comportamiento de las células (Fig. 3). Los cultivos celulares en estas condiciones no pueden imitar el entorno fisiológico en el que se encuentran las células.

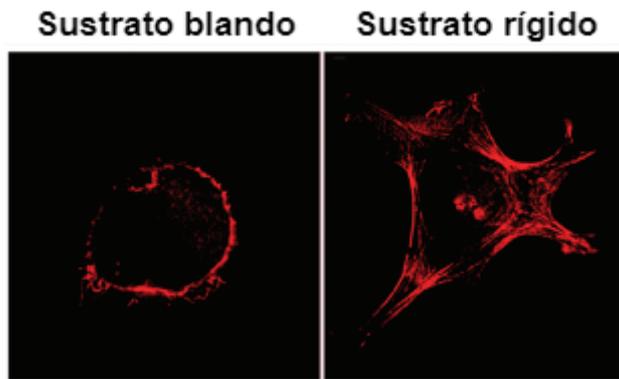


Figura 3: Imagen de dos células, una cultivada en un sustrato blando y otra en un sustrato rígido (de vidrio o plástico). En rojo se marca la actina, componente principal del citoesqueleto. Se puede observar cómo se modifica el citoesqueleto al cultivar la célula en un material blando (adaptada de [6]).

Por estos motivos, estudiar cómo influye la aplicación de fuerzas tanto estáticas (Fig. 4) como dinámicas (Fig. 5) en los cultivos celulares es de gran importancia y constituye un campo de investigación en pleno desarrollo. Contar con dispositivos que permitan realizar estudios *in vitro* sobre las vías de mecanotransducción es determinante.

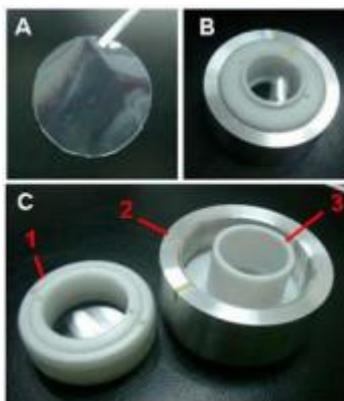


Figura 4: Dispositivo para la aplicación de fuerzas estáticas (extraída de [7]).

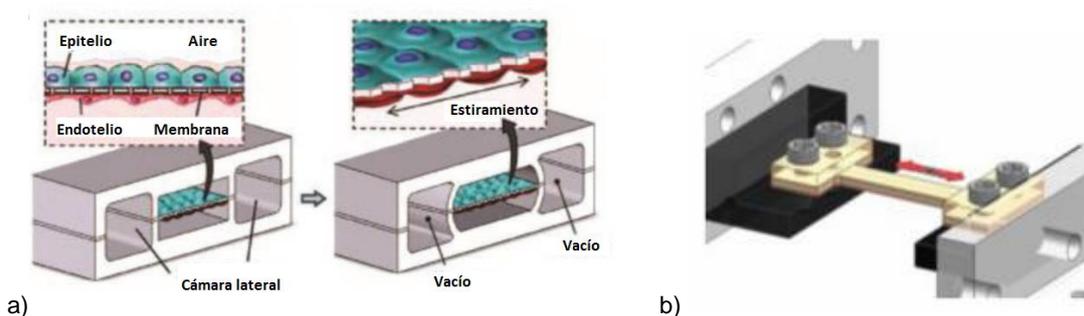


Figura 5: ejemplos de dispositivos que aplican fuerzas de estiramiento dinámicas de manera uniaxial en cultivos celulares. a) Dispositivo accionado de manera neumática (extraída de [8]) b) Dispositivo accionado de manera mecánica (extraída de [9]).

Para aplicar estas fuerzas a un cultivo celular existen diferentes tecnologías que se describen a continuación.

## Dispositivos utilizados en mecanobiología

Son muchos los dispositivos o sistemas que permiten aplicar fuerzas a un cultivo celular, entre ellos se encuentran los siguientes [10]:

### Sistemas de carga compresiva

Estos sistemas se suelen basar en un pistón o pieza que permita aplicar una fuerza de compresión al cultivo celular, tanto en 2D como en 3D (Fig. 6). Este sistema permite aplicar diferentes presiones al cultivo de manera hidrostática (aplicando presión al medio de cultivo) o al comprimir las células.

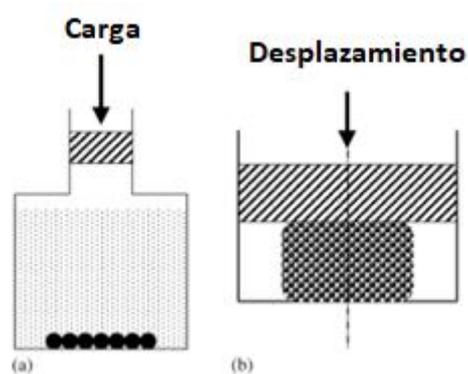


Figura 6: Esquema de sistemas de carga compresiva. (a) Presión hidrostática (b) Pilar de platina, aplicando fuerzas a un cultivo celular 3D (adaptadas de [10]).

### Estiramiento longitudinal

Los sistemas de estiramiento longitudinal pueden ser en una dirección como el caso de los sistemas uniaxiales (Fig. 7a) o en más de una dirección como los sistemas biaxiales o multiaxiales (Fig. 7b).

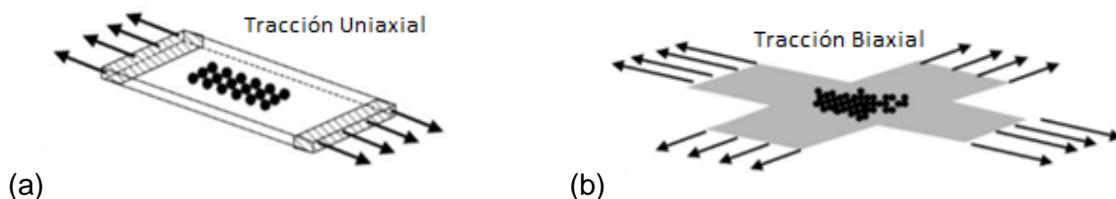


Figura 7: Esquema de dos sistemas de estiramiento longitudinal. (a) Sistema de tensión uniaxial, (b) Sistema de tensión biaxial (adaptadas de [10]).

### Flexión de sustrato

Estos sistemas se basan en sustratos rígidos que al ser deformados por una o más fuerzas de flexión aplican una deformación al cultivo celular (Fig. 8).



Figura 8: Esquema de un sistema que utiliza flexión del sustrato (adaptada de [10]).

### Distensión del sustrato en el plano

Algunos sistemas permiten deformar un sustrato flexible de manera que el plano sobre el cual se cultivan las células se mantenga horizontal (Fig. 10). Utilizando sistemas mecánicos (Fig. 10a) o neumáticos (Fig. 10b).

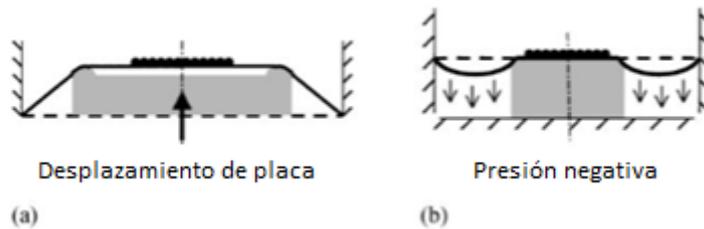


Figura 10: Esquema de dos sistemas de distensión de sustrato circular en el plano. (a) Por movimiento de plato, (b) Por aplicación de vacío (adaptadas de [10]).

### Distensión del sustrato circular fuera del plano

Otros consisten en desplazar piezas que deformen el sustrato fuera del plano horizontal (Fig. 9a y 9b) al aplicar presión positiva (Fig. 9c) o negativa (Fig. 9d) por debajo del mismo.

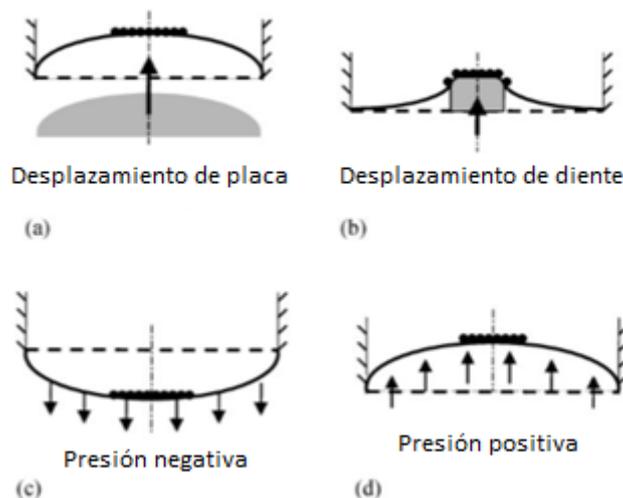


Figura 9: Esquema de varios sistemas que utilizan distensión de sustrato circular por fuera del plano (adaptadas de [10]).

## Fluido de corte

Estos sistemas permiten aplicar un fluido por sobre el cultivo celular (Fig. 11). Específicamente se desarrollan en un campo de la investigación denominado microfluídica en el cual se replican condiciones mecánicas de células expuestas a un flujo constante como es por ejemplo las células que componen los vasos y arterias.

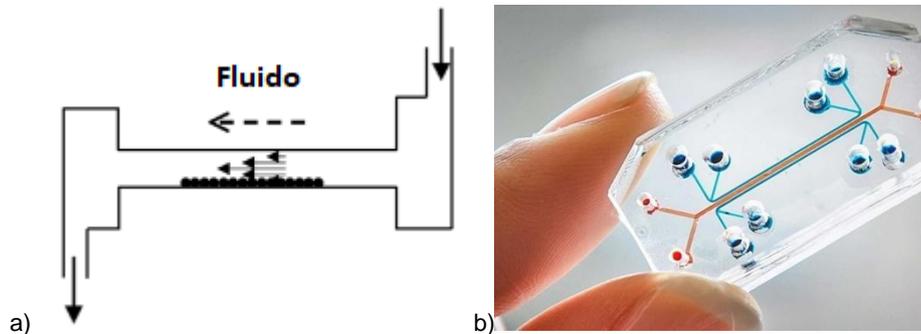


Figura 11: a) Esquema de un sistema de corte de fluido. b) Imagen de un sistema de microfluídica (extraída de [11]).

## Cizallamiento

Este sistema permite aplicar un esfuerzo de corte a un cultivo celular a partir de piezas con diferentes formas, por ejemplo cónicas (Fig. 12).

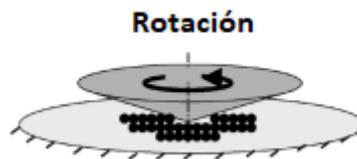


Figura 12: Esquema de un sistema de aplicación de fuerza de cizallamiento.

Estos son algunos de los sistemas existentes hoy en día, además de la combinación de diferentes técnicas entre ellos. También existen otros sistemas para aplicar fuerzas a cultivos celulares, algunos sistemas a nivel micrométrico (basados en magnetismo, cristales piezoeléctricos o micropipetas) e incluso sistemas a nivel nanométrico.

A continuación, se detallan los sistemas comercialmente disponibles.

## Dispositivos comerciales

Existen varias empresas que comercializan dispositivos para uso en investigaciones sobre mecanotransducción celular, entre ellas se encuentran: Flexcell Inc., IonOptix, MeniconLifescience y StrexCell.

## Flexcell Inc.

Flexcell es una empresa estadounidense fundada en 1987 con más de 30 años de experiencia en el mercado. La misma fue la primera en comercializar tecnología para aplicar tensión en cultivos celulares *in vitro*. Citada en más de 4000 publicaciones y utilizada en más de 1300 laboratorios [12].

Esta empresa cuenta con el desarrollo de sistemas de tensión, compresión y fluido. FlexCell ofrece sistemas de distensión del sustrato en el plano que permiten aplicar fuerzas equiaxiales. Estos sistemas se dividen en dos, los que permiten aplicar fuerzas en múltiples cultivos y los que permiten aplicar fuerzas en un solo cultivo con la ventaja de poder observarlos en el microscopio (Fig. 13).

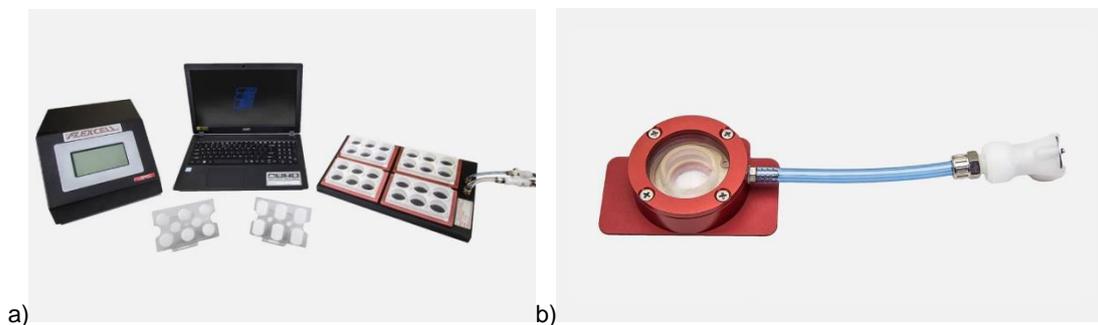


Figura 13: Imágenes de los diferentes dispositivos desarrollados por FlexCell para aplicar fuerzas de tensión a) Imagen del FX-6000T™ TensionSystem, el mismo es un sistema que permite aplicar fuerzas de tensión a un multiwell de 6 cultivos. b) Imagen del StageFlexcer, este sistema aplica fuerzas de tensión a un solo cultivo permitiendo observarlo en el microscopio (extraídas de [12]).

## IonOptix

IonOptix es una empresa estadounidense fundada en 1990 con el objetivo de desarrollar, fabricar y vender sistemas completos para cuantificar los niveles de iones celulares utilizando indicadores de fluorescencia [13]. En el año 2012 desarrollan el primer sistema para la aplicación de fuerzas de tensión en cultivos celulares. Los desarrollos de esta empresa se encuentran diferenciados en su uso para diferentes tipos celulares; por ejemplo, en cardiomiocitos, vasos sanguíneos, células musculares, etc. Una gran diferencia con el resto de las empresas es que es la única que desarrolla sistemas que permiten estimular mecánica y eléctricamente a los cultivos celulares de manera simultánea. Cuenta con dos modelos para aplicar fuerzas de tensión: el MyoStretcherSystem (diseñado específicamente para estimular células miocárdicas) y el Culture PacingSystem (Fig 14).

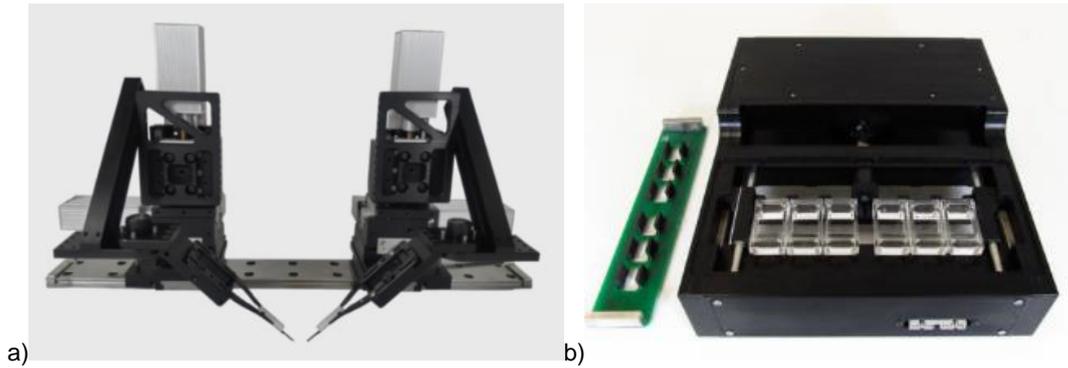


Figura 14: Sistemas de aplicación de fuerzas de tensión desarrollados por IonOptix. a) Imagen del sistema MyoStretcher para aplicar fuerzas en cardiomiocitos. b) Imagen del sistema de tensión Culture Pacing, el mismo permite aplica fuerzas uniaxiales de forma mecánica, permite también aplicar pulsos eléctricos (extraídas de [13]).

## Menicon LifeScience

Menicon LifeScience es una empresa fundada en 1951 en Japón, la misma recientemente comenzó a comercializar equipos para aplicación de estiramiento junto con hidrogeles para su uso en andamios tridimensionales [14]. Cuenta con dos equipos que permiten aplicar fuerzas de tensión uniaxiales de manera mecánica (Fig. 15).

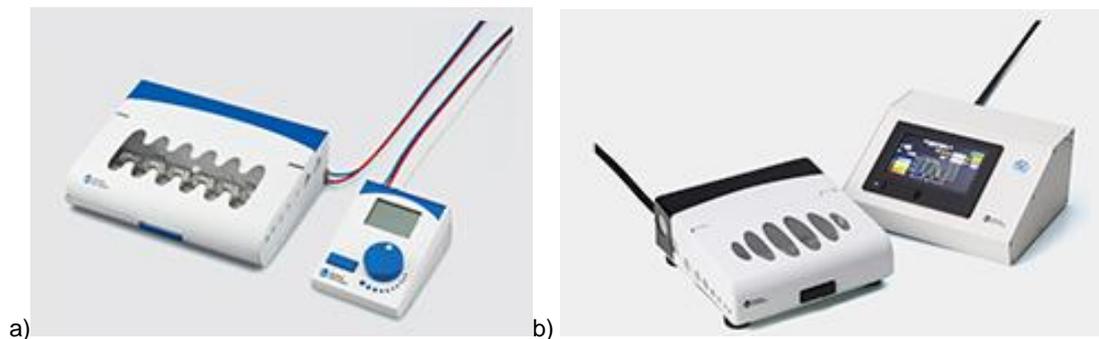


Figura 15: Sistemas de aplicación de fuerzas de tensión desarrollados por Menicon LifeScience. a) Imagen del sistema de tensión ShellPa. b) Imagen del sistema de tensión ShellPa Pro, a diferencia del ShellPa permite aplicar una mayor cantidad de señales de tensión (extraídas de [14]).

## StrexCell

StrexCell es una empresa japonesa fundada en 2003 con el objetivo de dedicarse a la planificación, desarrollo, fabricación y venta de equipos para biología celular, investigación biomédica y farmacéutica [15]. Cuenta con desarrollo de equipos para aplicar fuerzas de tensión, sistemas de carga compasiva y congeladores de velocidad controlada. Sus cuatro modelos permiten aplicar fuerzas de tensión uniaxial y biaxial en cultivos celulares. Tiene sistemas automáticos, manuales y montables en microscopio (Fig. 16).



Figura 15: Sistemas desarrollados por StreCell. a) Imagen del sistema de aplicación de fuerzas uniaxial automático, el mismo permite aplicar fuerzas en más de un cultivo celular. b) Imagen del sistema de aplicación de fuerzas uniaxiales manual. c) Imagen del sistema de aplicación de fuerzas uniaxiales manual, montable en microscopio (extraídas de [15]).

### Cuadro comparativo

A continuación, se muestra un cuadro comparando las capacidades de los modelos de las diferentes marcas mencionadas, analizando sus ventajas y desventajas (Tabla 1).

Nombre de la empresa	Modelos	Tipo de dispositivo	Ventajas	Desventajas
FlexCell Inc.	FX-6000T™ TensionSystem	Fuerza de tensión en multiwell de 6	Gran precisión y empresa con mayor trayectoria del mercado	Alto costo de adquisición, equipamiento de gran tamaño y con muchos componentes, dependiente de PC
	StageFlexcer	Fuerza de tensión en cultivo unitario con posibilidad de observar en microscopio		
IonOptix	MyoStretcher System	Fuerza de tensión y pulsos eléctricos para cultivo unitario	Menor costo, ocupa menor espacio y cuenta con menores componentes	Uso para cultivos específicos, cuenta solo con estiramiento uniaxial
	Culture PacingSystem	Fuerza de tensión en múltiples cultivos, tensión uniaxial accionado mecánicamente		
MeniconLife science	ShellPa	Fuerzas de tensión uniaxiales de manera mecánica	Menor costo, ocupa menor espacio requiere compresor	Cuenta solo con estiramiento uniaxial
	ShellPa Pro			
StrexCell	STB-1400	Fuerzas de tensión uniaxiales automatizado	Menor costo, ocupa menor espacio y cuenta con menores componentes	Cuenta solo con estiramiento uniaxial de manera automatizada
	STB-100	Fuerzas de tensión uniaxiales manual, de cultivo unitario		
	STB-150W	Fuerzas de tensión uniaxiales manual, de cultivo unitario, montable en microscopio		
	STB-190-XY	Fuerzas de tensión biaxiales manual, de cultivo unitario, montable en microscopio		

Tabla 1: Cuadro comparativo de las diferentes tecnologías desarrolladas por las marcas mencionadas. Se compararon los diferentes modelos existentes en el mercado teniendo en cuenta criterios de costo, tipos de fuerza de tensión que aplican, si son automatizados o manuales y si son montables en microscopio.

## **Aspecto normativo**

De acuerdo a los manuales de los dispositivos existentes no se encontró algún tipo de normativa nacional e internacional específica con respecto a dispositivos diseñados para ser empleados en cultivos celulares, específicamente en el marco de la investigación en mecanobiología.

Las empresas que ya fabrican, diseñan y venden este tipo de sistemas en todo el mundo (Flexcell Inc., STREX Inc.) cumplen con normativas de estándares de calidad internacional pero no se encontró algún tipo de normativa aplicable específicamente a este tipo de sistemas. Ninguna de las mismas cumple con FDA (U.S. Food and Drug Administration).

## II. Objetivo

### Marco del proyecto

Este proyecto se originó en el marco de la beca “Intering 2016” otorgada por la fundación innovación y tecnología (FUNINTEC) de la UNSAM. Del mismo participaron como director el Dr Ignacio E. Ruiz, como codirectores la Dra Ana Gonzalez Wusener y el Dr. Ing. Leonardo Casal y como becaria Camila Ruiz.

### Objetivo

El objetivo de este trabajo es desarrollar un dispositivo que permita aplicar diferentes fuerzas de tensión en cultivos celulares, similares a las condiciones *in vivo*, cuyo diseño maximice su usabilidad y accesibilidad.

A pesar de que hoy en día este producto existe en el mercado, se busca desarrollar un sistema de menor costo y de código abierto, de fácil uso que no requiera de una gran cantidad de componentes.

Para conseguir el mismo se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Se debe desarrollar una membrana biocompatible cuyo modulo elástico sea similar al del tejido biológico.
- La membrana se debe deformar con el fin de aplicar una tensión mecánica cuya amplitud, forma y frecuencia sea seleccionable por el usuario. Permitiendo aplicar fuerzas de forma radial, también llamada equiaxial, en cultivos celulares.
- Para generar esta fuerza proponemos utilizar vacío. Para esto se debe desarrollar un soporte para crear una cámara hermética debajo de la membrana.
- Para poder generar una señal de deformación variable en el tiempo es necesario implementar un control realimentado que permita replicar diferentes señales de presión negativa por debajo del sustrato, deformándolo de manera proporcional.
- Se debe validar la deformación lograda por el dispositivo, para lo cual es necesario implementar un sistema que permita cuantificar la deformación de la membrana en distintos valores de vacío.
- El dispositivo debe ser en comparación con los dispositivos comercialmente disponibles de fácil uso, de menor tamaño, económico, de menor complejidad y menor cantidad de componentes.

### III. Componentes y funcionamiento del dispositivo

Para cumplir con el objetivo propuesto se evaluaron los diferentes sistemas ya nombrados y se optó por un sistema de distensión de sustrato circular en el plano por aplicación de vacío (Fig. 16).

El mismo cuenta con una membrana flexible sostenida por un soporte que permite aplicar presión negativa por debajo de la misma para lograr una deformación del sustrato proporcional a la presión aplicada.

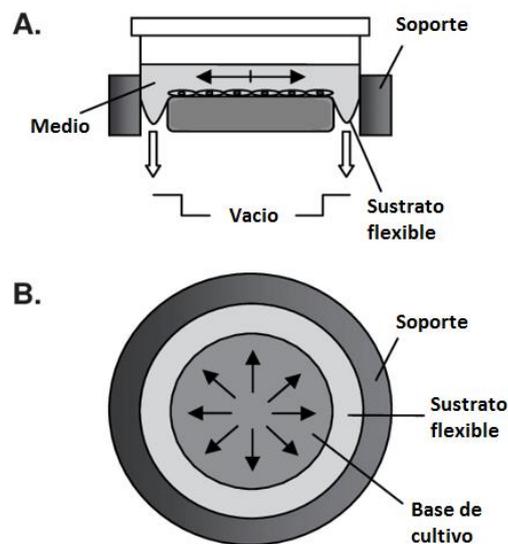


Figura 16: Esquema del sistema de aplicación de fuerzas equiaxiales radiales, por aplicación de presión negativa por debajo del sustrato. A: Vista lateral. B: Vista superior.

El dispositivo desarrollado cuenta con los siguientes componentes:

- Sustrato: membrana de PDMS (Polidimetilsiloxano) esterilizable y biocompatible.
- Soporte: base cilíndrica y tapa en forma de anillo que sujetan la membrana para formar una cámara de aire hermética debajo de ella.
- Generador de señales de presión: una válvula proporcional y una bomba de vacío miniatura generan en la cámara una señal de presión negativa medida por un sensor.
- Control: un sistema embebido en un microcontrolador Atmega2560 implementa un control digital en tiempo real cuyo objetivo es reproducir una señal de presión en la cámara de acuerdo a la señal de deformación seleccionada por el usuario.
- Pantalla y teclado: interfaz para que el usuario ingrese la deformación deseada (forma de onda, amplitud y frecuencia).

En la figura 17 se pueden observar las diferentes partes del dispositivo implementado:

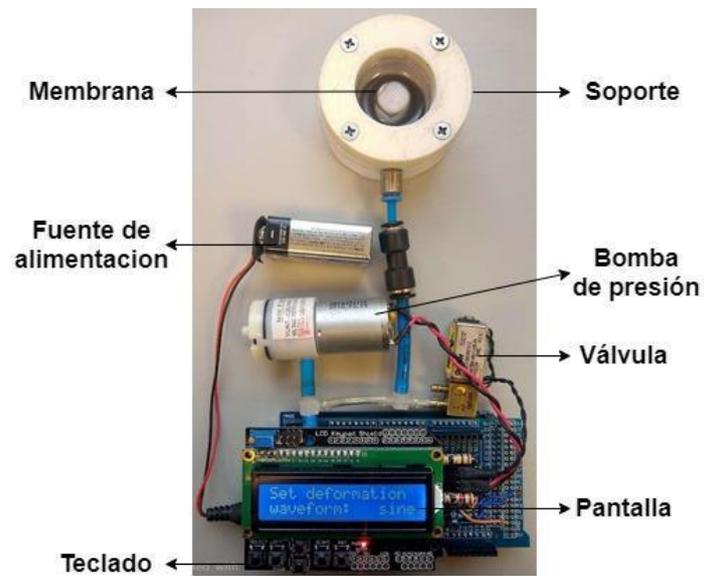


Figura 17: Imagen del dispositivo implementado con sus diferentes componentes.

En los siguientes capítulos se describe el desarrollo de los diferentes componentes del dispositivo.

## IV. Sustrato celular: membrana flexible

La membrana debe cumplir con los siguientes requisitos:

- Flexibilidad, con un módulo elástico similar al tejido biológico y que permita alcanzar una deformación de hasta 20%.
- Biocompatibilidad, para garantizar la viabilidad y adhesión celular.

A continuación, se describe el método de producción de la membrana, su caracterización mecánica y los ensayos realizados para asegurar una correcta adhesión celular.

### Producción

Para la producción del sustrato se usó PDMS (de la marca Smooth-on, modelo Solaris) de baja viscosidad, para facilitar su producción, y transparente, para permitir la visualización en microscopio [16]. Para producir la membrana se mezclaron en partes iguales los dos componentes del kit adquirido, con un peso total de 5 gr. y se dejó curar por 24 hs en un molde circular, de 1 mm de altura y 6 cm de diámetro (Fig. 17).



Figura 17: Izq, imagen del molde para el curado de la silicona. Der, imagen de la membrana curada.

### Caracterización mecánica

Se realizó un ensayo de tracción a tres membranas obtenidas para relacionar la tensión aplicada en la membrana y su deformación, entre 0 y 40%. Se utilizó un equipo denominado DMA (analizador mecánico dinámico) de la marca TA y modelo Q800 (Fig. 18).

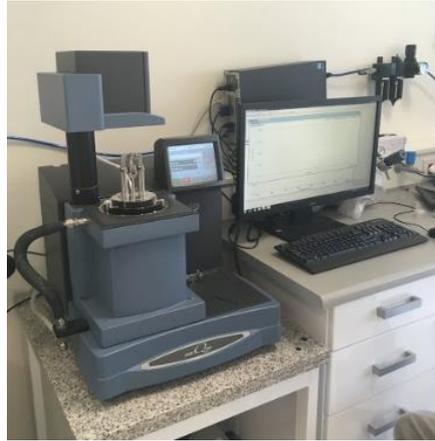


Figura 18: DMA utilizado para la caracterización mecánica.

El ensayo de tracción de la membrana mostró un comportamiento lineal ( $r^2$  mayor a 0.99) hasta la deformación de interés de 20% y un módulo elástico medio de  $2,43 \pm 0,10$  kPa (Fig. 19) que se encuentra dentro del rango del tejido biológico blando [17]. El módulo elástico medio se obtuvo promediando los obtenidos en las tres muestras.

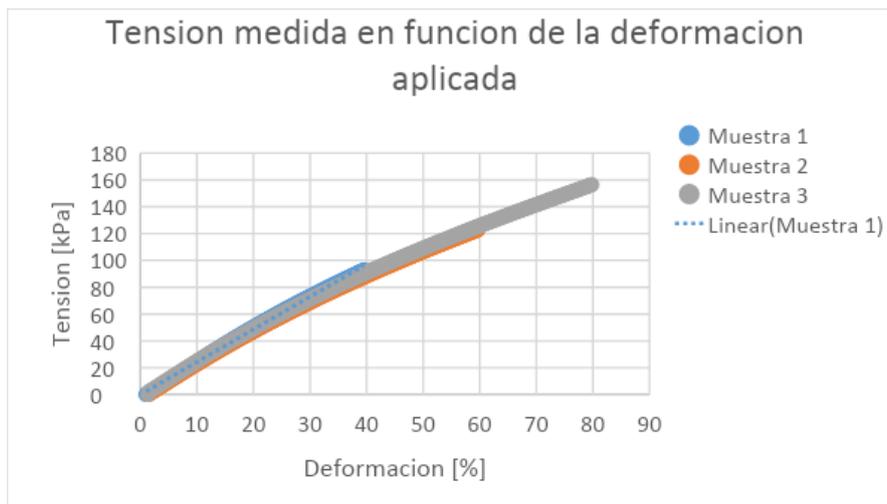


Figura 19: Relación tensión-deformación para 3 muestras ensayadas con el DMA. Se verificó su linealidad ( $r^2 > 0.99$ ) en el rango de trabajo (entre 0 y 20%).

## Tratamientos superficiales

Con el objetivo de favorecer la adhesión celular, a tres grupos diferentes de muestras de membrana se les realizaron los siguientes tratamientos, uno para cada grupo (Fig. 21):

- Se hirvió en agua destilada durante 1 hora [18].
- Se sumergió en una solución 1 M de NaOH por 24 hs [19].

- Se sumergieron, en movimiento, en una solución 5:1:1 de H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HCl durante 15 min [20].

Cada uno de los ensayos se realizó con el objetivo de adherir materiales biocompatibles a la membrana, favoreciendo la correcta adhesión de las células. Para ello se utilizaron colágeno y quitosano. El colágeno es un material ampliamente utilizado para ensayos *in vitro* gracias a su probada biocompatibilidad y en el caso del quitosano también está extensamente probada su biocompatibilidad y utilización para el desarrollo de sustratos para el crecimiento celular. El laboratorio en el que se realizó este trabajo disponía de los dos materiales.

Se usaron muestras de membrana de 2 cm x 1 cm con un grosor de 1 mm, se hicieron 4 muestras por tratamiento, a dos de las muestras se las sumergió en una solución de APTES (3-aminopropil trietoxisilano) al 10% en acetona, durante 2 hs [21]. A dos de las muestras tratadas con APTES y a las otras dos sin tratar se las recubrió a una con solución de colágeno 0.1 mg/ml a 4° C durante una noche y a la otra se le aplicó un recubrimiento de quitosano al 10% en ácido acético 2% V/V. El primer tratamiento se realizó con el objetivo de exponer los grupos hidroxilos aumentando así su hidrofiliidad. El tratamiento con APTES permite la adhesión de grupos aminos que facilitarán el recubrimiento posterior con colágeno y quitosano (Fig. 20).

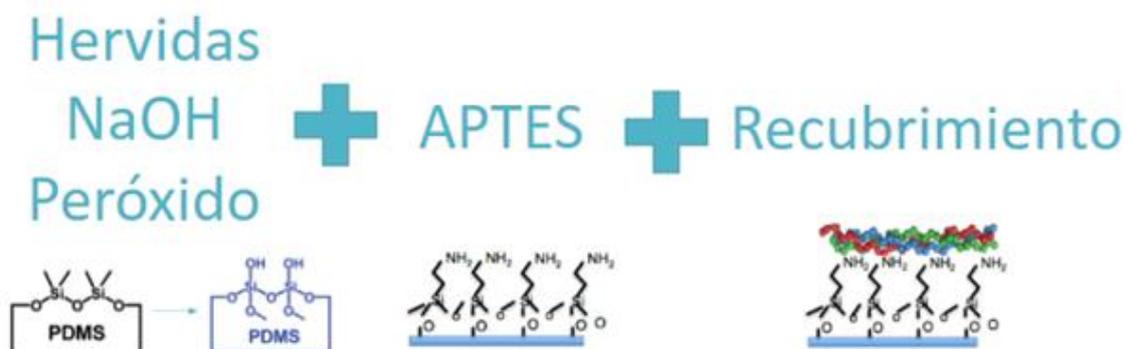


Figura 20: Esquema de los tratamientos realizados en la membrana.

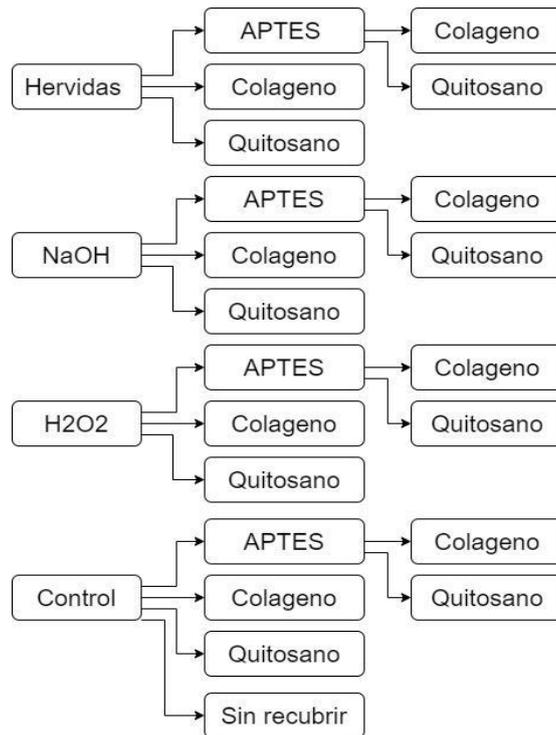


Figura 21: Muestras por cada tratamiento, a una de cada grupo se las trató con APTES y luego se las recubrió, a otra se la recubrió con colágeno. Al grupo control se le agregó una tercera muestra sin tratamientos.

## Caracterización superficial

### Ángulo de contacto

Para evaluar la hidrofiliidad (que se relaciona con la biocompatibilidad), se analizó el ángulo de contacto de la membrana.

Se depositó una gota de agua destilada sobre las membranas sin tratamiento, tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOH y hervida y se obtuvieron fotografías con una cámara digital (Fig. 22). El ángulo de contacto fue determinado con el software de procesamiento de imágenes Image-J. Se calculó su valor medio, desvío estándar y se comparó entre los tratamientos utilizando el test student.

El tratamiento superficial logró reducir el ángulo de contacto (de  $104^\circ \pm 3^\circ$  a  $73^\circ \pm 13^\circ$ ). La magnitud de la reducción fue similar al analizar los 3 tratamientos por separado (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOH o hervida). Por otro lado, las membranas tratadas con colágeno, resultaron con mayor hidrofiliidad que las tratadas con quitosano ( $84^\circ \pm 11^\circ$  y  $99^\circ \pm 4^\circ$  respectivamente) para los tres tratamientos. En la figura 23 muestran los valores de ángulo de contacto obtenidos para cada caso.

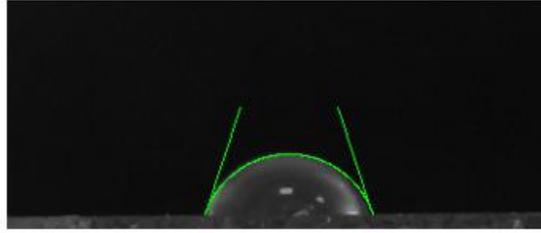


Figura 22: Imagen obtenida para la medición del ángulo de contacto sobre una de las muestras utilizadas, analizada con el programa Image J.

## Colágeno y Quitosano

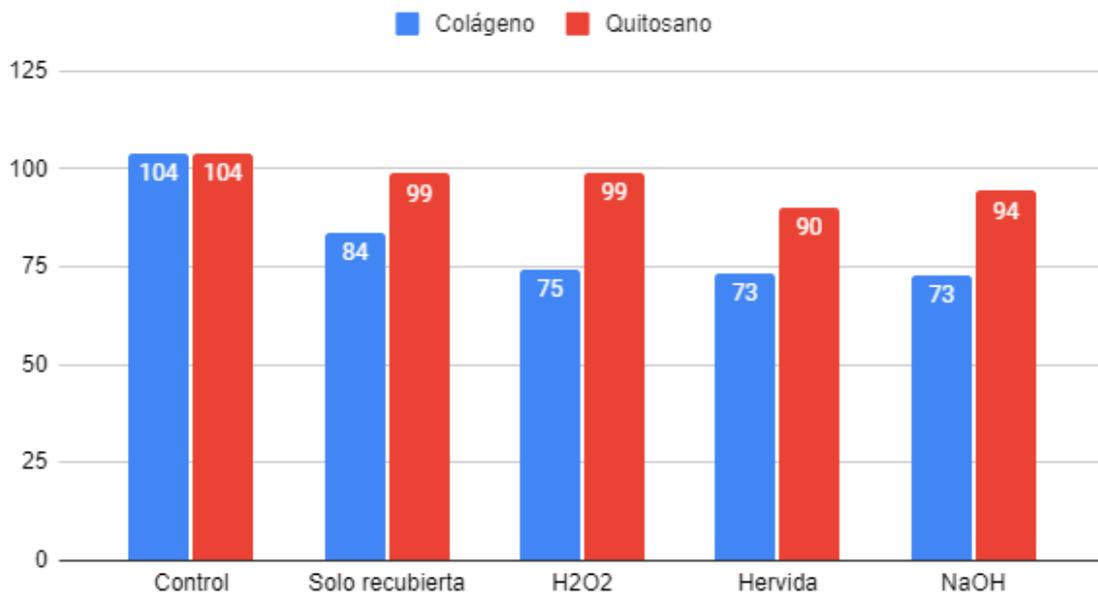


Figura 23: Resultados de los valores de ángulo de contacto obtenidos.

A partir del resultado obtenido con el análisis del ángulo de contacto se descartó el uso del recubrimiento con quitosano y se continuó analizando los tratamientos para adherir colágeno únicamente.

### Microscopio de fuerza atómica

Para observar la presencia de colágeno en la superficie de la membrana se analizaron imágenes de la topografía de la membrana tratada con colágeno (para cada tratamiento, con y sin APTES) utilizando un AFM (microscopio de fuerza atómica), modelo Flex-Axiom de la marca Nanosurf (Fig 24).

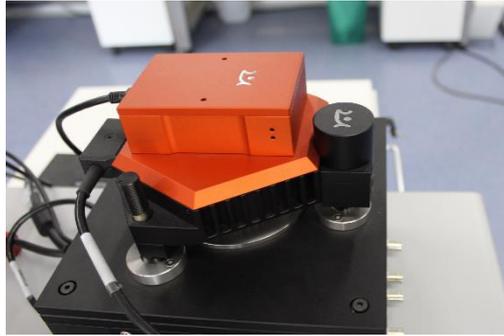


Figura 24: imagen del AFM perteneciente a la Fundación Argentina de Nanotecnología.

Al analizar regiones de 10  $\mu\text{m}$  por 10  $\mu\text{m}$  de las membranas tratadas previamente se observó la presencia de fibras de colágeno en las muestras hervidas y sumergidas en NaOH (Fig. 25). En la membrana de control y tratada con  $\text{H}_2\text{O}_2$  no se observan estas fibras, indicando la ausencia del colágeno.

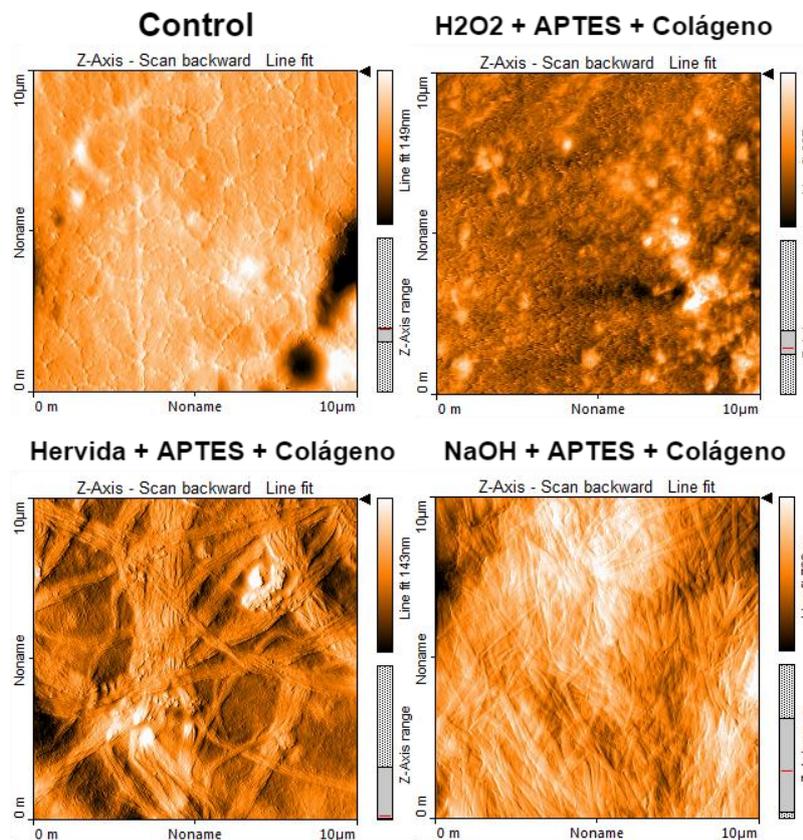


Figura 25: Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la superficie de las membranas tratadas. Se observa en color la altura de la superficie en nm con respecto al valor medio de altura medido.

### Proliferación

Para evaluar la citotoxicidad se cultivaron fibroblastos murinos de la línea celular NIH/3T3 sobre las membranas por 3 días a 37° C y 5%  $\text{CO}_2$ . Luego, para evaluar su proliferación, se fijaron con paraformaldehído 4% y se tiñeron los núcleos con DAPI (4

,6-diamidino-2-fenilindol). Se sembró la misma cantidad de células para cada una de las muestras.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio NIKON TE2000- U de óptica invertida, equipado con cámara CCD (Orca-AG, Hamamatsu) acoplada al microscopio y controlada por el programa Metamorph (Fig. 26). Se tomaron imágenes con objetivo de 10X y se analizó cuantitativamente el área cubierta por los cultivos en cada uno de los sustratos utilizando el plugin nucleouscounter del software de procesamiento de imágenes Image-J (Fig. 27).

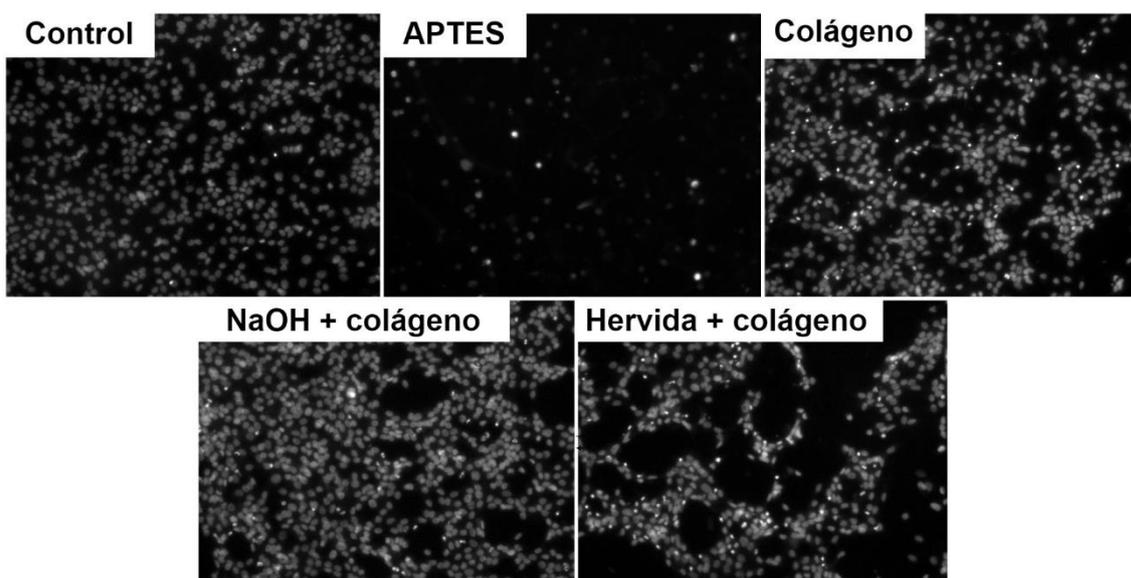


Figura 26: Imágenes de fluorescencia del cultivo de fibroblastos sobre las muestras de membrana de control (sin tratamientos), tratadas con APTES, recubiertas con colágeno, tratadas con NaOH y recubiertas con colágeno y hervidas y recubiertas con colágeno.

Las membranas sin tratamiento, las tratadas solo con colágeno o tratadas con colágeno y NaOH resultaron con mínima citotoxicidad, de acuerdo a la alta confluencia y una densidad celular que cubre al sustrato casi en su totalidad (Fig. 24). En cambio, las muestras tratadas con APTES resultaron con una citotoxicidad media, evidenciada por la menor densidad celular, asociada a una menor adhesión.

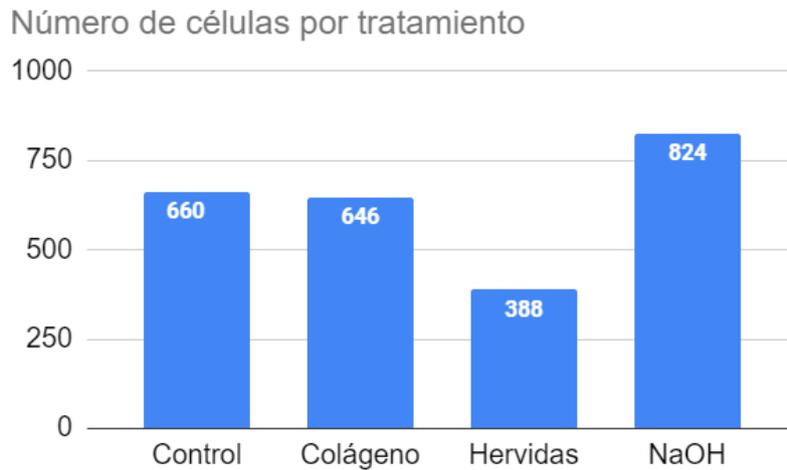


Figura 27: El siguiente grafico muestra el resultado del conteo de células cultivadas por tratamiento. Se puede observar que las membranas con NaOH fueron las que mostraron una mayor proliferación.

## Conclusión

Se obtuvo una membrana de fácil elaboración, con un módulo elástico similar al tejido biológico blando y un comportamiento lineal hasta una deformación del 20 %. Si bien los distintos tratamientos superficiales analizados aumentaron la hidrofiliidad (mayor ángulo de contacto), permitieron la adhesión superficial de colágeno, y en ciertos casos aumentaron la adhesión celular, es posible concluir que la membrana sin tratamiento es biocompatible. El tratamiento que mostró una mayor presencia de células adheridas al sustrato fue el de NaOH.

## V. Soporte de la membrana: diseño y mecanizado

La membrana desarrollada debe sujetarse de forma que sea posible generar vacío en su cara inferior y sembrar células en su cara superior, expuesta a presión ambiente. Para esto se diseñó el siguiente soporte.

### Diseño de la base y la tapa

El soporte cuenta con dos partes, una base sobre la cual se va a apoyar la membrana y una tapa que va a asegurar la membrana a la base utilizando 4 tornillos. La base cuenta con un tope en el centro sobre el cual se apoyará el área de la membrana en la cual se cultivarán las células (Fig. 28). Un orificio a través de la pared, permite la conexión con una tubuladura donde se generará vacío.

Cuatro orificios permiten ajustar la base con la tapa utilizando tornillos y remaches roscados de acero inoxidable (Fig. 29). Para el diseño de las piezas se utilizó el software de diseño Solidworks® que permite modelar piezas en 3D.

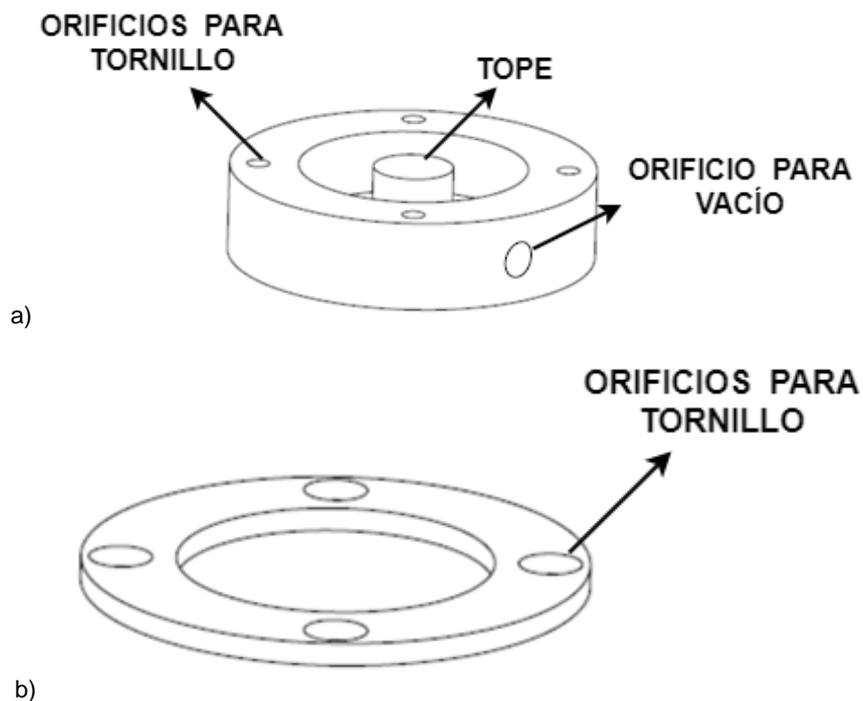


Figura 28: Dibujos de las piezas diseñadas. a) Diseño de la base. b) Diseño de la tapa. En el anexo I se puede observar los planos y las medidas de las piezas realizadas.



Figura 29: Izq, tornillos y remaches de acero inoxidable utilizados. Der, acople rápido.

## Mecanizado y material de las piezas

Las piezas diseñadas fueron mecanizadas utilizando un CNC (torno de Control Numérico Computarizado) a partir de bloques del material polioximetileno comercialmente conocido como Delrin®, de la marca Dupont.

Este material posee elevada rigidez y resistencia mecánica. Cuenta con una gran estabilidad dimensional, tanto ante humedad como ante temperaturas menores a 175°C.

## Conclusión

Se obtuvieron piezas rígidas con estabilidad mecánica, lo que les permite ser utilizadas en un cuarto de cultivo ya que no se deforman con el tiempo ni ante condiciones de temperatura, humedad y gases controlados (Fig. 30). Las mismas sostienen la membrana de manera que se pueda aplicar vacío por debajo para deformarla.

Todas las partes del dispositivo son autoclavables (121°C o 134°C), para evitar la contaminación del cultivo celular y para trabajar bajo esterilidad en una campana de flujo laminar o cabina de bioseguridad.

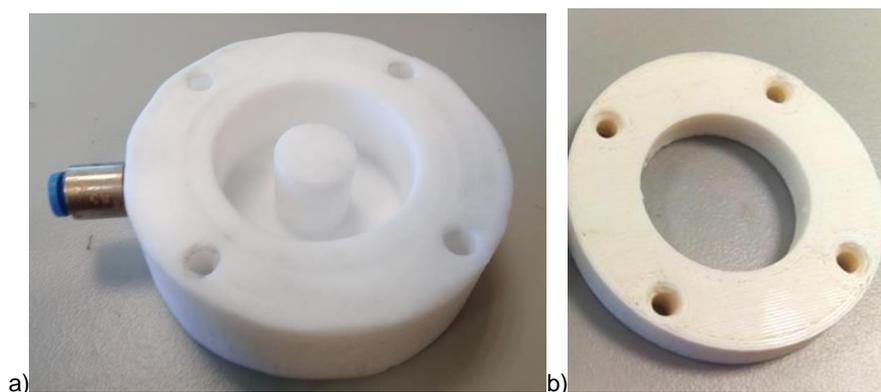


Figura 30: Imágenes de las piezas obtenidas. a) Base mecanizada junto con el acople rápido. b) Tapa mecanizada.

## VI. Generador de señales de presión

La membrana flexible y su soporte forman una cámara hermética en la cual se debe controlar la presión para lograr la deformación deseada. Para cumplir con este objetivo se desarrolló un generador de señales de presión.

El generador se encuentra compuesto por un sensor de presión, una bomba de vacío, una válvula proporcional, un microcontrolador y una placa con teclado y pantalla o *display* LCD (Fig. 31).

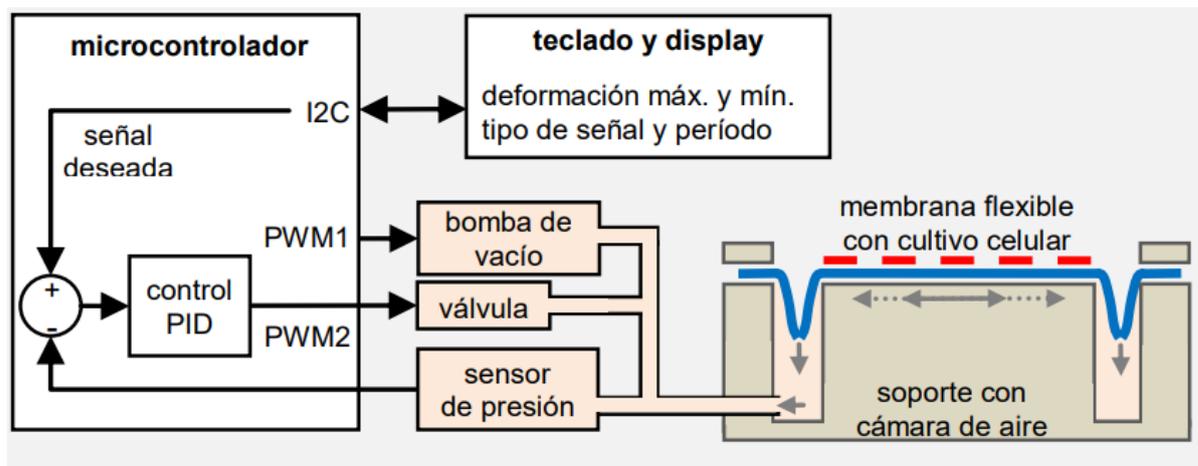


Figura 31: Esquema del generador de señales de presión.

### Bomba de vacío

Se utilizó una bomba de vacío de tipo diafragma (Fig. 32)



Figura 32: Bomba de vacío utilizada, de la marca TCS electrical motor, modelo JQB2438274.

La bomba utilizada trabaja con una tensión máxima de 4.5 V, corriente máxima de 500 mA y alcanza una presión negativa de 65 kPa (respecto a ambiente) y un flujo máximo de 4 litros por minuto.

Se caracterizó la bomba midiendo el valor de presión generado a distintos valores de corrientes de alimentación (Fig. 33). Se observó una relación no lineal y con histéresis.

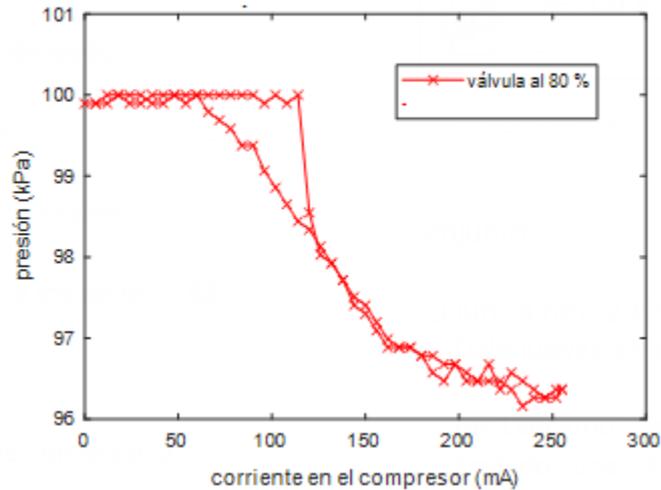


Figura 33: Presión absoluta medida dentro de la cámara en función de la corriente de alimentación de la bomba de presión, con la válvula cerrada al 80%.

Las mediciones fueron realizadas con la válvula cerrada en un 80%, ya que cuando el circuito neumático está completamente cerrado la bomba se detiene al llegar al vacío máximo, en cambio sí está completamente abierta no genera vacío.

### Sensor de presión negativa

Se utilizó un sensor de la marca NXP modelo MPX5100AP [22] que permite medir presión absoluta en el rango de 15 a 115 kPa con salida analógica amplificada entre 0 y 5V. El mismo tiene una sola entrada de presión la cual se conecta con el circuito a medir. Cuenta con una entrada de alimentación (5V), una entrada para tierra y una salida con la tensión de medición (Fig. 34).



Figura 34: Imagen del sensor analógico utilizado.

Para obtener los valores de presión, se utilizó la fórmula provista por el fabricante:

$$V_{out} = V_s * (0.009 * P + 0.04) \quad (1)$$

donde P es la presión medida,  $V_s$  es la tensión de alimentación del sensor y  $V_{out}$  es la tensión medida a la salida del sensor.

Despejando se obtiene la presión a partir de la siguiente expresión:

$$P = \frac{V_{out} - 0.2}{0.045V} \quad (2)$$

donde se reemplazó a Vs con un valor de 5 V en la ecuación 1.

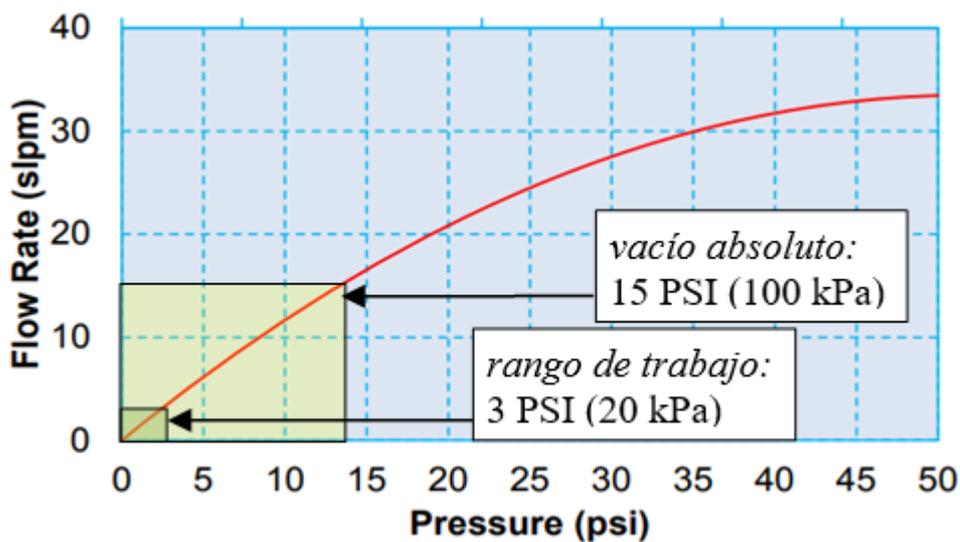
### Válvula proporcional

Se utilizó una válvula proporcional de 2 vías tipo solenoide de la marca Parker modelo VSO NC (normal cerrada) serie 11 de 23 Ohm y 8V DC (número 910-000047-012), con un flujo de hasta 56 slpm (litro por minuto standar) [23] (Fig. 35). Se evaluaron otras válvulas más económicas pero no permiten trabajar con presiones negativas, la válvula utilizada permite trabajar tanto con presiones positivas como negativas.

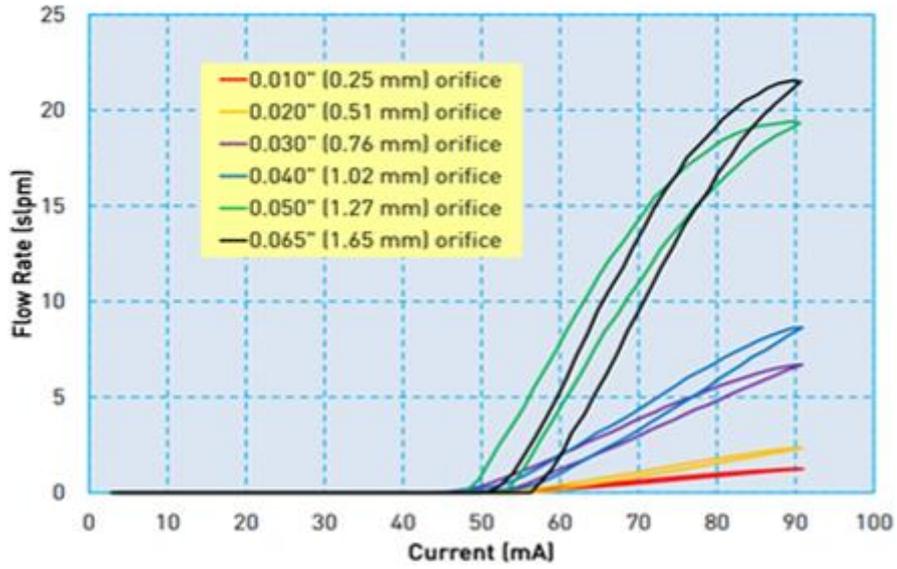


Figura 35: Imagen de la válvula miniatura utilizada

La válvula se controla por corriente (máximo de 340 mA) y tiene una respuesta no lineal, típica de este tipo de válvulas (Fig. 36).



a)



b)

Figura 36: Curvas otorgadas por el fabricante de la válvula [24]. a) Curva de flujo en función de la presión.

b) Curva de flujo en función de la corriente de alimentación de la válvula.

## Circuito de control

Para controlar la corriente en la válvula se implementó el siguiente circuito (Fig. 37):

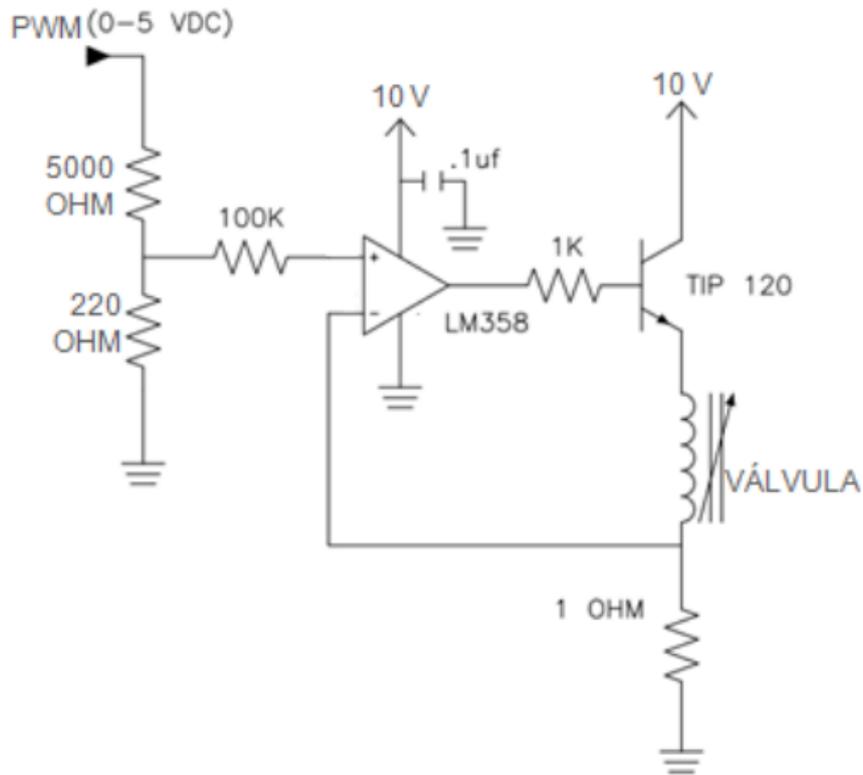


Figura 37: circuito recomendado por el fabricante para alimentar la válvula [24].

Se utilizó un circuito similar para controlar la bomba de presión.

La señal de control PWM (Señal de modulación por ancho de pulsos, en inglés de Pulse-Width Modulation), fue filtrada con un filtro pasabajos RC con  $R=680\ \Omega$  y  $C=100\ \mu\text{F}$  que resulta en una frecuencia de corte de 68 Hz.

La corriente  $I_{v\grave{a}lvula}$  aplicada en la válvula está dada por la siguiente fórmula:

$$I_{v\grave{a}lvula} = V_{pwm} * \frac{220\Omega}{5000\Omega+220\Omega} * 1\Omega \quad (3)$$

donde  $V_{pwm}$  es la tensión de control PWM. La corriente  $I_{v\grave{a}lvula}$  varía entre 0 y 212 mA proporcionalmente a la tensión  $V_{pwm}$ .

Se midió la presión en función de la corriente de alimentación de la válvula para diferentes corrientes en la bomba de vacio (Fig. 38).

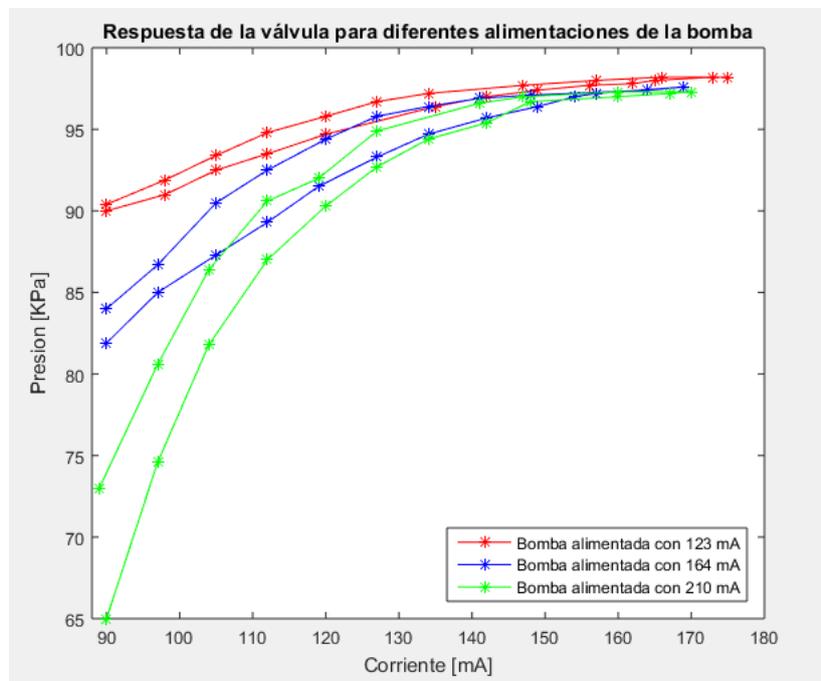


Figura 38: Presión medida para diferentes valores de corriente en la válvula con la bomba alimentada a tres corrientes distintas.

Se observó que la válvula regula la presión para corrientes entre 90 mA y 170 mA, fuera de este rango la válvula se cierra o abre completamente.

## Microcontrolador

Se utilizó una placa de Arduino MEGA, con un microcontrolador Atmega 2560, por su bajo costo y fácil acceso. Se utilizó dos salidas PWM pulsadas a 500 Hz entre 0 y 5 V para controlar la válvula y la bomba de presión. Se digitalizó la señal de presión con un conversor ADC de 10 bits entre 0 y 5V. Se conect otra entrada analógica a un teclado

de 6 botones. Un pin i2c permitió controlar el display LCD. Finalmente, el puerto UART fue usado para comunicarse con una PC.

## Teclado y display

Se utilizó una placa genérica de Arduino que incluye un display LCD (Liquid Crystal Display) de 16x2 caracteres y un teclado de 6 botones para que el usuario pueda seleccionar forma de señal, amplitud y frecuencia (Fig. 39). De esta forma no es necesario disponer de una computadora para utilizar el dispositivo.



Figura 39: Imagen de la placa utilizada con display y botones, se pueden observar en verde los diferentes componentes de la placa.

Se utilizó una fuente conmutada de 220V AC a 9V DC con una salida de corriente de 0.5A (positivo al centro) para alimentar la placa de Arduino.

## Conclusión

En la siguiente figura se puede observar la interacción entre los diferentes componentes del generador de presión: la bomba y la válvula conectadas al circuito que acondiciona la señal proveniente del PWM de la placa de Arduino, junto con el display (Fig. 40).

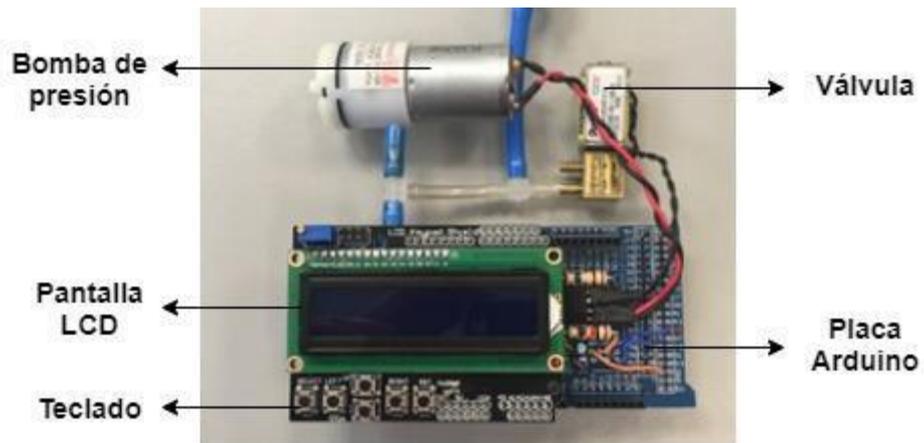


Figura 40: imágenes del generador de señales de presión.

El hardware implementado funciona como interfaz con el usuario y permite que el microcontrolador alimente la válvula y bomba de vacío para replicar la señal. A continuación, se describe la implementación del firmware del microcontrolador.

## VII. Generador de señales de presión: firmware e interfaz de usuario

### Firmware

El firmware se desarrolló utilizando el entorno de programación visual Simulink®, perteneciente a Matlab®. El mismo cuenta con un complemento que permite programar el microcontrolador de Arduino y controlar los periféricos.

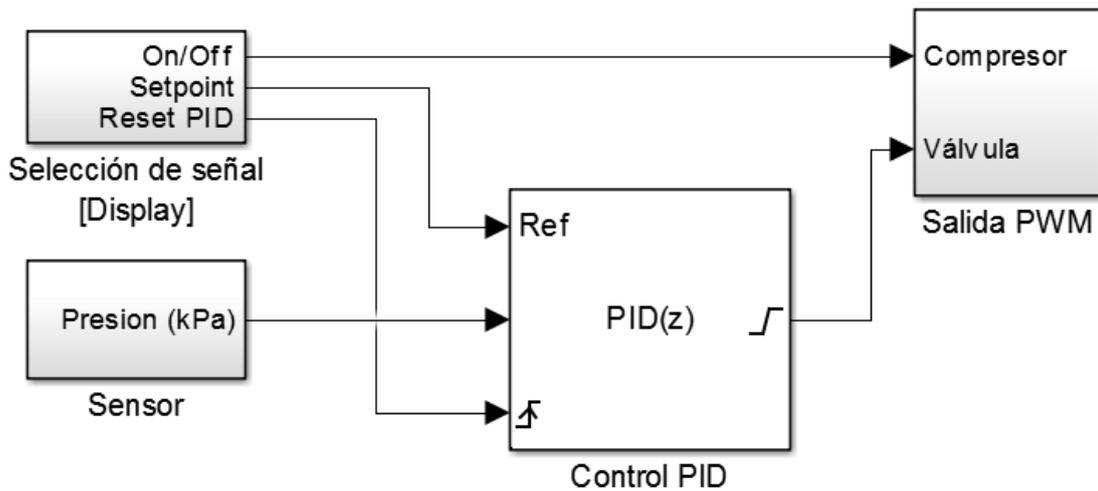


Figura 41: Esquema del firmware realizado. El bloque “Sensor” acondiciona la señal del sensor y la traduce a presión, luego la ingresa en el bloque del control PID. El bloque “Selección de señal” muestra los mensajes en el display, calcula la señal ingresada por el usuario y la envía al bloque de control para ser usada como referencia. Las señales de salida calculadas por el bloque “Control PID” son enviadas al bloque “Salida PWM” que envía dos señales, una para prender la bomba y la otra para controlar la válvula.

### Bloque de Interfaz de usuario

El microcontrolador ejecuta el firmware cada 10 ms y calcula la señal de presión deseada a partir de los parámetros ingresados por el usuario (tipo de señal, deformación máxima, mínima, y período) a través del teclado y display LCD (Fig. 43). El usuario puede modificar estos parámetros en cualquier momento, incluso durante el funcionamiento, mediante un menú representado con el siguiente diagrama de estados:

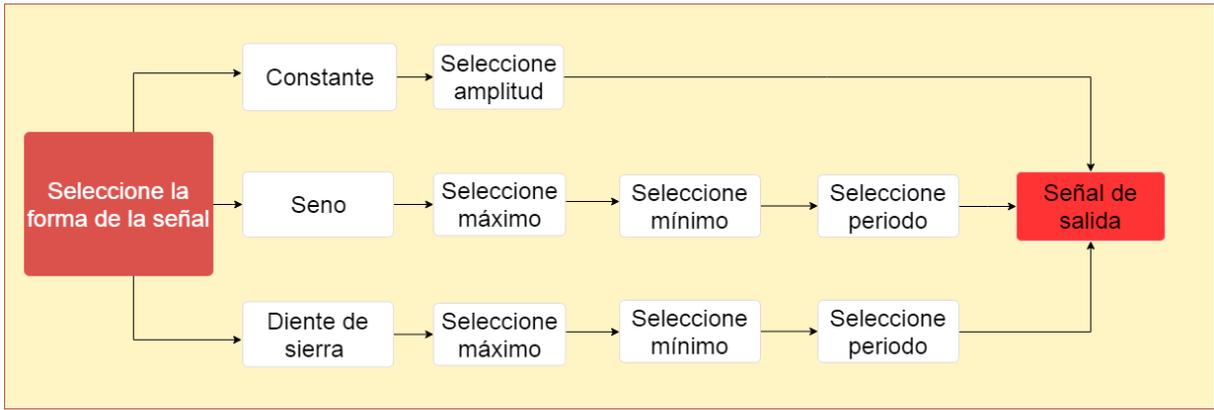


Figura 42: Diagrama del menú para seleccionar la función de deformación a seguir por el dispositivo.

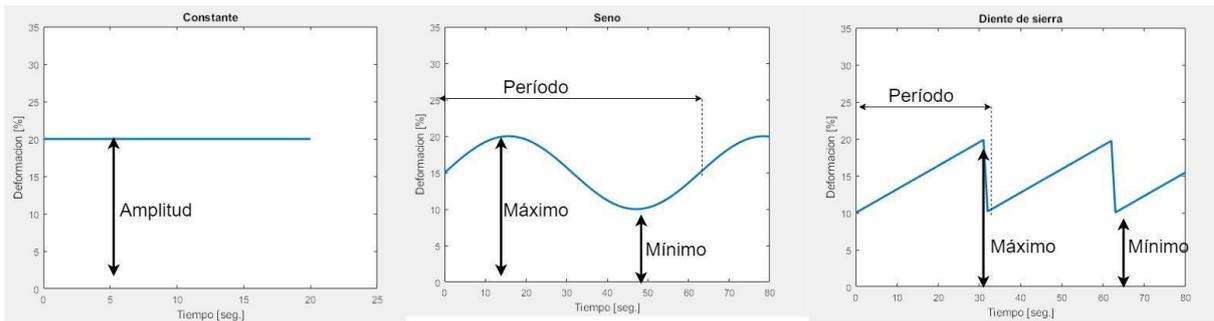


Figura 43: Parámetros de la función para seleccionar

El bloque llamado “Selección de señal” (Fig. 44), calcula y envía la señal de referencia al bloque de control a partir de los parámetros seleccionados por el usuario.

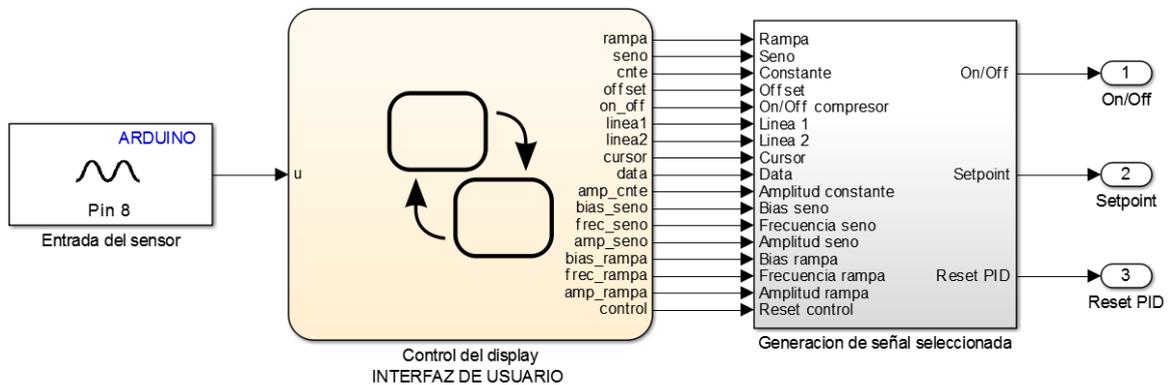


Figura 44: Esquema del bloque de selección de la señal, el mismo se compone de tres partes: la entrada de la señal analógica, el bloque de interfaz con el usuario y el bloque que genera la señal seleccionada.

Se realizó un programa con interrupciones que permite mostrar en el display los pasos a seguir por el usuario y esperar a que el mismo seleccione la opción deseada, este trabajo lo realiza el bloque “Control del display”. A su vez almacena los parámetros seleccionados y los envía al bloque “Generación de la señal seleccionada” que envía tres salidas, la primera prende la bomba, la segunda proporciona la señal de referencia para el bloque de control, calculada a partir de los datos seleccionados por el usuario, y la tercera permite reiniciar el sistema.

## Conclusión

Se escribió un programa que permite: en primer lugar, mostrar en el display los pasos a seguir por el usuario; en segundo lugar, leer las señales provenientes de la botonera para interpretar la selección del usuario. Luego genera una señal con la información ingresada que será utilizada por el sistema de control como referencia para ser replicada a la salida del generador. A continuación, se describe el sistema de control implementado por el microcontrolador.

## VIII. Sistema de control

El objetivo del sistema de control es replicar la señal de presión seleccionada por el usuario, a partir de la corriente aplicada a la válvula (actuador). El control debe linealizar la respuesta de la válvula y la planta, compuesta por el compresor, la respuesta mecánica de la membrana y el volumen de aire del circuito neumático.

Se trabajó con la presión aplicada por debajo de la membrana (variable controlada) para el desarrollo del generador y el diseño del control, la conversión entre presión y deformación (variable de interés) se describe en el siguiente capítulo.

### Estructura del control

Se implementó un control a lazo cerrado (Fig. 45) que permite generar distintos tipos de señal (constante, cuadrada, rectangular, rampa) para periodos mayores a 1 segundo y un rango de presión entre 0 y - 30 kPa respecto a ambiente.

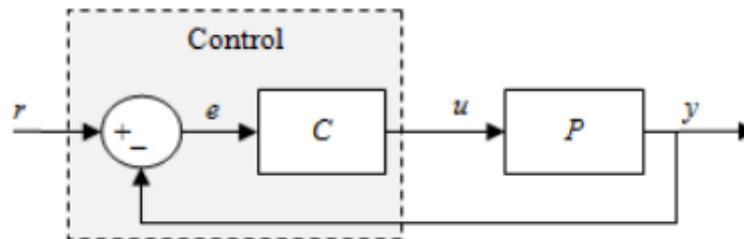


Figura 45: Diagrama de bloques del control con realimentación implementado.

La señal de control  $u$  (señal PWM sobre la válvula) es la entrada a la planta  $P$ , cuya salida es  $y$  (presión en la cámara, medida por el sensor); la señal de referencia  $r$  (presión deseada) permite definir la señal de error  $e = r - y$ , que alimenta al control  $C$  [24].

Se eligió un control con estructura proporcional-integral-diferencial (PID) paralela cuya ecuación es:

$$C(S) = k_P + \frac{k_I}{S} + S k_D \quad (4)$$

Donde  $s$  es la variable del dominio de la transformada de Laplace;  $k_p$ ,  $k_i$  y  $k_d$  son las ganancias proporcional, integral y derivativa respectivamente [24].

### Sintonización

Para determinar los parámetros del controlador  $k_p$ ,  $k_i$  y  $k_d$ , se evaluaron 2 métodos propuestos por Ziegler y Nichols [24].

El primer método consiste en aplicar un escalón de corriente a la válvula con el compresor encendido. Se midió la señal de presión a la salida para evaluar la respuesta del sistema (Fig. 46).

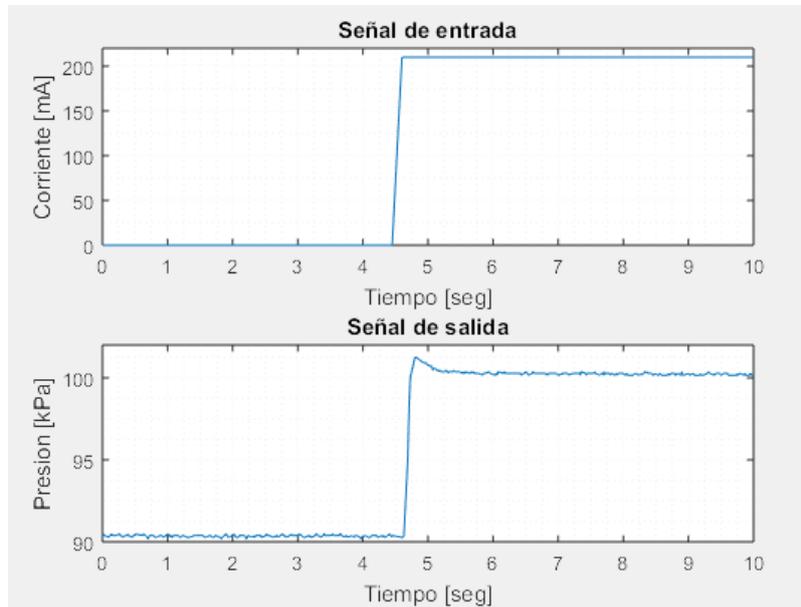
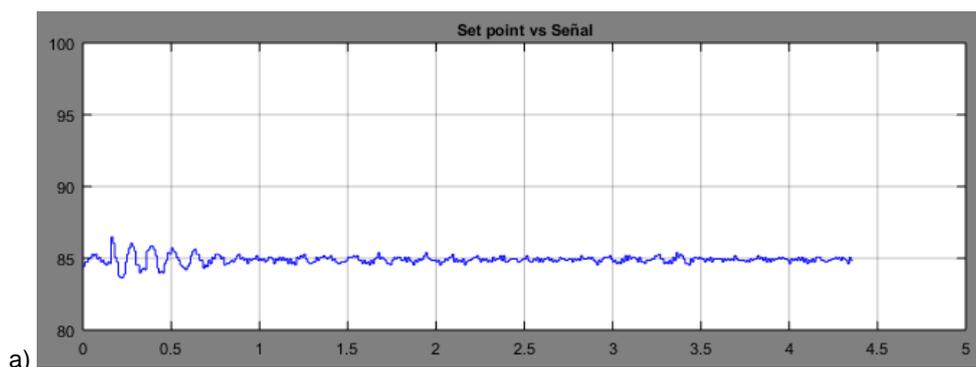


Figura 46: señal de corriente de entrada enviada a la válvula y la señal de presión medida, manteniendo la bomba de presión en un valor fijo.

Dado que la respuesta al escalón no se comporta como una S, como requiere este método, se implementó el segundo método de Ziegler-Nichols.

Este consiste en usar sólo la acción de control proporcional e incrementar  $K_p$  de 0 a un valor crítico  $K_c$ , en donde la salida exhiba oscilaciones sostenidas, con un período  $P_c$  determinando así la ganancia crítica  $K_c$ , y el periodo  $P_c$  experimentalmente (Fig. 47 y 48).



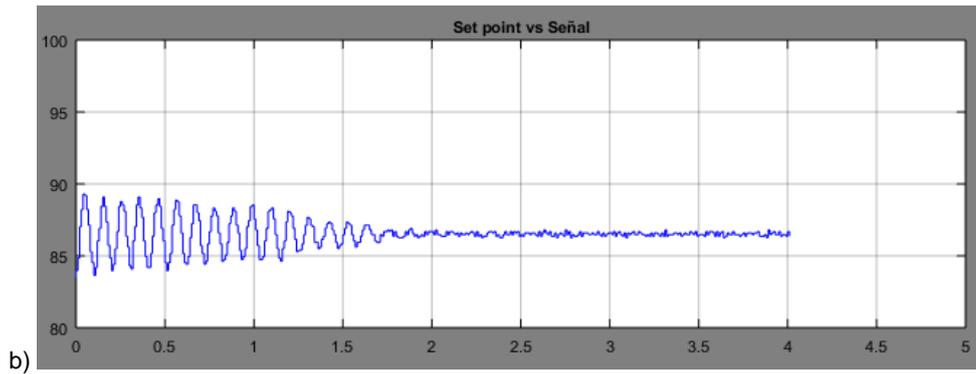


Figura 47: Señal medida al aumentar el  $K_p$ . a) Rampa con  $K_p=20$ . b) Rampa con  $K_p=36$ , se puede observar que ante el aumento del  $K_p$  la señal oscila pero se vuelve a estabilizar rápidamente.

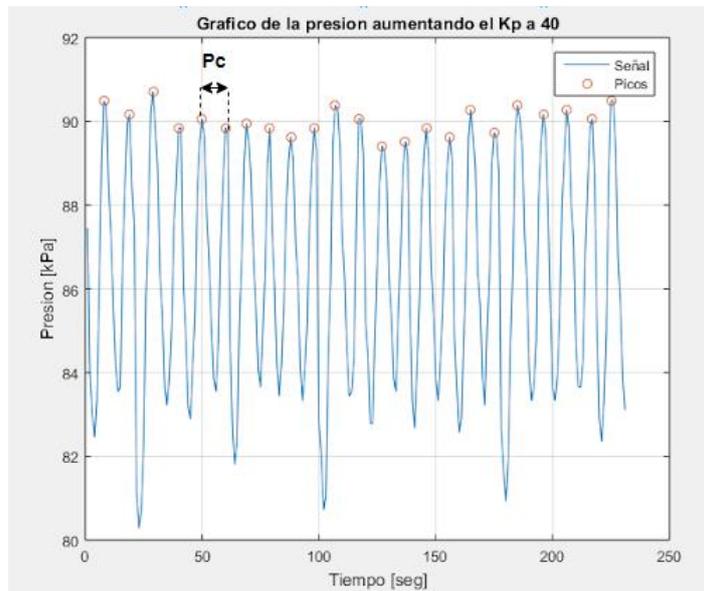


Figura 48: señal con oscilaciones sostenidas con los picos, en  $P_c$  se puede observar uno de los periodos de la señal.

Para obtener el  $P_c$  se midió el periodo entre picos de la señal (Fig. 48), se obtuvo un periodo promedio de 9.86 seg y un  $K_c$  de 40.

Los parámetros  $K_p$ ,  $K_i$  y  $K_d$  pueden calcularse de acuerdo a la siguiente tabla:

Tipo de controlador	$K_p$	$K_i$	$K_d$
P	$0,5 K_c$	0	0
PI	$0,45 K_c$	$1/1,2 P_c$	0
PID	$0,6 K_c$	$0,5 P_c$	$0,125 P_c$

Tabla 2: Valores descriptos por el método de Ziegler-Nichols para obtener los coeficientes del control a partir de  $K_c$  y  $P_c$  [25].

El control PI (proporcional e integral) mostró una mayor estabilidad y tiempo de respuesta que el control PID, al utilizar una misma señal. Por lo tanto, los coeficientes resultaron  $K_p=18$  y  $K_i=8,21$ .

Posteriormente se ajustó el coeficiente integral  $K_i$  manualmente para obtener una respuesta más rápida en el control. Se utilizaron los parámetros obtenidos previamente, se aumentó la constante  $K_i$  y se evaluó la respuesta al escalón (Fig. 49).

Para  $K_i=100$  la señal de presión medida no supera la señal deseada (no hay "overshoot") y se obtuvo una respuesta que alcanza la señal deseada en menos de 1 segundo. Aumentando el parámetro  $K_i$  la respuesta de la señal se vuelve aún más rápida, pero aumenta la inestabilidad.

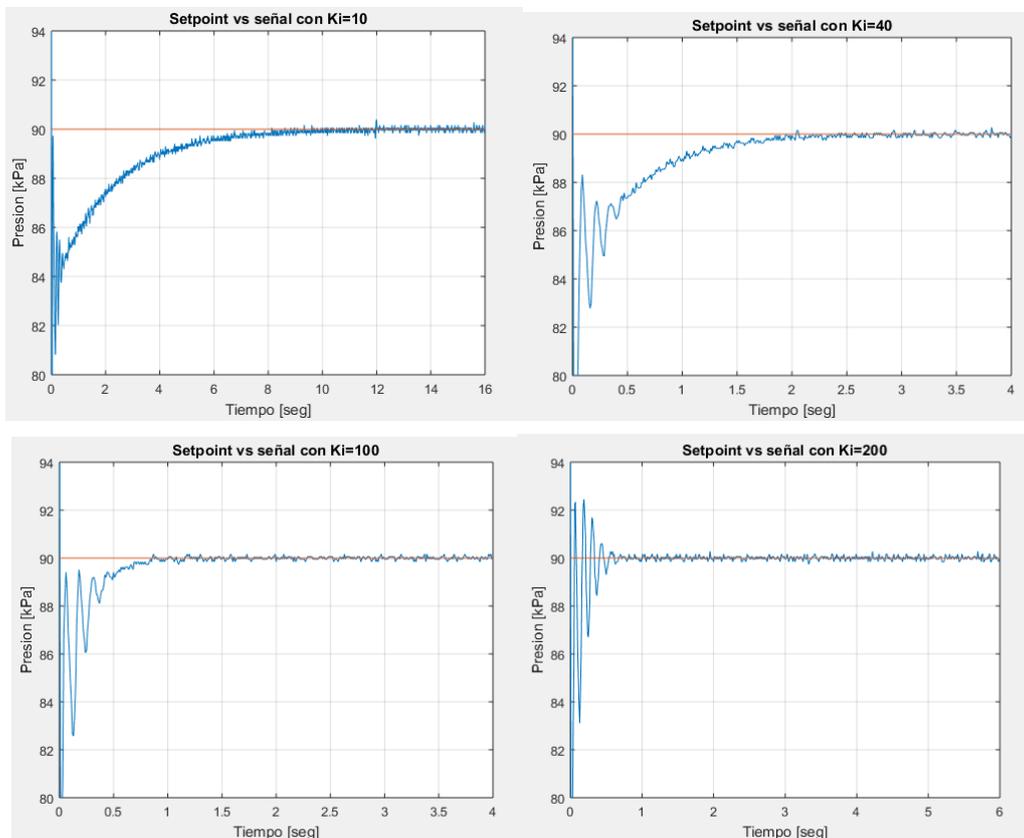


Figura 49: Respuestas del control para diferentes valores de  $K_i$  de 10, 40, 100 y 200. La respuesta para  $K_i=10$  no tiene un tiempo de respuesta suficiente para obtener una frecuencia de 1Hz. Para la señal con  $K_i=200$  se puede observar el efecto de *overshoot*.

Al verificar el funcionamiento en todo el rango de trabajo de la válvula, se observó que el control tiene una respuesta variable, aunque siempre es rápida y estable (Fig. 50).

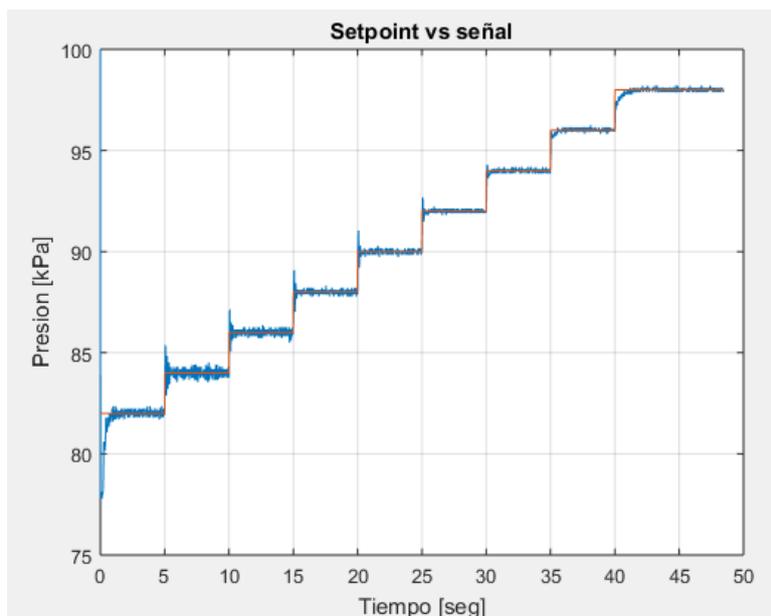


Figura 50: Respuesta del control para los diferentes rangos presiones.

## Cálculo de error

Se evaluó la respuesta del generador de señales de presión con el control a lazo cerrado para diferentes señales (constante, senoidal y diente de sierra), frecuencias (de 0,1 a 1 Hz) y amplitudes (de 2 a 14 kPa). Se calculó el error absoluto y relativo para la señal constante. Para las señales de presión variables se calculó el error medio absoluto y relativo.

### Señal constante

Se obtuvieron los siguientes errores aplicando una amplitud de 2 a 14 kPa:

Amplitud [kPa]	2	4	6	8	10	12	14
Error Absoluto [kPa]	0.20	0.14	0.19	0.23	0.28	0.32	0.37
Error Relativo [%]	1.43	1.00	1.36	1.64	2.00	2.29	2.64

Tabla 3: error máximo en kPa para cada amplitud, en presión, aplicada por debajo del sustrato.

### Señales con forma senoideal, diente de sierra y cuadrada

Se realizaron mediciones para diferentes señales deseadas. Se varió el tipo de señal (senoideal, diente de sierra y cuadrada) cada una con 4 amplitudes (2kPa, 4kPa, 10kPa y 14kPa) y 4 frecuencias (0.1Hz, 0.2Hz, 0.5Hz y 1Hz), (Fig. 51).

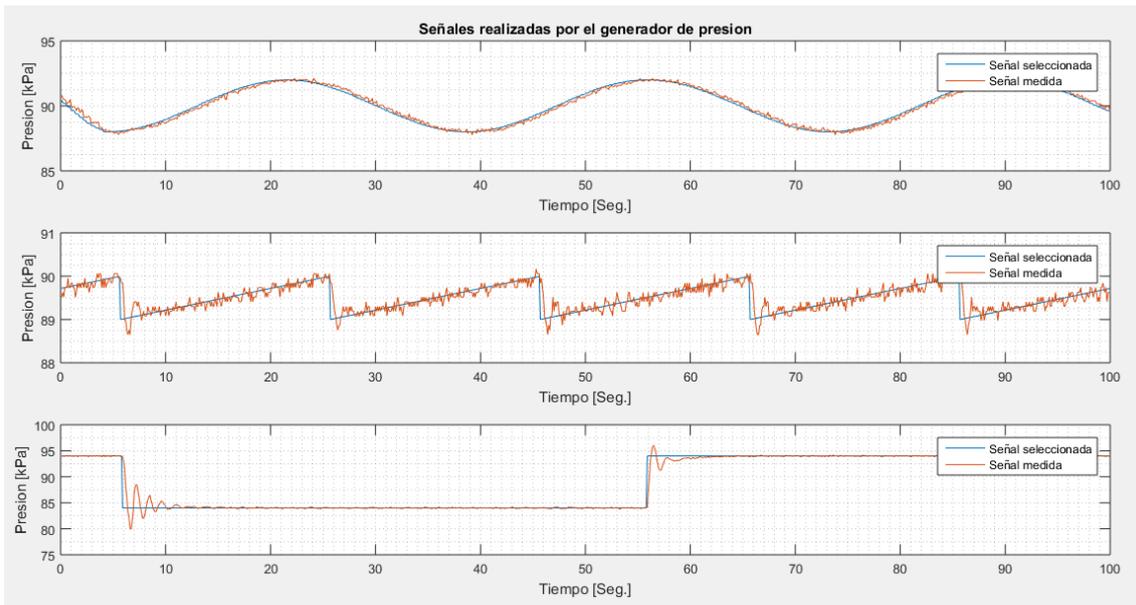


Figura 51: Señales realizadas por el generador de presión, se puede observar un seno, un diente de sierra y una cuadrada. En los gráficos se muestra la señal seleccionada como referencia para el control implementado y la medida por el sensor.

En el anexo II se pueden observar los resultados del cálculo de error medio para cada forma de señal.

## Conclusión

Para una señal de presión constante se obtuvo siempre un error menor a 0,37 kPa, lo que representa un 2,64% del rango de amplitud total. Para la señal senoidal se obtuvo un error relativo medio entre 3 y 25 %. Para la señal de diente de sierra se obtuvo un error relativo medio entre 2 y 11 %. Finalmente, para la señal cuadrada se obtuvo un error relativo medio entre 1 y 14 %.

Para aplicar una deformación a la membrana controlando la presión, es necesario relacionar estas variables, en la siguiente sección se describe el método implementado para obtener esta relación.

## IX. Medición de deformación de la membrana

Para cuantificar la deformación de la membrana se implementó un programa de procesamiento de imágenes en el entorno de programación Matlab® que utiliza como entrada dos imágenes de la superficie de la membrana a diferentes presiones, lo que nos permitirá calcular la relación entre la presión y la deformación.

### Marcado de la membrana

Se marcó la membrana con el objetivo de tener puntos detectables por el programa y medir cómo varía la distancia entre estos puntos con la presión aplicada. Se grabaron diferentes patrones en la superficie sobre la cual se curaban las membranas. Posteriormente se agregó carbón particulado, y se limpiaron con agua para sacar el excedente (Fig. 52).

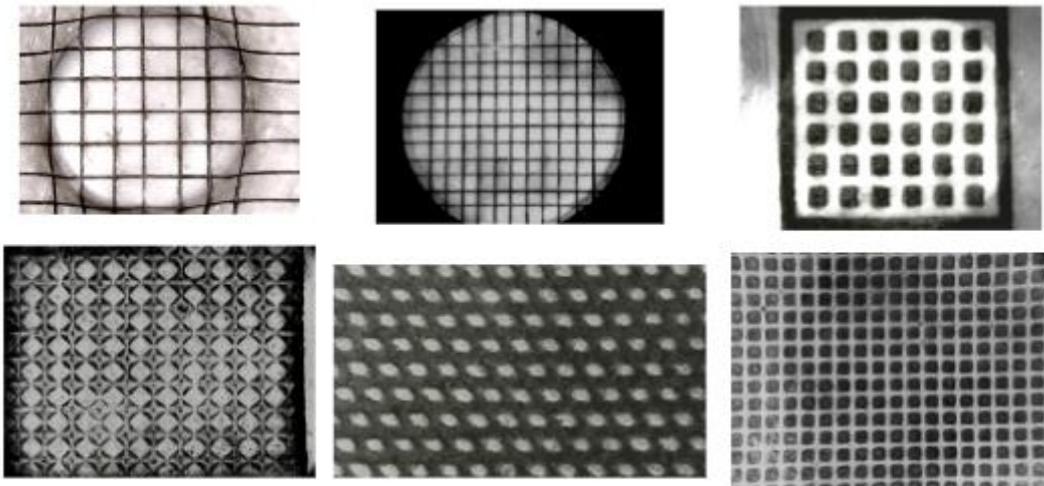


Figura 52: Imágenes de la membrana marcada con diferentes patrones.

Se observaron dos fenómenos en las marcas realizadas, uno es el de traslación y el otro es el de deformación (Fig. 53). Por ejemplo, podemos ver el caso de estas dos imágenes de la membrana marcada:

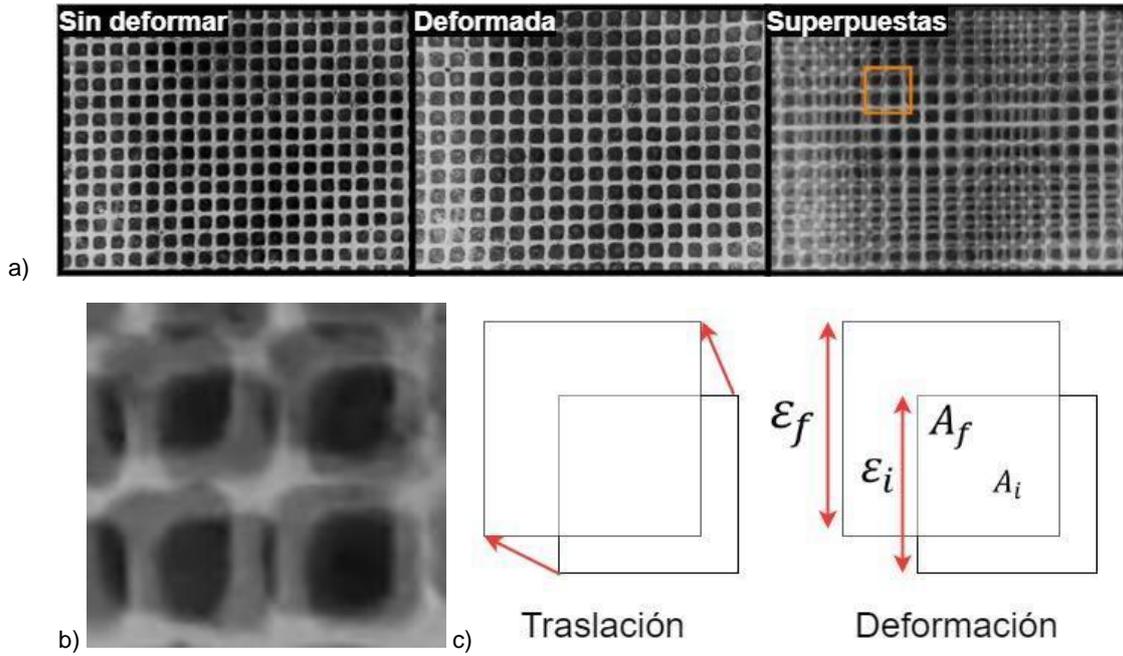


Figura 53: Esquema de los fenómenos que ocurren al estirar la membrana. a) Imágenes de la membrana sin deformar, deformada y superpuestas, se marca una porción de la membrana que se observa en la imagen b. b) Imagen de la porción seleccionada de las dos imágenes superpuestas. c) Esquema de los dos efectos detectados en la porción de la membrana mostrada en la imagen b.

Se calculó la deformación como:

$$\%d = \frac{\Delta\epsilon}{\epsilon} = \frac{\epsilon_f - \epsilon_i}{\epsilon_i} \quad (5)$$

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{A_f - A_i}{A_i} = \frac{\Delta\epsilon_x}{\epsilon_x} \frac{\Delta\epsilon_y}{\epsilon_y} \quad (6)$$

Donde  $\%d$  es el porcentaje de deformación que se busca medir,  $\Delta\epsilon$  es la variación de longitud en una dimensión,  $\epsilon_i$  es la longitud inicial,  $\epsilon_f$  es la longitud final,  $\Delta A$  es la variación del área,  $A_i$  es el área inicial y  $A_f$  el área final.

Si se asume que  $\epsilon_x = \epsilon_y = \epsilon$  la ecuación 4 y 5 queda:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\Delta\epsilon^2}{\epsilon^2} = \%d^2 \quad (7)$$

Se obtiene la siguiente relación:

$$\%d = \sqrt{\frac{\Delta A}{A}} \quad (8)$$

El programa mide las áreas marcadas de la membrana sin deformar y deformada y al superponerlas calcula la variación porcentual entre ellas (Fig. 54).

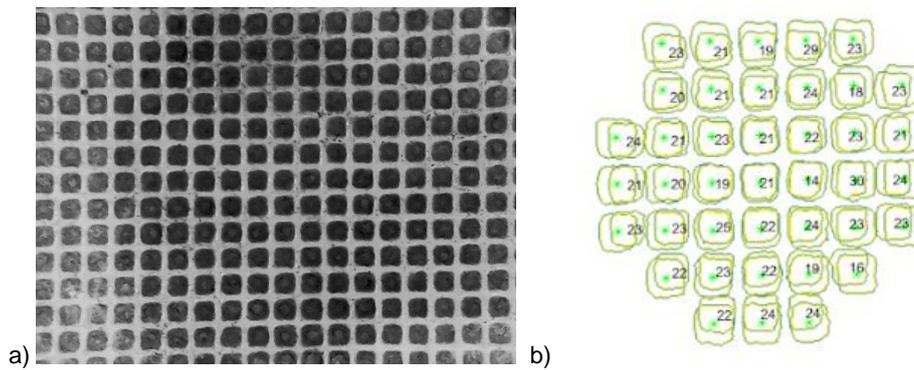


Figura 54: a) Imagen obtenida de la membrana marcada. b) Imagen obtenida por el programa realizado. Se puede observar la superposición de las áreas de la membrana en reposo y aplicando presión, sobre cada área se muestra el porcentaje de deformación calculado.

Además, analiza la relación entre deformación y desplazamiento (Fig. 55).

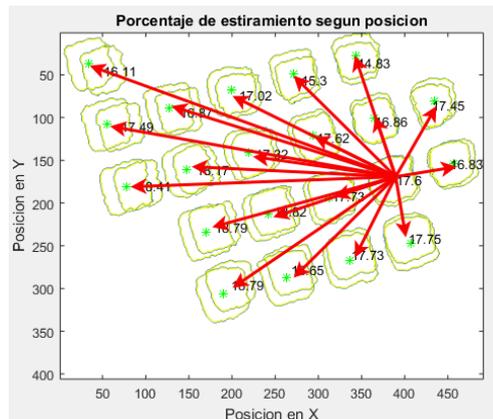


Figura 55: imagen de la cuantificación de la deformación con flechas en rojo indicando los radios entre el centro de las áreas medidas y el centro de traslación.

### Independencia entre la deformación y la traslación

Se graficó la deformación para cada punto en función de su posición (Fig. 56). Se observa cierta dispersión, pero no se observa ninguna correlación.

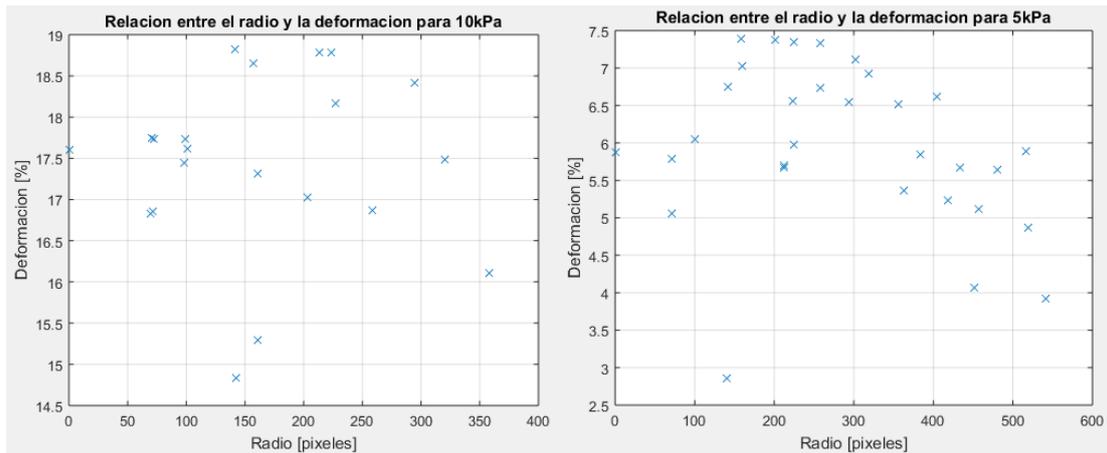
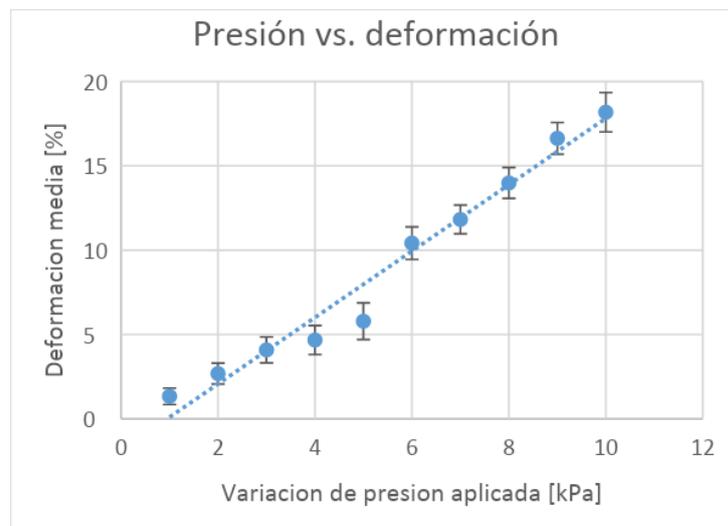


Figura 56: Gráfico de distancia con respecto al centro en función de la deformación para dos presiones aplicadas diferentes.

## Relación presión deformación

Se analizó la variación porcentual de las áreas para diferentes presiones. Se obtuvo una relación lineal cuya pendiente permite convertir presión a deformación y viceversa (Fig. 57). En conjunto con el generador de presión es posible utilizar esta pendiente para reproducir la deformación deseada controlando la presión.



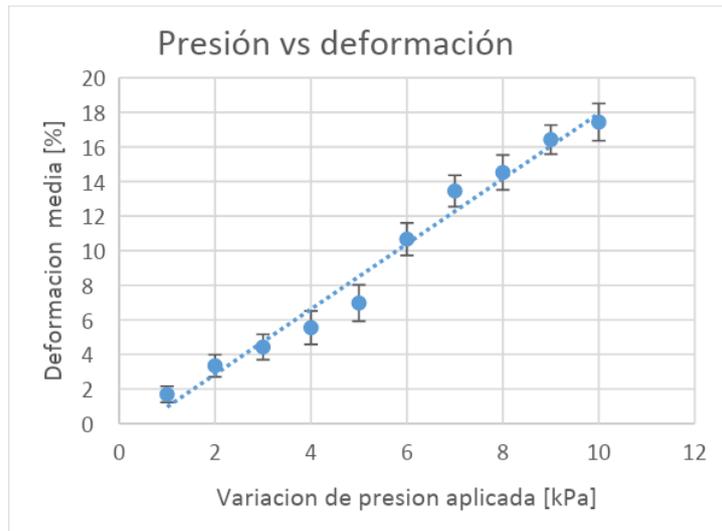


Figura 57: Gráficos que relacionan la presión aplicada por debajo del sustrato con el porcentaje de deformación. Cada una de las curvas obtenidas corresponde a un ensayo de diferentes membranas.

## Conclusión

Se comprobó que el fenómeno de traslación no se encuentra relacionado con la deformación medida en la membrana. Además, se validó el método para traducir presión a deformación al encontrar una relación lineal entre estos dos parámetros. Para contar con un valor que relacione estos dos parámetros es necesario obtener un mayor número de mediciones con diferentes membranas.

## X. Comparativa de precios

### Dispositivos comerciales

Se comparó el costo de adquisición de dos dispositivos comercialmente disponibles, similares, pero con diferentes capacidades, como se resume en la tabla 4.

Dispositivo	Empresa	Aplicación	Cantidad de cultivos	Dirección de la fuerza	Uso en microscopio	Costo [USD]
FlexcellJr	Flexcell	Fuerza de tracción (piel, músculo, etc)	1	Equiaxial o uniaxial	Si	\$30,257.00
STB-100	Strexcell	Fuerza de tracción (piel, músculo, etc)	1	Uniaxial	No	\$1,045.00

Tabla 4: Costos de los dispositivos comerciales, indicando modelo, empresa y capacidades.

En particular, el dispositivo FlexcellJr, de la empresa Flexcell, permite aplicar fuerzas equiaxiales en un solo cultivo, por lo que se asemeja a las características del dispositivo desarrollado con el diferencial de ser montable en microscopio. Su elevado precio, se debe a los componentes que utiliza, detallados en la tabla 5.

Componente	Precio (USD)
FlexJr tensión system (computadora, controlador, software)	\$ 19,777.00
Bomba de vacío	\$ 4,980.00
Reservorio de presión	\$ 900.00
StageflexerJr device	\$ 2,500.00
Costo de envío	\$ 2,100.00
<b>Costo de adquisición</b>	<b>\$ 30,257.00</b>
Consumibles	Precio (USD)
Membrana de silicona (1 unidad)	\$23.00
<b>Total costo variable (por unidad)</b>	<b>\$23.00</b>

Tabla 5: Cálculo de costos de adquisición y uso del StageFlexer Jr.

El sistema con menores funcionalidades es el STB-100, de la empresa Strexcell, que permite aplicar únicamente fuerzas uniaxiales estáticas de manera manual. Cuenta con una mínima cantidad de componentes, resultando en un costo de adquisición de \$ 1,345.00 USD (Tabla 6).

Componente	Precio (USD)
Sistema STB-100	\$ 1,045.00
Costo de envío	<b>\$ 300.00</b>
<b>Costo de adquisición</b>	<b>\$ 1,345.00</b>

Tabla 6: Calculo de costos de adquisición y uso del STB-100.

## Cálculo de costos del dispositivo desarrollado

Se realizó el cálculo del costo del dispositivo desarrollado en este trabajo (Tabla 7). A futuro se pueden implementar cambios en el hardware que modificarían estos costos.

<b>Adquisición del equipo</b>	
Componente	Precio (USD)
Placa de Arduino	\$21.86
Bomba de presión (costo + envío)	\$8.57
Válvula proporcional	\$90.00
Sensor	\$47.95
Fuente de alimentación	\$4.51
Piezas (material)	\$5.64
Piezas (costo de mecanización)	\$63.47
<b>Total COSTO FIJO</b>	<b>\$242.00</b>
<b>Consumibles</b>	
Membrana (1 unidad)	\$0.15
Tratamiento (NaOH)	\$0.30
<b>Total COSTO VARIABLE (por unidad)</b>	<b>\$0.45</b>

Tabla 7: lista de componentes del dispositivo desarrollado con sus respectivos precios.

El dispositivo desarrollado tiene un costo de \$242.00 USD con un costo variable de \$0.45 USD por membrana.

# **XI. Discusión**

## **Publicaciones**

El proyecto se presentó en formato poster en el congreso de la Sociedad Argentina de Bioingeniería (SABI) en el año 2017, en el congreso anual de la facultad de farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA) y en el congreso de Microelectrónica Aplicada de la UNSAM. Además, se publicó en la revista del Instituto de Ingeniería Electrónica y Eléctrica de Latinoamérica (IEEE LatinAmerica).

## **Sustrato flexible**

Se desarrolló una membrana flexible que funciona como sustrato celular biocompatible con y sin tratamientos, para ser utilizado en las condiciones de esterilidad y asepsia que requieren los cultivos de células. Es deformable de manera lineal hasta un 20% y cuenta con un módulo elástico en el rango del tejido biológico blando. El método de producción permite adecuar la forma y grosor de la membrana, pero aún no es escalable y puede haber variaciones entre membrana y membrana en el grosor, lo que afectaría la relación entre presión y deformación.

## **Piezas del dispositivo**

Las piezas diseñadas y mecanizadas resultaron con la capacidad de sostener el sustrato flexible y generar una cámara hermética que al aplicar vacío deforme al sustrato de manera equiaxial. Además, permiten montar y desmontar la membrana de una manera rápida y sencilla. Su material fue elegido de forma que puedan ser esterilizadas en autoclave y usadas en un cuarto de cultivo celular.

## **Generador de señales de presión**

El hardware elegido para el generador de presión permitió replicar diferentes señales de presión seleccionadas por el usuario, en la cámara hermética debajo de la membrana. Utiliza una fuente de alimentación conectada a 220V CA y no es esterilizable en autoclave ni utilizable en cuarto de cultivo. Para esto, la tubuladura permite separar el generador fuera del cuarto de cultivo.

## **Firmware (lazo de control) e interfaz de usuario**

Se programó el microcontrolador del dispositivo de forma que el usuario pueda ingresar una señal a través de un display y un teclado y esta señal sea replicada por el generador gracias al control a lazo cerrado implementado. Se trabajó con señales de presión en un rango de amplitud entre 0 y 14 kPa con respecto a presión atmosférica. Se calcularon los errores medios de las diferentes señales que replica el generador de señales de

presión para evaluar su respuesta. El mismo tiene una respuesta máxima de 1Hz (1 ciclo por segundo). Para cuantificar la deformación es necesario convertir la presión a deformación, a partir de la pendiente de la relación lineal obtenida. En el caso de querer aumentar o reducir la presión o deformación máxima se puede modificar el grosor de la membrana y el área de la cámara hermética para alterar esta relación.

## Medición de la deformación de la membrana

Se propuso un método de medición de la deformación a partir del procesamiento de imágenes de la membrana. Se obtuvo una relación lineal entre presión y deformación, sin embargo, se realizaron mediciones en pocas membranas. Aún resta estudiar la variabilidad de esta pendiente en un mayor número de membranas.

## Alcances del proyecto

Se desarrollaron y evaluaron las diferentes partes del dispositivo que en su conjunto resultan en un sistema con la potencialidad de aplicar fuerzas controladas en cultivos celulares a partir de la deformación de un sustrato biocompatible. El dispositivo permite aplicar fuerzas de deformación equiaxiales con diferentes señales seleccionadas por el usuario en un sustrato deformable hasta un 20%. Las piezas junto con la membrana pueden ser utilizadas en el cuarto de cultivo celular y cuenta con un acople rápido que permite la conexión con el generador de presión.

El dispositivo desarrollado tiene un menor costo en comparación con el precio de venta de los dispositivos disponibles en el mercado (\$242.00 USD vs \$1,345.00 USD a \$30,257.00 USD) y cuenta con las ventajas de su fácil uso y puesta en marcha, menor tamaño, no depender de una PC para su uso y no depender de una fuente externa de aire comprimido.

## Limitaciones del proyecto

Se obtuvo un método de medición que relaciona la presión con la deformación de manera lineal y permite asegurar estar trabajando en el rango de deformación deseada (en la Fig. 57 se observa que para una presión de 10 kPa se obtiene una deformación del 18%, nuestro rango de trabajo es de 0 a 14 kPa, lo que significaría una deformación de aproximadamente 25% si esta relación se mantiene lineal). Aun así faltaría un mayor número de mediciones en membranas, para ello es conveniente trabajar en el escalado del método de producción de la membrana para que muestren un grosor y rigidez repetibles.

Otra limitación con la que cuenta el trabajo es que se cultivaron células en la membrana, pero no con el resto de las piezas del dispositivo en funcionamiento. Es necesario

evaluar el uso del dispositivo con células y verificar su viabilidad en el sistema funcionando con todos sus componentes.

## Tareas a futuro

### Comprobar la adhesión celular

Sería importante realizar un ensayo que nos permita identificar si el colágeno se encuentra adherido y no depositado al sustrato, si esto ocurriera la fuerza de tensión aplicada sobre la membrana no se trasladaría al cultivo celular.

Esto se puede comprobar de diferentes maneras, en principio se podría obtener una imagen con un microscopio SEM (Microscopio electrónico de barrido) para observar las muestras y evaluar la interacción entre la membrana, el colágeno y las células. Así asegurar la correcta adhesión entre estos tres para que las fuerzas aplicadas a la membrana se transmitan a las células.

### Evaluación de la citotoxicidad

En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de manera indirecta con ensayos de proliferación. Dado que los resultados son prometedores, a futuro se deberían realizar estudios que permitan evaluar la toxicidad, biocompatibilidad, adhesión y proliferación de la membrana utilizando el tratamiento con los resultados óptimos.

### Medición de fatiga del sustrato

Como mencionamos anteriormente al trabajar con presión y utilizar un factor de conversión al porcentaje de deformación no estamos midiendo la deformación de manera directa. Asumir que esta relación se mantiene podría conllevar un error cuando se realice un ensayo en el cual la membrana se someta a diferentes fuerzas cíclicas y esto pueda alterar su módulo de Young. Se puede estudiar el comportamiento del módulo realizando ensayos con las membranas utilizando un DMA. Aplicando fuerzas de deformación cíclicas se podría medir el comportamiento del módulo para diferentes cantidades de ciclos, simulando los ensayos que se realizarían con el dispositivo y así comprobar si el módulo se mantiene o este se modifica.

### Mejora del método de selección de parámetros del control

El error de las señales de presión obtenidas con el generador varía según la forma, frecuencia y amplitud de la señal. En este proyecto se trabajó con un control que utiliza los mismos parámetros ( $k_p$ ,  $k_i$ ,  $k_d$ ) para realizar todas las señales que se seleccionen.

A futuro se podría implementar un control que calcule estos parámetros para adaptarlos a las diferentes señales que seleccione el usuario. Además, realizar un algoritmo que permita determinar los parámetros del control mejoraría también la selección de los mismos en caso de que cambie la planta, en caso de que se modifique algunos de los

factores físicos que pueden influir en el control (volumen de aire del circuito de presión, etc.).

#### Evaluar otros materiales para las piezas del dispositivo

Utilizar un material metálico daría una mayor precisión en la forma de las piezas que trabajando con materiales plásticos.

La parte más importante y que debería cumplir con un mecanizado más preciso es la base sobre la cual se superpone la membrana y donde se cultivan las células, cualquier deformación en esta base modificaría la forma en la que se estira la membrana trasladándolo al cultivo celular.

#### Implementar una interfaz de usuario que permita seleccionar diferentes formas de señal, amplitud y frecuencias

Aunque este dispositivo cumple con una interfaz que le permite al usuario seleccionar diferentes señales, estas son limitadas. Se implementaron tres formas de señal y se evaluaron diferentes amplitudes y frecuencias para desarrollar el control empleado en el generador de presión.

Esta interfaz puede estar dada por algún dispositivo móvil o se puede seguir trabajando en un hardware que le permita al usuario ingresar la señal.

#### Obtención del parámetro que relaciona la presión con la deformación

Como se mencionó anteriormente todavía falta trabajar en el método para traducir presión a deformación.

Sería ideal mejorar el método de análisis de imágenes para que nos permita trabajar directamente con la deformación y que el generador de presión realimente con la medición de deformación, que es la cual nos interesa y con la cual queremos trabajar.

La obtención de este parámetro permitiría evaluar la performance del sistema y obtener un cálculo de error con respecto a la deformación aplicada en la membrana, posibilitando la comparación del funcionamiento entre diferentes dispositivos.

#### Cálculo de error

Para evaluar el error en el estiramiento que van a sufrir las células es necesario medir la presión dentro de la cámara la cual cambiara con respecto a la señal que se midió (cerca del generador). Esta señal se modificará por el volumen de aire entre el generador y la cámara donde se aplica la presión y dentro de la cámara misma. A futuro el error debería calcularse en deformación y no en presión.

## **XII. Conclusión**

Se desarrolló un dispositivo con la potencialidad de ser utilizado para aplicar fuerzas de tracción controladas en cultivos celulares. El dispositivo cuenta con una membrana biocompatible deformable de manera equiaxial a partir de la señal seleccionada por el usuario. No depende de una PC para su uso y las piezas junto con la membrana pueden ser utilizadas en el cuarto de cultivo celular. Es, en comparación con los dispositivos comerciales, de fácil uso, menor tamaño y complejidad. Se obtuvo además una disminución en el costo del dispositivo en comparación con los costos de adquisición de los dispositivos comerciales.

# Glosario

*Biocompatible*: capacidad de un material para actuar con una respuesta adecuada del medio biológico en el cual sea utilizado.

*Cambios conformacionales*: cambios en la morfología de una proteína que pueden afectar a su comportamiento.

*Cardiomiocitos*: tipo celular cardíaco que se encuentra en el corazón y permite la contracción del mismo.

*Células madre mesenquimales*: son células madre que cuentan con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células.

*Citotoxicidad*: cualidad de algún material para ser tóxico frente al medio biológico en el que se encuentre.

*Conversor ADC*: conversor analógico digital, conversor que traduce una señal analógica a una señal digital.

*Diferenciación celular*: proceso por el cual las células cambian de un tipo celular a otro, generalmente uno más especializado.

*Firmware*: programa informático que establece la lógica que controla los circuitos electrónicos de un dispositivo.

*Frecuencia de corte*: frecuencia hasta la cual funciona un filtro de señal.

*Hardware*: conjunto de elementos físicos o materiales que constituyen una computadora o un sistema informático.

*I2c*: protocolo de comunicación serial que define la trama de datos y las conexiones físicas para transferir bits entre 2 dispositivos digitales.

*Interfaz de usuario*: medio con el cual el usuario puede comunicarse con una máquina, equipo, computadora o dispositivo.

*Microcontrolador*: circuito integrado programable, capaz de ejecutar las órdenes grabadas en su memoria.

*Módulo elástico*: constante que relaciona la tensión medida con la deformación aplicada en un material.

*Proliferación*: proceso por el cual una célula crece y se divide para producir dos células hijas.

*Proteínas transmembrana:* aquellas proteínas integrales de membrana que atraviesan la bicapa lipídica de la membrana celular, una vez o varias. Conectan el medio interno y externo de una célula.

*Puerto UART:* Transmisor-Receptor Asíncrono Universal, el mismo permite la conexión con otros dispositivos.

*Sistema embebido:* sistema de computación integrado que permite realizar una o varias tareas en tiempo real.

*Solenoides:* dispositivo físico capaz de crear un campo magnético uniforme e intenso en su interior, cuenta con la capacidad de mover o accionar piezas magnéticas.

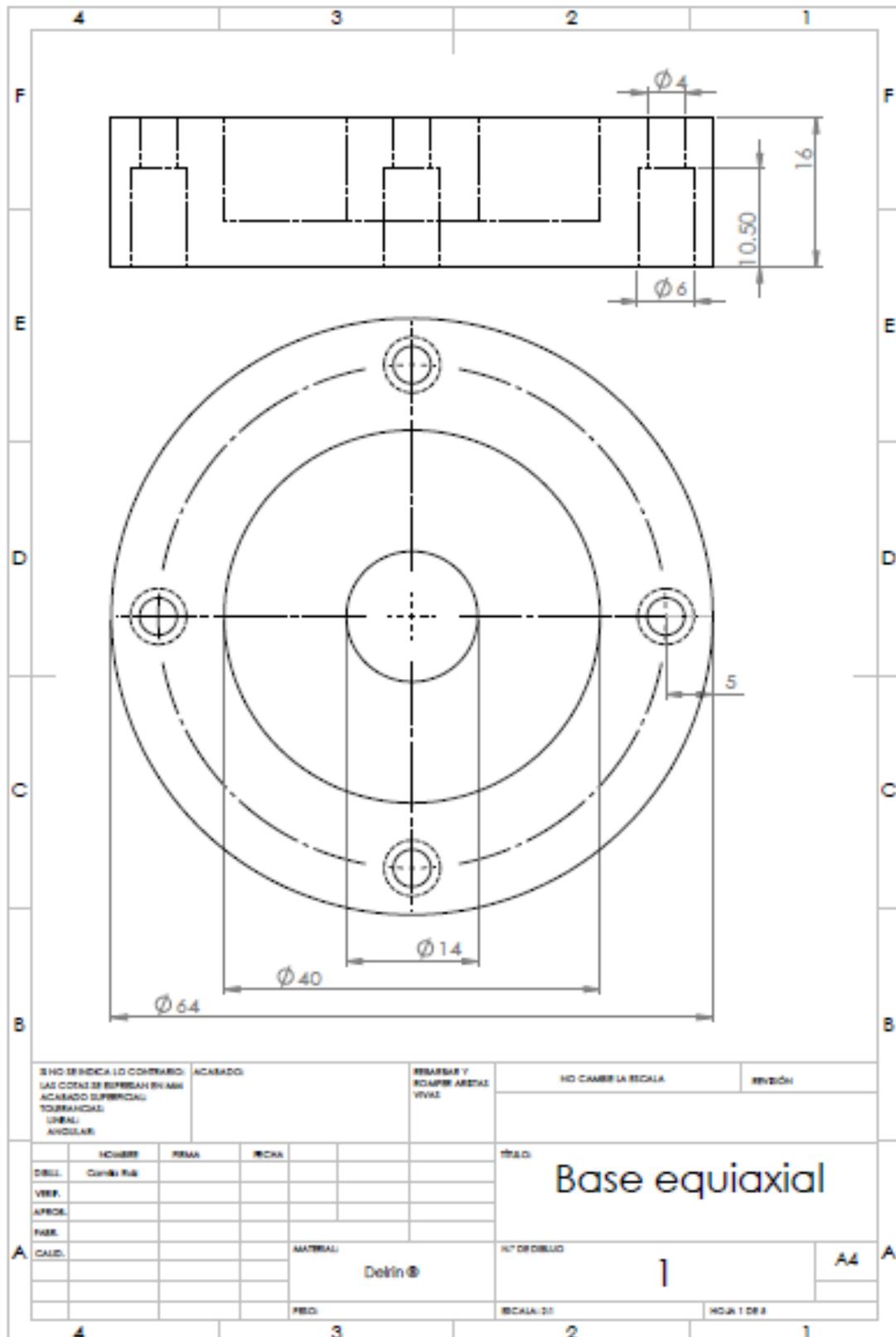
*Sustrato:* componente no celular que proporciona un andamiaje físico esencial para los constituyentes celulares.

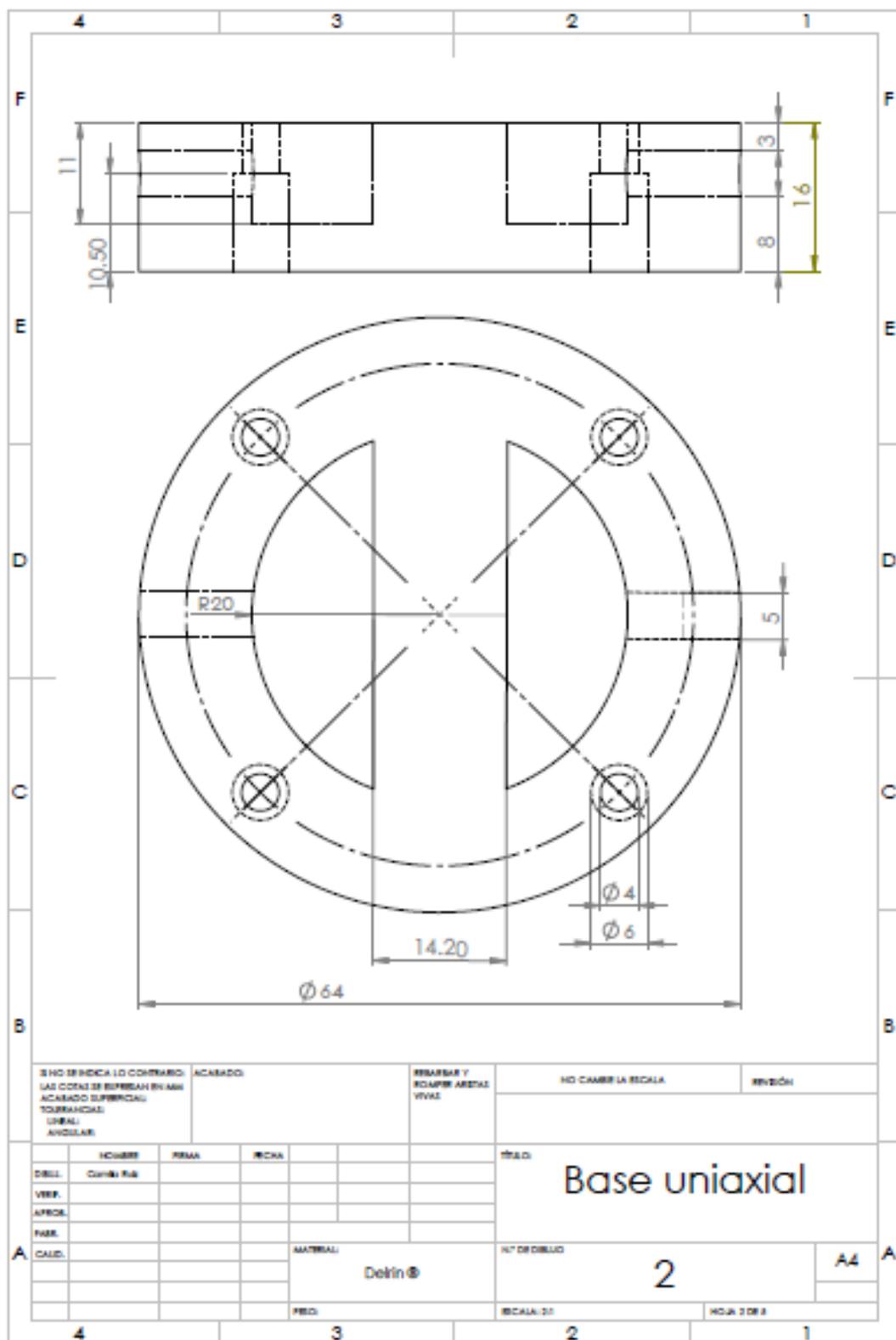
## Referencias

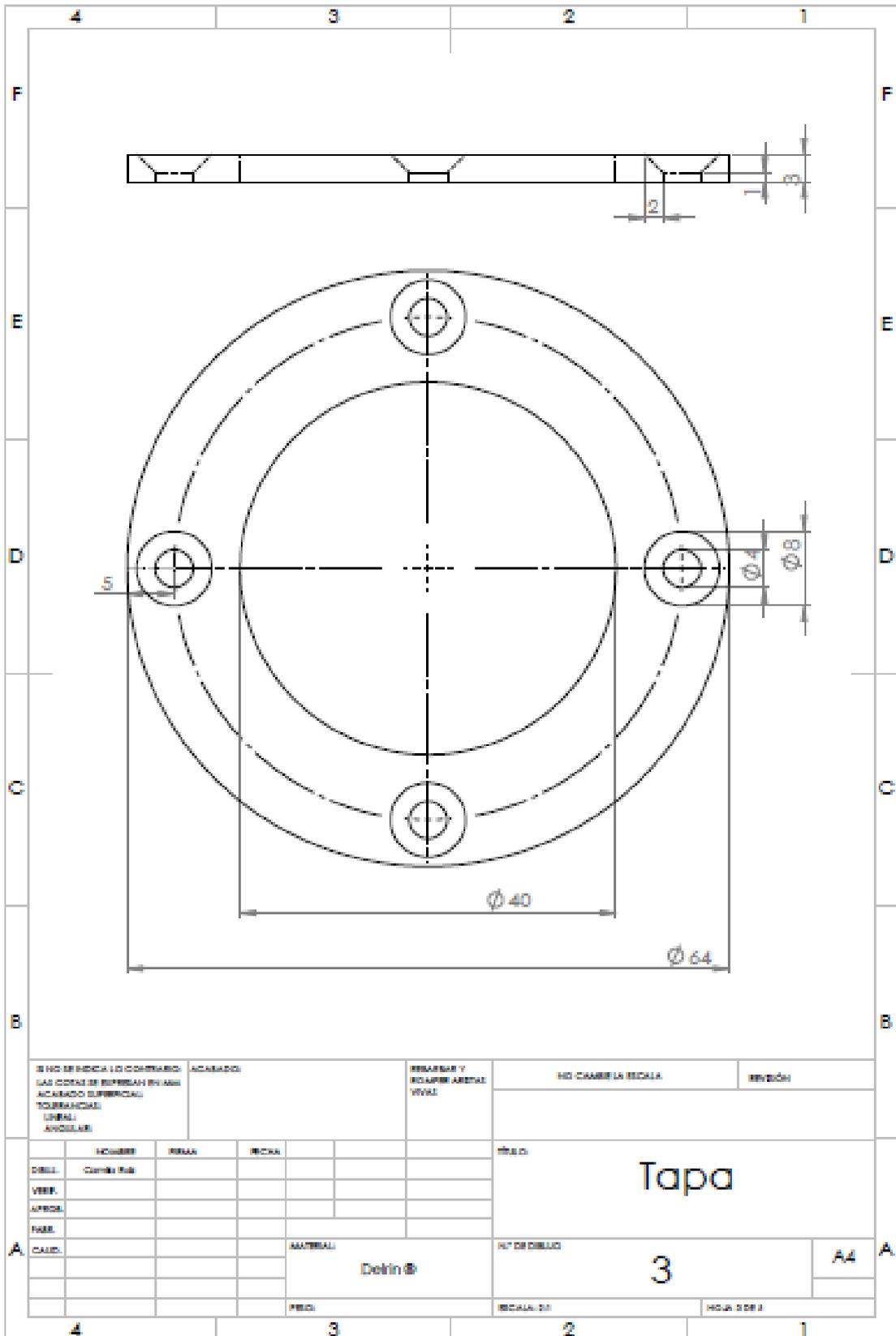
- [1] A. J. Engler, Shamik Sen, H. Lee Sweeney and D. E. Discher, «Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification,» *Cell*, vol. 4, nº 126, pp. 677-689, 2006.
- [2] A. Bershadsky, M. Kozlov, and B. Geiger, «Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize,» *Current Opinion in Cell Biology*, nº 18, pp. 472–481, 2006.
- [3] B. Geiger, J. Spatz, and A. Bershadsky, «Environmental sensing through focal adhesions,» *Nature reviews Molecular cell Biology*, nº 10, pp. 21-33, 2009.
- [4] A. Khalili & M. Ahmad, «A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 8, nº 16, pp. 18149–18184, 2015.
- [5] N. Huebsch, P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano and D. J. Mooney, «Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate,» *Nature Materials*, vol. 9, pp. 518-526, 2010.
- [6] D. E. Discher, «Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate,» *Science*, vol. 310, nº 5751, pp. 1139–1143, 2005.
- [7] L. Sigaut, C. von Bilderling, M. Bianchi, J. E. Burdisso, L. Gastaldi and L. I. Pietrasant, «Live cell imaging reveals focal adhesions mechanoresponses in mammary epithelial cells under sustained equibiaxial stress,» *Scientific reports*, nº 9788, pp. 1-15, 2018.
- [8] C. Moraes, Y. Sun and C. A. Simmons, «(Micro)managing the mechanical microenvironment,» *Integrative Biology*, vol. 3, nº 10, pp. 959–971, 2011.
- [9] S. Oh, H. Chung, S. Chang, S. H. Lee, S. H. Seok and H. Lee, «Effect of Mechanical Stretch on the DNCB-induced Proinflammatory Cytokine Secretion in Human Keratinocytes,» *Scientific reports*, vol. 9, nº 1, pp. 1-9, 2019.
- [10] T. D. Brown, «Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review,» *Journal of Biomechanics*, vol. 1, nº 33, pp. 3-14, 2000.
- [11] C. Franco & H. Gerhardt, «Blood vessels on a chip,» *Nature*, vol. 488, pp. 465–466, 2012.
- [12] <https://www.flexcellint.com/about>.
- [13] <https://www.ionoptix.com/company/>.
- [14] <https://www.menicon-lifescience.com/english/>.
- [15] <https://strexcell.com/>.
- [16] [https://www.smooth-on.com/tb/files/Solaris\\_TB.pdf](https://www.smooth-on.com/tb/files/Solaris_TB.pdf).
- [17] T. R. Cox and J. T. Eler, «Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer,» *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, nº 2, pp. 165-178, 2011.

- [18] J. Y. Park, D. Ahn, Y. Y. Choi, C. M. Hwang, S. Takayama & S. H. Lee, «Surface chemistry modification of PDMS elastomers with boiling water improves cellular adhesion,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, nº 173, pp. 765-771, 2012.
- [19] I. Hoek, F. Thoa and W. W. Arnoldab , «Sodium hydroxide treatment of PDMS based microfluidic devices,» *Lab on a chip*, vol. 10, nº 17, pp. 2283-2285, 2010.
- [20] G. Sui, J. Wang, C. Lee, W. Lu, S. P. Lee, J. V. Leyton, A. M. Wu and H. Tseng, «Solution-Phase Surface Modification in Intact Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Channels,» *Analytical Chemistry*, vol. 78, nº 15, pp. 5543-5551, 2006.
- [21] A. Siddique, T. Meckel, R. W. Stark & S. Narayan, «Improved cell adhesion under shear stress in PDMS microfluidic devices,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, nº 150, pp. 456–464, 2017.
- [22] <https://www.nxp.com/docs/en/data-sheet/MPX5100.pdf>.
- [23] [https://www.parker.com/Literature/Precision%20Fluidics/Miniature%20Proportional%20Valves/VSO%20Data%20Sheet\\_1\\_19\\_11.pdf](https://www.parker.com/Literature/Precision%20Fluidics/Miniature%20Proportional%20Valves/VSO%20Data%20Sheet_1_19_11.pdf).
- [24] K. Ogata, Ingeniería de control moderna, Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A., 2010.

# Anexo I







SI NO SE INDICA LO CONTRARIO: LAS COTAS SE ENTENDEN EN MM ACABADO SUPERFICIAL: TORNEADO LINEAL ANGULAR		ACABADO:	ENLACE Y BOLAPES METAL VIVA		NO CAMBIA LA ESCALA	REVISION
DISEÑ. VERIF. APROB. FECH. CALIF.	COBERTO Carlos Feb	FECHA	ESCALA	FECHA	Tapa	
MATERIAL:		Nº DE DIBUJO				
MATERIAL: Delrin 6		Nº DE DIBUJO 3		A4		
FECH:		ESCALA: 1:1		HOJA 3 DE 1		

4	3	2	1		
F			F		
E			E		
D			D		
C			C		
B			B		
SI NO SE INDICA LO CONTRARIO: LAS COTAS SE SUPLENEN EN MM ACABADO SUPERFICIAL: TORNEADO LIGERAMENTE ANGULAR		ACABADO	REBARBAR Y REAFIRMAR VIVAS	NO CAMBIA LA ESCALA	REVISION
DISE. _____ VERIF. _____ APROB. _____ FASE _____ CALIF. _____	NOMBRE _____ FORMA _____ ESCALA _____	MATERIAL: Delrin®	<b>Explotado equiaxial</b>		
N° DE DIBUJO <span style="font-size: 2em; font-weight: bold;">4</span>		ESCALA: 1:1	HOJA 4 DE 4		
4	3	2	1		
A			A		

4	3	2	1
F			F
E			E
D			D
C			C
B			B
SI NO SE INDICA LO CONTRARIO: LAS CORTAS SE EFECTUAN EN 45º ACABADO SUPERFICIAL: TORNEADAS: LINEAL ANGULARES		ACABADO:	REBARBAR Y ROMPER ARISTAS VIVAS
		NO CAMBIE LA ESCALA	REVISION
DISEÑ.	NOMBRE	PRIMA	TERCERA
VERIF.	CUNHA RUIZ		
APROB.			
FABR.			
CALIF.			
		MATERIAL:	TÍTULO:
		Delrin®	Explotado biaxial
		Nº DE DIBUJO	A4
		5	
		ESCALA: 1:1	HOJA 1 DE 1
4	3	2	1
A			A

## Anexo II

### Resultados para señal senoidal

Frecuencia seleccionada [Hz]	Amplitud 2 kPa [kPa]	Amplitud 4 kPa [kPa]	Amplitud 10 kPa [kPa]	Amplitud 14 kPa [kPa]
1	0.120	0.392	1.130	1.564
0.5	0.104	0.238	0.692	0.898
0.2	0.087	0.123	0.277	0.381
0.1	0.079	0.087	0.227	0.233

Tabla 8: Error absoluto medio de la señal senoideal para cada frecuencia y amplitud.

Frecuencia seleccionada [Hz]	Amplitud 2 kPa [%]	Amplitud 4 kPa [%]	Amplitud 10 kPa [%]	Amplitud 14 kPa [%]
1	25	25	24	24
0.5	15	15	15	15
0.2	7	7	6	7
0.1	5	4	3	3

Tabla 9: Error relativo medio de la señal senoideal para cada frecuencia y amplitud.

### Resultados para señal de diente de sierra

Frecuencia seleccionada [Hz]	Amplitud 2 kPa [kPa]	Amplitud 4 kPa [kPa]	Amplitud 10 kPa [kPa]	Amplitud 14 kPa [kPa]
1	0.120	0.392	1.130	1.564
0.5	0.104	0.238	0.692	0.898
0.2	0.087	0.123	0.277	0.381
0.1	0.079	0.087	0.227	0.233

Tabla 10: Error absoluto medio de la señal diente de sierra para cada frecuencia y amplitud.

Frecuencia seleccionada [Hz]	Amplitud 2 kPa [%]	Amplitud 4 kPa [%]	Amplitud 10 kPa [%]	Amplitud 14 kPa [%]
1	6	10	11	11
0.5	5	6	7	6
0.2	4	3	3	3
0.1	4	2	2	2

Tabla 11: Error relativo medio de la señal diente de sierra para cada frecuencia y amplitud.

### Resultados para señal cuadrada

Frecuencia seleccionada [Hz]	Amplitud 2 kPa [kPa]	Amplitud 4 kPa [kPa]	Amplitud 10 kPa [kPa]	Amplitud 14 kPa [kPa]
1	0.271	0.489	0.846	1.161
0.5	0.197	0.312	0.469	0.661
0.2	0.132	0.150	0.230	0.399
0.1	0.105	0.106	0.140	0.180

Tabla 12: Error absoluto medio de la señal cuadrada para cada frecuencia y amplitud.

Frecuencia seleccionada [Hz]	Amplitud 2 kPa [%]	Amplitud 4 kPa [%]	Amplitud 10 kPa [%]	Amplitud 14 kPa [%]
1	14	12	8	8
0.5	10	8	5	5
0.2	7	4	2	3
0.1	5	3	1	1

Tabla 13: Error relativo medio de la señal cuadrada para cada frecuencia y amplitud.