



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA MECÁNICA**

# **DISEÑO Y FABRICACIÓN DE UN DISPOSITIVO PORTÁTIL PARA LA DETECCIÓN DE EPIDEMIAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO CIVIL MECÁNICO**

**PROF. GUÍA: JORGE MORALES FERREIRO**

**COTUTORES: CAMILO RODRIGUEZ**

**JESSICA ZUÑIGA**

**PEDRO MATIAS GUERRERO PEREIRA**

**CURICÓ - CHILE**

**2020**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su encargado Biblioteca Campus Curicó certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Two circular official stamps and handwritten signatures in blue ink. The left stamp is from the 'DIRECCIÓN SISTEMA DE BIBLIOTECAS' of the 'UNIVERSIDAD DE TALCA'. The right stamp is from the 'SISTEMA DE BIBLIOTECAS CAMPUS CURICO' of the 'UNIVERSIDAD DE TALCA'.

Curicó, 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y a mis padres, Sra. Aida Pereira y Sr. Luis Guerrero, por su cariño incondicional y constante apoyo durante este proceso. Por su incansable esfuerzo que me ha llevado hasta aquí, por ser mi mayor ejemplo y por estar conmigo durante todas las etapas de mi vida.

A la Sra. Isabel Gana de Guilisasti, el Sr. Pablo Guilisasti, la Sra. Sara Guilisasti y toda la familia Guilisasti, por su preocupación y dedicación, por creer en mí y acompañarme durante toda mi etapa universitaria.

A la fundación Eduardo Guilisasti Tagle y a todas las personas que la conforman, por la hermosa labor que con tanto cariño y entrega realizan.

A mi abuela Sra. Inés Lizana y a mis tías Sra. Fabiola Pereira, Sra. Olga Pereira, Sra. Marta Madariaga y a mi familia por su apoyo y cariño.

A Cynthia Vargas, por animarme, quererme y cuidarme. Por su apoyo incondicional sin el cual este proyecto no se habría completado.

A Alejandro Rebolledo, Daniel Núñez y todo el equipo de Factoría de la Universidad del Desarrollo y del Centro de Investigación en Tecnologías para la Sociedad C+, por su gran aporte para el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, a mis tutores Sra. Jessica Zúñiga y Sr. Camilo Rodríguez, y al profesor Sr. Carlos Zambra por su constante preocupación, consejo y por acercarme al mundo de la investigación. Y por motivarme a utilizar mis conocimientos para aportar a la sociedad, a querer aprender más y a buscar siempre la excelencia.

## DEDICATORIA

*A mis padres, Aida y Luis, con todo mi cariño y admiración.*

*A mi querido tío Manuel, eres un ejemplo de resiliencia y amor a la vida. Tu lucha también es mía.*

*“Shoot for the moon. Even if you miss, you’ll land among the stars.”*

*Norman Vincent Peale*

## RESUMEN

De acuerdo a la OMS, las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, y provocan más de 700.000 muertes cada año. Entre estas enfermedades se encuentra una ocasionada por el virus del Hanta, esta es la enfermedad de fiebre hemorrágica con síndrome renal que tiene una incidencia anual de 150.000 a 200.000 casos en regiones como Asia y Europa. Este virus también está presente en América, salvo que se manifiesta con otras enfermedades, como lo es el síndrome cardio-pulmonar por hantavirus. Este síndrome es una de las enfermedades que aqueja a la población de nuestro país y es producido específicamente por la cepa Andes del virus del Hanta. El vector de esta cepa es el ratón de cola larga o *Oligoryzomys longicaudatus* perteneciente a la familia Cricetidae que es una familia de roedores miomorfos que forman parte de la gran superfamilia Muroidea. Existe una gran cantidad de personas infectadas año a año con hantavirus en nuestro país, y ya se cuentan con 55 casos confirmados en lo que va del año 2019, según datos del Ministerio de Salud de la República de Chile.

Cómo método preventivo se ha desarrollado un dispositivo inteligente, que utiliza el trampeo y captura viva de roedores de pequeña envergadura, para colectar muestras biológicas del animal (orina) y detectar de forma autónoma la presencia de proteínas en ellas. Esta detección puede ser extrapolada para encontrar proteínas específicas de determinados virus, cómo el hantavirus, con el fin de encontrar individuos seropositivos en poblaciones de roedores de la familia Cricetidae. La detección de virus en las condiciones que presenta el hábitat de estos roedores, requieren de técnicas robustas, que sean capaces de resistir las adversidades del ecosistema y no requieran mano de obra especializada ni intervención humana para su operación. Se fabricó e implementó un dispositivo microfluídico basado en papel, para la detección de proteínas a partir de una muestra de orina. Posteriormente, se realiza el envío de los resultados de manera remota.

Como prueba del funcionamiento del equipo, se utilizaron muestras de orina humana.

**PALABRAS CLAVE:** hantavirus, pulmonary syndrome, hantaviriosis, Microfluidics, lateral assay.

## ABSTRACT

According to WHO, vector-borne diseases account for more than 17% of all infectious diseases, and cause more than 700,000 deaths each year. Among these diseases is one caused by the Hanta virus, this is the disease of hemorrhagic fever with renal syndrome that has an annual incidence of 150,000 to 200,000 cases in regions such as Asia and Europe. This virus is also present in America, unless it manifests itself with other diseases, such as hantavirus cardio-pulmonary syndrome. This syndrome is one of that afflicts the population of our country and is produced specifically by the Andes type of Hanta virus. The vector of this strain is the long-tailed mouse or *Oligoryzomys longicaudatus* belonging to the Cricetidae family, that is a family of myomorphic rodents that are part of the great Muroidea superfamily. There is a large number of people infected year by year with hantavirus in our country, and there are already 55 confirmed cases so far in 2019, according to data from the Ministry of Health of the Republic of Chile.

As a preventive method, an intelligent device has been developed, which uses the trapping and live capture of small rodents, to collect biological samples of the animal (urine) and autonomously detect the presence of proteins in them. This detection can be extrapolated to find specific proteins of certain viruses, such as hantavirus, in order to find seropositive individuals in rodent populations of the Cricetidae family. The detection of viruses in the conditions presented by the habitat of these rodents requires robust techniques that are capable of withstanding the adversities of the ecosystem and do not require specialized labor or human intervention for their operation. A paper-based microfluidic device was manufactured and implemented for the detection of proteins from a urine sample. Subsequently, the results are sent remotely to a database.

As evidence of the operation of the equipment, human urine samples were used.

**KEYWORDS:** hantavirus, pulmonary syndrome, hantaviriosis, Microfluidics, lateral assay

# ÍNDICE

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....  | 1  |
| 1.1   | ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN .....  | 2  |
| 1.2   | DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....   | 2  |
| 1.3   | SOLUCIÓN PROPUESTA.....  | 3  |
| 1.4   | OBJETIVOS.....   | 3  |
| 1.4.1 | Objetivo General .....   | 3  |
| 1.4.2 | Objetivo Específico .....  | 3  |
| 1.5   | ALCANCES .....   | 4  |
| 1.6   | METODOLOGÍAS Y HERRAMIENTAS UTILIZADAS .....                           | 4  |
| 1.7   | RESULTADOS ESPERADOS .....   | 4  |
| 1.8   | ORGANIZACIÓN DEL DOCUMENTO.....  | 5  |
| 2     | CAPÍTULO II: HANTAVIRUS.....   | 7  |
| 2.1   | GENERALIDADES.....   | 8  |
| 2.2   | DEFINICIÓN .....   | 8  |
| 2.3   | CEPAS Y RESERVORIOS .....  | 9  |
| 2.4   | ECOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DEL HANTAVIRUS EN LOS<br>RESERVORIOS .....    | 11 |
| 2.5   | DIAGNÓSTICOS ESPECÍFICOS EN INFECCIONES HUMANAS POR<br>HANTAVIRUS..... | 12 |
| 2.5.1 | Pruebas serológicas .....  | 12 |
| 2.5.2 | Detección viral .....  | 13 |
| 2.5.3 | Ácidos nucleicos .....   | 13 |
| 2.5.4 | Inmunohistoquímicas .....  | 13 |
| 2.5.5 | Aislamiento viral.....   | 14 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.5.6 | Técnicas de diagnóstico rápido .....   | 14 |
| 2.6   | DETECCIÓN DE INFECCIONES POR HANTAVIRUS EN ROEDORES E INSECTIVOROS.....                  | 14 |
| 3     | CAPÍTULO III: COLECCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA EN PEQUEÑOS MAMÍFEROS.....                  | 15 |
| 3.1   | GENERALIDADES.....   | 16 |
| 3.2   | RECOLECCIÓN DE ORINA SIN INTERVENCIÓN.....   | 17 |
| 3.2.1 | Recolección de orina de ratón utilizando un film plástico transparente .....             | 17 |
| 3.2.2 | Recolección puntual de una muestra de orina utilizando un vaso de precipitados           | 18 |
| 3.2.3 | Método de recolección de orina por tubo capilar.....                                     | 19 |
| 3.3   | CONTENCIÓN MODIFICADA UTILIZADA PARA LA COLECCIÓN DE ORINA DE 24 HORAS .....             | 19 |
| 3.3.1 | Método del embudo de polietileno.....  | 19 |
| 3.3.2 | Dispositivo para la recolección de orina de 24 horas en ratones .....                    | 20 |
| 3.4   | MÉTODOS CON JAULAS METABÓLICAS COMERCIALES PARA LA RECOLECCIÓN DE ORINA DE 24 HORAS..... | 21 |
| 4     | CAPÍTULO IV: DISPOSITIVO MICROFLUIDICO.....  | 23 |
| 4.1   | GENERALIDADES.....   | 24 |
| 4.2   | MODELAMIENTO TEÓRICO-NUMÉRICO Y OBTENCIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES .....                  | 25 |
| 4.2.1 | Detección de biomoléculas y biomarcadores .....  | 25 |
| 4.2.2 | Ensayos de flujo lateral (LFA).....  | 26 |
| 4.2.3 | μPADs.....   | 27 |
| 4.2.4 | Selección del tipo de dispositivo de trabajo .....                                       | 28 |
| 4.2.5 | Modelo teórico .....   | 30 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.2.6 | Modelamiento matemático.....  | 36  |
| 4.2.7 | Simulación numérica.....  | 39  |
| 4.3   | FABRICACIÓN Y MÉTODOS EXPERIMENTALES .....  | 48  |
| 4.3.1 | Fabricación de dispositivo rectangular en papel de filtro, para la detección de albúmina en muestras de orina humana .....  | 48  |
| 4.3.2 | Fabricación de $\mu$ PAD a través de inmersión en parafina, para la detección de albúmina en muestras de orina humana ..... | 50  |
| 5     | CAPÍTULO V: DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL EQUIPO .....   | 62  |
| 5.1   | GENERALIDADES.....  | 63  |
| 5.2   | PROPUESTA DE DISEÑO 1° PROTOTIPO .....  | 63  |
| 5.2.1 | Diseño 3D de componentes.....   | 65  |
| 5.2.2 | Componentes electrónicos.....   | 72  |
| 5.2.3 | Fabricación .....   | 76  |
| 5.3   | PROPUESTA DE DISEÑO 2° PROTOTIPO .....  | 77  |
| 5.3.1 | Diseño 3D de componentes.....   | 78  |
| 5.3.2 | Componentes electrónicos.....   | 81  |
| 5.3.3 | Fabricación .....   | 89  |
| 5.3.4 | Prueba de concepto del prototipo 2 y envío de datos remoto.....   | 90  |
| 6     | CAPÍTULO VI: COSTOS .....   | 93  |
| 7     | CAPÍTULO VII: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 97  |
| 7.1   | SIMULACIÓN NUMÉRICA .....   | 98  |
| 7.2   | EXPERIMENTACIÓN EN DETECCIÓN DE BIOMOLÉCULAS .....  | 101 |
| 7.3   | EQUIPO .....  | 104 |
| 8     | CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA .....   | 106 |
| 9     | CAPÍTULO IX: ANEXOS.....  | 116 |
| 9.1   | Anexo A1. Características de algunos tipos de hantavirus .....  | 117 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 9.2  | Anexo A2. Protocolo para detección de hantavirus en roedores e insectívoros.               | 118 |
| 9.3  | Anexo A3. Resumen de los métodos publicados para la recolección de orina de roedores.      | 119 |
| 9.4  | Anexo B1. Materiales para fabricación de la tira rectangular en papel de filtro.           | 120 |
| 9.5  | Anexo B2. Materiales para fabricación de $\mu$ PAD a través de inmersión en parafina.      | 122 |
| 9.6  | Anexo B3. Fabricación de moldes metálicos utilizando el centro de mecanizado CNC ROMI 760. | 125 |
| 9.7  | Anexo B4 Protocolos de fabricación de Dispositivos.  | 128 |
| 9.8  | Anexo C1. Diseño 3D de componentes prototipo 1.  | 130 |
| 9.9  | Anexo C2. Código de programación en Arduino prototipo 1.                                   | 139 |
| 9.10 | Anexo C3. Resultado fabricación prototipo 1.   | 144 |
| 9.11 | Anexo C4. Archivo board y esquemático del prototipo 1.                                     | 146 |
| 9.12 | Anexo C5. Diseño 3D de componentes prototipo 2.  | 148 |
| 9.13 | Anexo C6. Resultado fabricación prototipo 2.   | 152 |
| 9.14 | Anexo C7. Archivo board y esquemático prototipo 2.   | 155 |
| 9.15 | Anexo C8. Datos técnicos de los componentes electrónicos seleccionados .                   | 157 |

## LISTA DE TABLAS

|         |   |    |
|---------|---|----|
| Tabla 1 | Valores de referencia de concentración de referencia de albúmina en muestras de orina humana.         | 29 |
| Tabla 2 | Datos de las propiedades ingresadas a la simulación.  | 34 |
| Tabla 3 | Comparativa de la situación experimental y la simulación computacional para cinco tiempos diferentes. | 45 |
| Tabla 4 | Rango de los parámetros RGB.  | 75 |
| Tabla 5 | Lista de materiales de fabricación de la estructura de la 1° propuesta de diseño                      | 76 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 6 Componentes del 2° prototipo y su correspondiente consumo energético. ....                       | 86  |
| Tabla 7 Componentes seleccionados para energizar el 2° prototipo. ....                                   | 88  |
| Tabla 8 Lista de materiales de fabricación 2° propuesta de diseño .....                                  | 89  |
| Tabla 9 Parámetros del sensor LDR para la lectura del resultado del test.....                            | 91  |
| Tabla 10 Detalle de costos en materiales para la fabricación del prototipo 1.....                        | 94  |
| Tabla 11 Detalle de costos en materiales para la fabricación del prototipo 2.....                        | 95  |
| Tabla 12 Datos de concentración de albúmina en orina humana y su correlación de medición de pixeles..... | 102 |
| Tabla 13 Características de algunos tipos de hantavirus. ....  | 117 |
| Tabla 14 Protocolo para detección de hantavirus en roedores e insectívoros.....                          | 118 |
| Tabla 15 Resumen de los métodos publicados para la recolección de orina de roedores. ....                | 119 |
| Tabla 16 Lista de materiales experimento microdispositivo rectangular. ....                              | 120 |
| Tabla 17 Materiales fabricación de $\mu$ PAD a través de inmersión en parafina. ....                     | 122 |
| Tabla 18 Datos técnicos de los microprocesadores utilizados en el prototipo 1 y en el prototipo 2.....   | 157 |
| Tabla 19 Datos técnicos de los componentes y sensores seleccionados para los prototipos 1 y 2.....       | 157 |
| Tabla 20 Datos técnicos de los servomotores seleccionados para los prototipos 1 y 2..                    | 158 |

## **LISTA DE IMÁGENES**

|  |    |
|--|----|
| Imagen 1 Árbol filogenético de los diferentes hantavirus portados por roedores e insectívoros. Adaptada de [4]. HTNV, virus Hantaan; SEOV, virus Seoul; DOBV, virus Dobrava; SAAV, virus Saaremaa; PUUV, virus Puumala; TULV, virus Tula; PHV, virus Prospect Hill; BLLV, virus Blood Land Lake; ISLAV, virus Isla Vista; KHAV, virus Khabarovsk; TOPV, virus Topografov; SNV, virus Sin Nombre; NYV, virus New York; MGLV, virus Monongahela; ELMCV, virus El Moro Canyon; RIOSV, virus Río Segundo; MULV, virus Muleshoe; BAYV, virus Bayou; BCCV, virus Black Creek Canal; LANV, virus Laguna Negra; RIOMV, virus Río Mamore; ANDV, virus Andes; TPMV, virus Thottapalayam..... | 10 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| Imagen 2 Método de recolección de orina de un único animal utilizando film plástico transparente [27]. .... | 18 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| Imagen 3 Método de recolección de orina de varios animales utilizando un film plástico transparente [27].   | 18 |
| Imagen 4 Método para recoger orina de rata a través de un vaso de precipitado [27].   | 19 |
| Imagen 5 Sistema sencillo y económico para colección de orina de ratón [27].  | 20 |
| Imagen 6 Dispositivos microfluidicos para biomarcadores, células humanas, bacterias, y detección de virus. Adaptado de [46].  | 25 |
| Imagen 7 Esquema típico de un ensayo de flujo lateral (LFA) [48].   | 26 |
| Imagen 8 $\mu$ PADs fabricados con cera donde; a) patrón a mano alzada, b) impresión con inyección de tinta en papel de nitrocelulosa y repaso a mano alzada con lápiz de cera, c) impresión dedicada de cera; d) [49], test a una muestra de orina [50].                   | 28 |
| Imagen 9 Configuraciones del $\mu$ PAD a desarrollar. Fuente propia.  | 29 |
| Imagen 10 Dimensiones de la configuración utilizada para definir la situación física en la simulación computacional. Zona A corresponde a la zona de testeo, la zona de muestra es donde se deposita la muestra de fluido y la zona B es la zona de control. Fuente propia. | 31 |
| Imagen 11 Configuración B impregnada con reactivos en un sustrato de papel de filtro whatman $^{\circ}2$ , para pruebas de difusión. Fuente propia.   | 33 |
| Imagen 12 Generación de color en configuración B impregnada con reactivos en un sustrato de papel de filtro whatman $^{\circ}2$ , luego de ser depositada una muestra de orina humana. Fuente propia.   | 33 |
| Imagen 13 Malla utilizada en la simulación. Se observa el refinamiento de malla sobre la geometría en estudio. Fuente propia.   | 40 |
| Imagen 14 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 3.210 s de simulación. Fuente propia.   | 41 |
| Imagen 15 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 6.834 s segundos de simulación. Fuente propia.  | 41 |
| Imagen 16 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 7.349 s de simulación. Fuente propia.   | 42 |
| Imagen 17 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 8.580 s de simulación. Fuente propia.   | 42 |
| Imagen 18 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 13.418 s de simulación. Fuente propia.  | 43 |

|  |    |
|--|----|
| Imagen 19 Dimensiones de las tiras reactivas rectangulares. Fuente propia. ....  | 48 |
| Imagen 20 Disposición de marcaje con las configuraciones A y B. Fuente propia.....   | 49 |
| Imagen 21 Parejas de tiras reactivas impregnadas con verde de bromocresol y albúmina de suero bovino, según las configuraciones A y B. Fuente propia.....                                    | 49 |
| Imagen 22 Cambio de color en parejas de tiras reactivas, producto de la difusión de la orina. Volúmenes de muestra de 30, 60, 120 $\mu$ l y control con agua bidestilada. Fuente propia..... | 50 |
| Imagen 23 Esquema que explica el procedimiento para aplicar el método de fabricación por inmersión de parafina. Adaptado de [50]. ....   | 51 |
| Imagen 24 Geometría 1 para molde metálico. Fuente propia. ....   | 52 |
| Imagen 25 Geometría 2 para molde metálico. Fuente propia. ....   | 52 |
| Imagen 26 Geometría 3 para molde metálico. Fuente propia. ....   | 53 |
| Imagen 27 Geometría 4 para molde metálico. Fuente propia. ....   | 53 |
| Imagen 28 Geometría 5 para molde metálico. Fuente propia. ....   | 54 |
| Imagen 29 Geometría 6 para molde metálico. Fuente propia. ....   | 54 |
| Imagen 30 Esquema que representa el marcaje de los reactivos y la muestra en el microdispositivo. Fuente propia.....   | 55 |
| Imagen 31 Moldes de metal resultantes. Fuente propia.....  | 55 |
| Imagen 32 Sistema acoplado de imán, lámina de vidrio, papel de filtro y molde de metal. Fuente propia. ....  | 56 |
| Imagen 33 Vista superior del sistema acoplado luego de ser sumergido en parafina derretida. Fuente propia. ....  | 56 |
| Imagen 34 Vista lateral del sistema acoplado luego de ser sumergido en parafina derretida. Fuente propia. ....   | 57 |
| Imagen 35 Cinco de las seis geometrías enfriándose para luego retirar el molde de metal correspondiente. Fuente propia. ....   | 57 |
| Imagen 36 Dispositivo microfluídico donde al interior de la geometría se tiene la zona hidrofílica y al exterior la zona hidrofóbica. Fuente propia.....                                     | 58 |
| Imagen 37 Vista con un magnificación 400X del microcanal realizado en papel de filtro de nitrocelulosa con parafina líquida. Fuente propia. ....   | 59 |
| Imagen 38 Prueba de detección con las cinco geometrías resultantes. En la fila superior se probó con 30 $\mu$ l de orina, en la inferior con 20 y/o 60 $\mu$ l. Fuente propia. ....          | 60 |

|  |    |
|--|----|
| Imagen 39 Primer plano de la geometría n°3, después de realizada la prueba de detección de proteína con 30 µl y 20 µl respectivamente. Fuente propia. ....   | 61 |
| Imagen 40 Vista trimetrica del diseño del prototipo 1. Fuente propia.....  | 64 |
| Imagen 41 vista explosionada del diseño del prototipo 1. Fuente propia. ....   | 65 |
| Imagen 42 Vista en corte del vaso de Pitágoras. Fuente propia. ....  | 67 |
| Imagen 43 Nivel de vaciado del vaso de Pitágoras. Fuente propia. ....  | 68 |
| Imagen 44 Consideraciones de las dimensiones para el cálculo del tiempo de vaciado del contenido del vaso de Pitágoras, h=9mm corresponde a la altura máxima que alcanza el fluido antes de escurrir, D=18mm es el diámetro interior de todo el cuerpo y d=2mm es el diámetro de salida del fluido. Fuente propia..... | 68 |
| Imagen 45 Vista en corte del sistema de colección y separación de orina y heces. Fuente propia. ....   | 71 |
| Imagen 46 Diagrama de flujo de programación. Fuente propia. ....   | 72 |
| Imagen 47 Arduino Pro Mini [70]. ....  | 73 |
| Imagen 48 Sensor PIR [71]. ....  | 74 |
| Imagen 49 Servo motor MG90S [72]. ....   | 75 |
| Imagen 50 Sensor RGB TSC 3200 [73]. ....   | 75 |
| Imagen 51 Concepto de modularidad. Fuente propia. ....   | 77 |
| Imagen 52 Vista isométrica del diseño del prototipo 2. Fuente propia. ....   | 78 |
| Imagen 53 vista explosionada del prototipo 2. Fuente propia. ....  | 78 |
| Imagen 54 Acercamiento de la muesca para el acople rápido de los muros en la estructura. Fuente propia. ....   | 80 |
| Imagen 55 Muecas para imanes en la unión superior del módulo de recolección. Fuente propia. ....   | 80 |
| Imagen 56 Sistema de cierre puerta de cebo. Fuente propia.....   | 81 |
| Imagen 57 Diagrama de flujo de la programación. Fuente propia. ....  | 82 |
| Imagen 58 Mega 2560 PRO MINI AT-mega 2560 [74]. ....   | 83 |
| Imagen 59 Sensor DHT11 [75]. ....  | 84 |
| Imagen 60 Modulo Sim 800L [77]. ....   | 85 |
| Imagen 61 Esquema de alimentación para el prototipo 2. Fuente propia. ....   | 85 |

|   |     |
|---|-----|
| Imagen 62 Tira reactiva rectangular marcada con la configuración B y probada con agua.<br>Fuente propia. ....   | 90  |
| Imagen 63 Función SENDATA del código general de Arduino. Fuente propia. ....  | 92  |
| Imagen 64 Planilla Excel GSM SEPT 2019, utilizada como base de datos. Fuente propia.<br>.....   | 92  |
| Imagen 65 Distribución de la concentración de albúmina en X, a los 3.210 segundos; 6.834<br>segundos, 7.349 segundos, 8.580 segundos y 13.418 segundos de iniciada la simulación. Fuente<br>propia. ....  | 98  |
| Imagen 66 Distribución de la concentración de albúmina en X para la zona de test<br>comprendida entre los 0.01m – 0.013 m a los 3.210 segundos; 6.834 segundos, 7.349 segundos,<br>8.580 segundos y 13.418 segundos de iniciada la simulación. Fuente propia..... | 100 |
| Imagen 67 Situación experimental detección de albúmina en muestra de orina, a los 3<br>segundos. Fuente propia.....   | 101 |
| Imagen 68 Pruebas realizadas en canal rectangular con 60µl y 120µl. Fuente propia. ..   | 102 |
| Imagen 69 Gráfica de la función del número de pixeles en función de la concentración de<br>albúmina. Fuente propia.....   | 103 |
| Imagen 70 Trampa Sherman de captura viva para roedores de pequeña envergadura [88].<br>.....  | 105 |
| Imagen 71 Conexión electrónica modular, uso de terminales imantados [89]. ....  | 105 |
| Imagen 72 Trozo de 15x15 cm de plancha laminada acero A36 de 2 mm de espesor. Fuente<br>propia. ....  | 125 |
| Imagen 73 Perforaciones a material base de los moldes metálicos. Fuente propia. ....  | 125 |
| Imagen 74 Centro de mecanizado vertical CNC ROMI modelo 760 [105]. ....   | 126 |
| Imagen 75 Material puesto dentro del centro de mecanizado. Fuente propia. ....  | 126 |
| Imagen 76 Proceso de mecanizado de material base en el equipo. Fuente propia. ....  | 127 |
| Imagen 77 Broca de fresa de 2mm, utilizada para mecanizar el material. Fuente propia.<br>.....  | 127 |
| Imagen 78 Primera propuesta de solución. Fuente propia. ....  | 130 |
| Imagen 79 Parte superior. Fuente propia. ....   | 130 |
| Imagen 80 Muro trasero. Fuente propia.....  | 131 |
| Imagen 81 Compartimiento del cebo. Fuente propia.....   | 131 |

|  |     |
|--|-----|
| Imagen 82 Piso parte superior. Fuente propia. ....                         | 132 |
| Imagen 83 Muro frontal. Fuente propia.....                                 | 132 |
| Imagen 84 Paredes. Fuente propia.....                                      | 133 |
| Imagen 85 Techo. Fuente propia. ....                                       | 133 |
| Imagen 86 Embudo A vista inferior. Fuente propia. ....                     | 134 |
| Imagen 87 Embudo A vista superior. Fuente propia. ....                     | 134 |
| Imagen 88 Dispositivo de rebote. Fuente propia. ....                       | 135 |
| Imagen 89 Embudo B vista superior. Fuente propia.....                      | 135 |
| Imagen 90 Embudo B vista lateral. Fuente propia.....                       | 136 |
| Imagen 91 Embudo C. Fuente propia. ....                                    | 136 |
| Imagen 92 Embudo C vista lateral. Fuente propia.....                       | 137 |
| Imagen 93 Vaso de Pitágoras. Fuente propia.....                            | 137 |
| Imagen 94 Vista en corte del vaso de Pitágoras. Fuente propia. ....        | 138 |
| Imagen 95 Sketch código completo. Fuente propia.....                       | 139 |
| Imagen 96 Sketch código completo. Fuente propia.....                       | 140 |
| Imagen 97 Sketch código completo. Fuente propia.....                       | 140 |
| Imagen 98 Sketch sensor RGB. Fuente propia. ....                           | 141 |
| Imagen 99 Sketch sensor RGB. Fuente propia. ....                           | 142 |
| Imagen 100 Sketch TIMER Fuente propia. ....                                | 142 |
| Imagen 101 Sketch sensor PIR. Fuente propia. ....                          | 143 |
| Imagen 102 Sketch Servomotor. Fuente propia.....                           | 143 |
| Imagen 103 Vista frontal. Fuente propia. ....                              | 144 |
| Imagen 104 Vista interior sección 2. Fuente propia. ....                   | 144 |
| Imagen 105 Close-up electrónica y detección de muestra. Fuente propia..... | 145 |
| Imagen 106 Archivo board prototipo 1. Fuente propia.....                   | 146 |
| Imagen 107 Esquemático prototipo 1. Fuente propia. ....                    | 147 |
| Imagen 108 Nivel 1 de captura. Fuente propia. ....                         | 148 |
| Imagen 109 Nivel 2 de separación y colección. Fuente propia. ....          | 148 |
| Imagen 110 Nivel 3 electrónica. Fuente propia. ....                        | 149 |
| Imagen 111 Ensamblaje 2° prototipo. Fuente propia. ....                    | 149 |
| Imagen 112 Ensamblaje 2° prototipo. Fuente propia. ....                    | 150 |

|   |     |
|---|-----|
| Imagen 113 Embudo. Fuente propia.....   | 150 |
| Imagen 114 Filtro. Fuente propia.....   | 151 |
| Imagen 115 Vista de los tres niveles separados. Fuente propia.....                            | 152 |
| Imagen 116 Unión de los tres niveles. Fuente propia.....                                      | 152 |
| Imagen 117 Vista lateral unión de los tres niveles. Fuente propia.....                        | 153 |
| Imagen 118 Close-up tercer nivel: electrónica. Fuente propia.....                             | 154 |
| Imagen 119 Close-up segundo nivel: Separación y colección de muestra. Fuente propia.<br>..... | 154 |
| Imagen 120 Archivo board prototipo 2. Fuente propia.....                                      | 155 |
| Imagen 121 Esquemático prototipo 2. Fuente propia.....  | 156 |

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

## 1.1 ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN

Existe una gran cantidad de enfermedades (producidas debido a la presencia de diferentes tipos de virus) los cuales afectan a la población humana, principalmente debido al contacto directo o indirecto con animales. Uno de estos virus, es el hantavirus. Este virus está presente en continentes como África, Asia, América y Europa [1]. Las infecciones por este virus son particularmente importantes en cuatro zonas geográficas: Lejano Oriente Asiático, Europa, América del Norte y América del Sur [2]. Las infecciones por hantavirus tienen una gran importancia en la salud pública; aparte de su alta tasa de casos de letalidad, la que es de alrededor del 40% a 50% para el síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) [3], causan una considerable morbilidad. Por ejemplo, un 5% de los hospitalizados por síndrome renal con fiebre hemorrágica (HFRS) infectados con el virus Puumala PUUV, una de las cepas que ocasiona este síndrome y afecta a la zona norte de Europa, requieren tratamiento de diálisis renal crónico [4].

Este virus también se encuentra en nuestro país, donde predomina la cepa ANDES. El reservorio natural de esta cepa es un roedor silvestre denominado *Oligoryzomys longicaudatus* (ratón colilargo). Su hábitat se extiende desde el extremo sur del Desierto de Atacama hasta el extremo austral de la XI Región [5]. La letalidad del Síndrome Cardiopulmonar por hantavirus (SCPH), enfermedad que afecta al hombre producida por la infección con la cepa ANDES, es de alrededor de un 35% con un promedio de 55 casos confirmados al año [6].

## 1.2 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Es escasa la investigación y desarrollo de tecnologías disponibles referente a la prevención de infecciones por hantavirus producto del contacto directo con roedores portadores de la familia Cricetidae. Los esfuerzos actuales han centrado el foco en el período post contagio, por ejemplo, en el desarrollo de dispositivos para la detección del virus en humanos [7]. Podría ser una alternativa útil para reducir los contagios el proveer alternativas que alerten de zonas de riesgo, cambiando el enfoque actual centrado en las personas infectadas.

### **1.3 SOLUCIÓN PROPUESTA**

Desarrollar un equipo, capaz de realizar la captura viva de roedores de pequeña envergadura, similares a los de la familia Cricetidae, reservorio natural del hantavirus. Se podrá colectar y separar en él, a través de filtración simple por la acción de la gravedad, muestras biológicas de orina.

A través de un dispositivo microfluídico basado en papel, incluido en el equipo, se podrá detectar la presencia de proteínas en el volumen colectado. El funcionamiento del equipo, será probado con muestra de orina humana.

Finalmente, los resultados deben ser enviados de manera remota, vía conexión GSM a una base de datos online.

Esta detección se podrá extrapolar, en pruebas futuras, para detectar la proteína específica del virus del Hanta en muestras de orina del roedor.

### **1.4 OBJETIVOS**

#### **1.4.1 Objetivo General**

Diseñar y fabricar un dispositivo inteligente, autónomo y portátil, que permita desarrollar una prueba de concepto de la captura viva y posterior colecta de muestras biológicas (orina) de roedores.

#### **1.4.2 Objetivo Específico**

- Investigar e implementar métodos para la colección de muestras biológicas (orina) y de trampeo en pequeños mamíferos.
- Investigar la incidencia del hantavirus en Chile y los métodos preventivos de contagio.
- Estudiar dispositivos microfluidicos para detección de proteínas.
- Diseñar y fabricar un dispositivo microfluidicos para la detección de proteínas.
- Estudiar el comportamiento del flujo de fluidos en el microdispositivo.

## Capítulo I: Introducción

- Estudiar e implementar conceptos de electrónica de microcontroladores y sensores.
- Implementar un sistema de envío de datos remoto.
- Desarrollar un estudio numérico de la situación física en el dispositivo microfluídico.

### **1.5 ALCANCES**

El alcance es el diseño y fabricación de un dispositivo, a nivel prototipo, para poder realizar pruebas de concepto de la presencia de proteína en muestras de orina.

### **1.6 METODOLOGÍAS Y HERRAMIENTAS UTILIZADAS**

El desarrollo de esta tesis se definió bajo tres líneas de investigación, las cuales fueron; Diseño y fabricación de prototipos, desarrollo del dispositivo microfluídico para la detección proteica y simulación numérica de la situación experimental. Estos involucraron procesos de manufactura digital como corte láser, mecanizado de piezas por control numérico por computadora e impresión 3D. También involucró trabajo en laboratorio con componentes y reactivos químicos y se utilizaron software de paquetes CFD para realizar las simulaciones pertinentes.

### **1.7 RESULTADOS ESPERADOS**

Como resultados del desarrollo de esta tesis se tendrá el diseño 3D y fabricación de un prototipo de trampa inteligente de sacrificio, para roedores de pequeña envergadura. Este contará con un sistema de colección y separación de muestras de orina, un dispositivo microfluídico para la detección cualitativa de proteína en dichas muestras y un sistema electrónico que realice la lectura y posterior envío de los resultados a una base de datos en línea.

## 1.8 ORGANIZACIÓN DEL DOCUMENTO

- **Capítulo I: Introducción**

Este capítulo trata sobre la definición del problema, objetivos y alcances esperados.

- **Capítulo II: Hantavirus**

Información general referente al hantavirus, métodos de detección y prevención, su presencia en el mundo y la situación chilena.

- **Capítulo III: Colección de Muestras de Orina en Pequeños Mamíferos**

Revisión de métodos y protocolos para la colección de muestras de orina en pequeños mamíferos (roedores).

- **Capítulo IV: Dispositivo microfluídico**

En este capítulo, se describen los fundamentos para la fabricación del dispositivo microfluídico, el estudio de la dinámica de fluidos en los microcanales y su simulación. Por último, se revisan las técnicas para la realización de inmuno-ensayos, se determina cuál será la técnica idónea para la detección de proteínas en la muestra recogida y se documenta la fabricación.

## Capítulo I: Introducción

- **Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo**

Este capítulo contempla el diseño de los prototipos realizados del dispositivo inteligente. En él se documentan; el diseño 3D, la electrónica, materiales y métodos de fabricación.

- **Capítulo VI: Costos**

- **Capítulo VII: Resultados y Discusión**

Se describen y discuten los resultados de los experimentos realizados, la simulación numérica y de la fabricación de la versión final del equipo.

- **Capítulo VIII: Bibliografía**

- **Capítulo IX: Anexos**

## **CAPÍTULO II: HANTAVIRUS**

## 2.1 GENERALIDADES

Existe una gran familia de virus llamada bunyaviridae. De ella se desprenden cinco tipos; Bunyavirus, phlebovirus, nairovirus, Tospovirus y hantavirus. Los primeros cuatro están presentes en artrópodos hematófagos, mientras que el hantavirus está presente en roedores [8].

La enfermedad por hantavirus fue conocida en la década del 50', cuando hubo la ocurrencia de 3.200 casos de fiebre hemorrágica entre las tropas de las Naciones Unidas que participaban de la guerra de Corea [2]. El agente portador fue descubierto en 1976 y fue denominado Hantaan, por el nombre de un río de Corea del Sur donde fue capturado [9]. Luego otros virus similares fueron identificados tanto en Europa como en Asia, y fueron asociados a cuadros intensos de fiebre con compromiso renal y manifestaciones hemorrágicas. Estos presentaron variaciones en los niveles de gravedad según el agente causal. Hoy en día, todos estos cuadros se reconocen como HFRS [10].

En 1993 se produjo una gran cantidad de muertes en los Estados Unidos, debido a un cuadro de enfermedad pulmonar fulminante. Estos corresponden a los primeros casos de infección en las américas [11]. Por medio de una investigación, se descubrió que la especie era un tipo nuevo de hantavirus desconocida hasta ese momento. Esta se denominó Virus Sin Nombre (SNV) y la enfermedad fue nombrada como síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) [12].

Este género representa a los agentes causales de graves enfermedades en humanos que muchas veces pueden llegar a ser fatales, destacándose el síndrome cardio-pulmonar por hantavirus (SCPH) que afecta a países de América del Sur siendo los más afectados Chile y Argentina. En 1995 se identificó el primer caso humano en nuestro país, en la localidad de Segundo Corral en la comuna de Cochamó [13].

## 2.2 DEFINICIÓN

El virus del Hanta, posee un genoma particular trisegmentado; segmento S, segmento M y segmento L. El primer segmento codifica las proteínas N y NEP; el segundo segmento está diseñado para codificar la proteína G1, G2 y NEM; y el último segmento, cumple la función de codificar ARN polimerasa. Tienen forma oval o esférica con 70-120 nanómetros de diámetro. La

## Capítulo II: Hantavirus

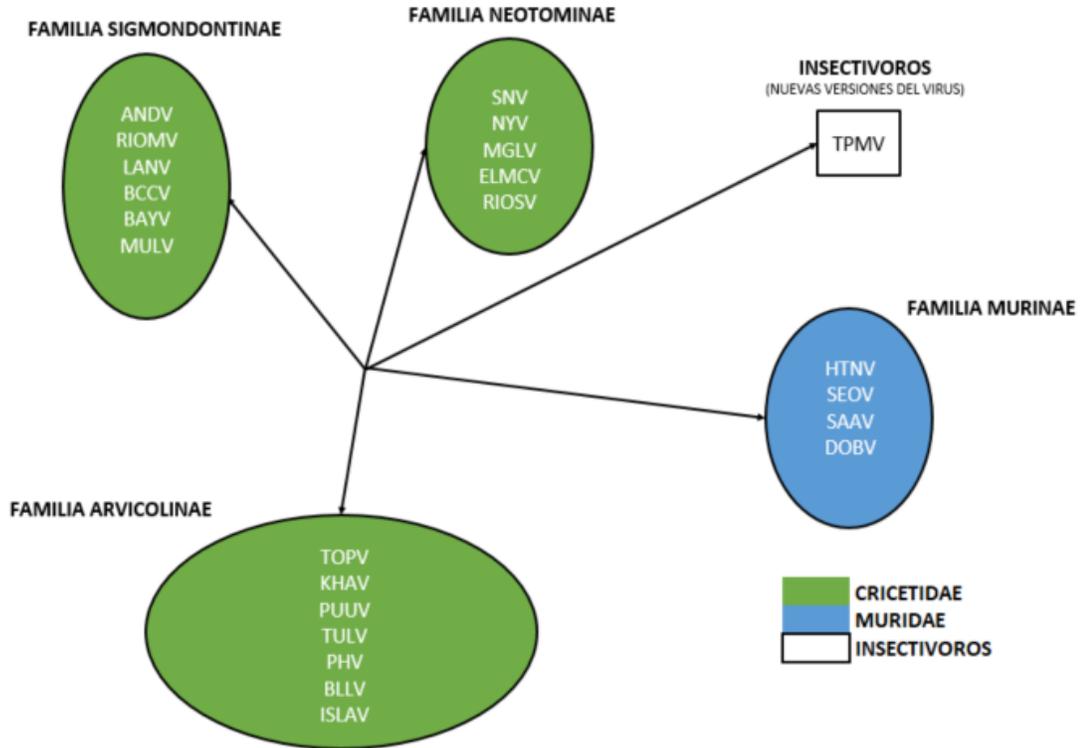
nucleocápside se encuentra rodeada por la envoltura viral, conformada por uno de los tres segmentos de ARN y la proteína N [8].

Se han reconocido diferentes cepas dentro del género del hantavirus. Desde una perspectiva evolutiva, los hantavirus se han adaptado y coevolucionado a diferentes especies por millones de años. En roedores, el virus está presente en la familia Cricetidae en las subfamilias; Arvicolinae, Neotominae y Sigmodontinae, incluyendo campañoles y leminos del hemisferio norte, y ratones y ratas del nuevo mundo. Y también en roedores Muridae en la subfamilia Murinae incluyendo ratones y ratas del viejo mundo.

### 2.3 CEPAS Y RESERVORIOS

Los hantavirus americanos provienen de la familia sigmodontinae y pueden causar el síndrome cardiopulmonar por hantavirus (SCPH) cómo se conoce en Chile o el síndrome pulmonar por hantavirus cómo se denomina en Norte América. En Europa y Asia. los hantavirus provienen de la familia murinae y arvicolinae. El contagio en éstas zonas del mundo, puede producir fiebre hemorrágica con síndrome renal. Los hantavirus americanos que más casos humanos (notificados) han provocado son el Virus Sin Nombre (SNV) del ratón americano *Peromyscus manicuatus*, y el Virus Andes (ANDV) del ratón sudamericano *Oligoryzomys longicaudatus*. Estos se hacen aún más relevantes debido a su elevada letalidad observada, que fluctúa entre un 40-60% [8].

Varios miembros del género hantavirus provocan diferentes formas de la fiebre hemorrágica con síndrome renal, donde los primeros casos de esta antigua enfermedad fueron descritos en Rusia en el año 1930 [14]. Los cuatro virus que han sido asociados con HFRS, fueron bautizados según las regiones donde por primera vez fueron aislados de sus reservorios. Estos son; *Apodemus agrarius* para el virus Hantaan, *Rattus norvegicus* y *Rattus* para el virus Seoul, *Clethrionomys glareolus* para el virus Puumala y *Apodemus flavicollis* para el virus Dobrava [4]. En la imagen 1 se puede apreciar las relaciones de los diferentes tipos de virus y sus vectores (portadores), divididos en sus cuatro grandes familias, y también las apariciones recientes de versiones del virus del Hanta en la familia de insectívoros.



*Imagen 1* Árbol filogenético de los diferentes hantavirus portados por roedores e insectívoros. Adaptada de [4]. HTNV, virus Hantaan; SEOV, virus Seoul; DOBV, virus Dobrava; SAAV, virus Saaremaa; PUUV, virus Puumala; TULV, virus Tula; PHV, virus Prospect Hill; BLLV, virus Blood Land Lake; ISLAV, virus Isla Vista; KHAV, virus Khabarovsk; TOPV, virus Topografov; SNV, virus Sin Nombre; NYV, virus New York; MGLV, virus Monongahela; ELMCV, virus El Moro Canyon; RIOSV, virus Río Segundo; MULV, virus Muleshoe; BAYV, virus Bayou; BCCV, virus Black Creek Canal; LANV, virus Laguna Negra; RIOMV, virus Río Mamore; ANDV, virus Andes; TPMV, virus Thottapalayam.

El virus Hantaan de Corea y el Dobrava de Eslovenia, están asociados con formas similares de HFRS, presentando características en primera instancia de falla renal, donde posteriormente se pueden producir edemas pulmonares y coagulación intravascular diseminada (DIC), con un rango de mortalidad estimada de entre un 5-15%. En el caso del virus Seoul, se produce una forma moderada de HFRS, que se ha esparcido por Europa y Asia, así como su reservorio. [15]. En el anexo A1 se muestran las características de algunos tipos de hantavirus.

En la década del 90 se confirmó la presencia del hantavirus en las poblaciones de roedores del país, con la aparición de los primeros casos confirmados del síndrome pulmonar por hantavirus. Se desplegó un amplio operativo de control y prevención por parte del sistema de salud de Chile, para evitar que se propagara a otras zonas del país. A través de las investigaciones realizadas y de

la información obtenida a raíz de los brotes de esta enfermedad en Estados Unidos en el año 93', se pudo establecer que el reservorio del virus en Chile eran roedores silvestres [13].

## 2.4 ECOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DEL HANTAVIRUS EN LOS RESERVORIOS

Como se mencionó anteriormente, roedores de diferentes familias son portadores de diferentes variedades del virus del Hanta. Por tanto, es altamente probable que, en lugares donde se encuentren colonias de estos animales, haya contagios y, en consecuencia, casos de enfermedades como el síndrome pulmonar por hanta virus. Una de las principales vías de transmisión del hantavirus a humanos es a través de la inhalación de aerosoles que contienen el virus. Éstos son excretados por los roedores infectados. Estudios de laboratorio y de campo, confirman que los roedores infectados con hantavirus son reservorios estables que dispersan el virus a través de la orina, heces y saliva sin mostrar signos aparentes de enfermedad [16]. Por el contrario, en otros virus de la familia Bunyaviridae, que se transmiten dentro de la población de roedores a través de artrópodos, se plantea la hipótesis de que la transmisión entre roedores ocurre por encuentros agresivos o por contaminación ambiental. Esto a través de la excreciones de roedores infectados [17]. Por este motivo las heridas y cicatrices se interpretan como señales de encuentros intra-específicos [18].

Estudios previos sobre reservorios de hantavirus en diferentes países, demuestran que en la prevalencia de infección es mayor en individuos adultos, que en jóvenes o sub-adultos y en machos que en hembras. Por esto, se entiende que el método principal de mantenimiento del virus es la transmisión horizontal ocasionada por; contacto agresivo, , el efecto de la edad que lo expone durante un tiempo prolongado al virus o el tamaño del área de acción de sus individuos [19].

Experimentos realizados en *Oligoryzomys longicaudatus*, no encontraron relación entre la prevalencia de heridas y la presencia de ANDV [17]. En el trabajo de Piudo *et al* (2012) [20] se evaluó y determinó que el sexo, la edad, masa corporal y las heridas fueron factores importantes para determinar la circulación y persistencia del virus dentro de la población del reservorio natural del virus. Se concluyó en este estudio que la probabilidad de que un macho adulto, con heridas presente anticuerpos contra ANDV aumentó con el incremento de la masa corporal. Y el valor de esta era mayor al 80% en individuos con masas corporales mayores a 44 g. Esto demuestra la

importancia de identificar las características epidemiológicas de cada especie en la transmisión del virus ya que afectan la incidencia de posibles contagios en humanos.

La variación en la densidad de la población de roedores es un factor muy importante en la aparición de casos de síndromes asociados a hantavirus. Esta variación se ve influenciada por; cambios climáticos, variación en la oferta de alimentos, presencia de predadores, etc. En Chile el florecimiento de *Chusquea quila* y de otras especies de gramíneas, tienen un importante efecto en el crecimiento de la sobrepoblación de roedores silvestres, debido a la gran cantidad de semillas que produce esta planta y que sirve de alimento para estos animales. Este fenómeno, que ocurre cada 20 años, representa la gran causa del brote epidémico ocurrido en la zona sur de nuestro país. Otra causa es la actividad en las zonas rurales de la gente que vive en esas áreas, debido a las precarias condiciones de saneamiento y las precarias condiciones estructurales en sus viviendas lo que facilita el contacto expuesto con los roedores o sus excreciones. Otro grupo de riesgo son las personas que realizan actividades de excursiones o al aire libre y no toman el resguardo necesario para evitar el contagio. Existe, por tanto, una importante variedad de factores ambientales que inciden en la presentación de contagios en humanos.

### **2.5 DIAGNÓSTICOS ESPECÍFICOS EN INFECCIONES HUMANAS POR HANTAVIRUS**

Frente a la sospecha clínico-epidemiológica de infección aguda por hantavirus, se debe optar por el diagnóstico específico realizado por un laboratorio que certifique o descarte la posible infección. El laboratorio debe contar con test de diagnóstico sensibles y específicos, que detecten en una etapa temprana la infección. las técnicas para el diagnóstico en humanos se mencionan a continuación.

#### **2.5.1 Pruebas serológicas**

El método mayormente utilizado, para la detección de infecciones agudas, es el de detección de inmunoglobulina M o IgM específica anti hantavirus [6]. La respuesta a IgM se desarrolla a los pocos días de producida la infección. Esta acompaña al paciente convaleciente por al menos 6 a 8 meses. Este diagnóstico puede ser acompañado por la detección de la inmunoglobulina (Ig) G. La aparición de IgG específica ocurre a los pocos días después de la

aparición de IgM y acompaña al paciente por varios años. Para la detección de IgM se prefiere utilizar test tipo ELISA por su alta especificidad. Es importante tener en cuenta las características de los antígenos utilizados, dado que, a mayor homología antigénica con las cepas de una determinada zona, mayor será la sensibilidad del test. En las cepas presentes en América del Sur, parece haber mayor cercanía antigénica, no así con las presentes en el Hemisferio Norte. Por este motivo las pruebas serológicas que sólo contienen material antigénico de estos virus no son recomendadas para el diagnóstico de contagios producidos en Chile por ejemplo y que puedan provocar SCPH [6,8].

### **2.5.2 Detección viral**

Otro método utilizado es la detección de proteínas virales o antígenos. Este tipo de test permite detectar un tipo específico de cepa del virus. Es utilizado como diagnóstico rápido y se utiliza para su fabricación test del tipo inmunocromatograficos [21], por ejemplo.

### **2.5.3 Ácidos nucleicos**

Otra opción es la detección de ARN, desde muestras de sangre u otros tejidos obtenidos a partir de autopsias. En este método es utilizada la técnica de transcripción reversa de polimerasa en cadena (RT-PCR) [8]. Esta técnica es la síntesis de un ADN monocatenario, mediante un ARN monocatenario como plantilla, ayudado por transcriptasas reversas [22]. Si es detectado ADN, en condiciones específicas, se asume la presencia del ARN de hantavirus en la muestra en estudio.

### **2.5.4 Inmunohistoquímicas**

Esta opción consta de la detección de antígenos virales, desde cortes de tejidos mediante técnicas inmunohistoquímicas. Pruebas inmunohistoquímicas de tejidos fijados con formol, que es un compuesto químico utilizado para la conservación de muestras biológicas, y anticuerpos mono y policlonales, han demostrado ser un método sensible para la detección de hantavirus [23].

### **2.5.5 Aislamiento viral**

El cultivo viral en células Vero E6, es otra alternativa para la detección de hantavirus. Estas células son continuas y pueden replicarse en varias ocasiones sin envejecer. Una o dos semanas después de la inoculación, se puede detectar las células infectadas con virus hanta [24]. Este no es un procedimiento apropiado para estudiar la ocurrencia de contagios en humanos, porque es un procedimiento lento y de bajo rendimiento que involucra alto riesgo de contaminación viral en el laboratorio [25].

### **2.5.6 Técnicas de diagnóstico rápido**

Existen dos kits comerciales, verificados por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), para el diagnóstico rápido de la presencia de contagio con el virus del Hanta, a través de la detección de anticuerpos IgM, específicamente en las cepas ANDV, PUUV y SNV [6].

## **2.6 DETECCIÓN DE INFECCIONES POR HANTAVIRUS EN ROEDORES E INSECTIVOROS**

Los hantavirus causan en roedores portadores infecciones persistentes por lo que virus infecciosos y anticuerpos específicos para esos virus están presentes. Esto se presumen también para insectívoros, a pesar de que no existan estudios suficientes que avalen esto. Un protocolo para la detección de Hanta virus en roedores es descrito en el Anexo A2.

Este protocolo ha sido utilizado exitosamente por grupos de investigación que han logrado encontrar nuevas cepas de hantavirus; como el virus tula [26]. El test serológico inicial se aplica si es usado trampeo de animales vivos, ya que no necesita que el individuo sea sacrificado[4].

En este sentido desarrollar un equipo que pueda aplicar un test serológico similar al descrito en el protocolo anterior, y que opere de forma autónoma representaría un gran avance y aporte en el trabajo ya realizado en laboratorio, permitiendo identificar la presencia de virus en los roedores capturados y también en el levantamiento de datos fisiológicos muy útiles en investigación como lo son el peso, por ejemplo.

**CAPÍTULO III: COLECCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA EN  
PEQUEÑOS MAMÍFEROS**

### 3.1 GENERALIDADES

La recolección de orina es un procedimiento de suma importancia tanto en la práctica de la veterinaria, para revisar el estado de salud de los animales, como en la investigación científica, donde se evalúan los resultados de procedimientos experimentales. La recolección de muestras de orina pura de pequeños mamíferos, como los roedores, requiere procedimientos complejos y consideraciones especiales, sobre todo por la pequeña cantidad de volumen que es posible coleccionar de estos animales sin que deshidraten y se expongan a riesgo vital.

Según se observa en estudio anteriores [27], los aspectos más importantes en la recolección de orina son los siguientes:

- Facilidad de recolección
- Calidad de la muestra
- Prevención de la contaminación
- Rigor de los procedimientos empleados
- Grado de dolor causado al animal
- Mejorar los métodos para reducir el dolor y el estrés en el animal

La orina constituye el procedimiento final del metabolismo realizado por el sistema renal y urinario. El análisis de este fluido, es muy útil para la evaluación del estado del animal y representa una de las mejores opciones a la hora de realizar diagnóstico no invasivo [28].

Se ha definido un criterio para categorizar a los diferentes métodos, según los siguientes parámetros:

- Facilidad de la colección
- Grado de invasividad o severidad de los procedimientos
- Calidad de la muestra
- Prevención contra la contaminación
- Diferentes grados de dolor o sufrimiento animal durante el procedimiento

## Capítulo III: Colección de muestras de orina

Como animales de experimentación, son usados ratones y ratas para una gran variedad de propósitos. Por lo general se utilizan en experimentación de infección parasitaria, por ejemplo, o bacteriana, en desórdenes inmunológicos, estudios oncológicos y para el análisis de enfermedades humanas de origen genético [29]. Las ratas por su parte, son usadas para estudios nutricionales, colesterol y enfermedad renal [30]. Se describen a continuación algunos métodos para la recolección de orina de roedores.

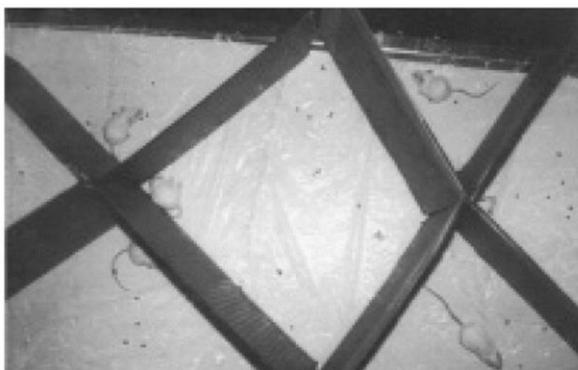
### **3.2 RECOLECCIÓN DE ORINA SIN INTERVENCIÓN**

#### **3.2.1 Recolección de orina de ratón utilizando un film plástico transparente**

En Kurien y Scofield [31] se describen dos métodos para la recolección de orina para análisis cualitativo. El primero es el método del único animal que consiste en permitir que un único ratón orine en un film transparente Glad® (imagen 2). Esto estaba dispuesto sobre hojas de papel blanco fuera de la jaula de roedor. El segundo método de múltiples animales (imagen 3), consiste en la separación de siete ratones en siete compartimientos provisionales formados por estructuras en forma de X, que fueron fabricadas en cartón y dispuestas sobre el film transparente donde se les permitió orinar. La orina excretada fue aspirada en tubos de micro centrifugación utilizando una pipeta por desplazamiento de aire regulable en ambos casos. Se logró obtener orina pura sin ningún tipo de intervención en un tiempo de 12 segundos. Se obtuvieron volúmenes de 10-250 µl. los animales fueron retirados de sus compartimientos tan pronto como hubieron orinado.



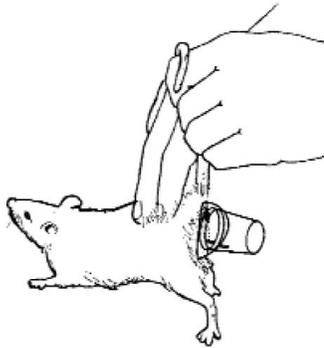
*Imagen 2 Método de recolección de orina de un único animal utilizando film plástico transparente [27].*



*Imagen 3 Método de recolección de orina de varios animales utilizando un film plástico transparente [27].*

### **3.2.2 Recolección puntual de una muestra de orina utilizando un vaso de precipitados**

A veces es necesario recolectar orina de un gran número de animales para un análisis cualitativo, por ejemplo, para detectar la presencia de glucosuria. En el trabajo de Kosho *et al* (1985). [32] se describe un procedimiento simple y eficiente. Este consistía en unir un vaso de precipitado de poli estireno de 5ml a la pared perineal utilizando cinta adhesiva por las dos caras (imagen 4). Así el vaso se podía pegar y despegar cuando se quisiera, aunque después se determinó que este procedimiento podía ocasionar derramamiento de orina y contaminación con heces. Luego de adherirse el vaso, se sostenía a la rata por la cola y se estimulaba de forma táctil la espalda del animal utilizando los dedos de la otra mano (imagen 4). Se determinó que el 80% de los animales excretaban entre 0,1 a 0,8 ml de orina en pocos segundos.



*Imagen 4 Método para recoger orina de rata a través de un vaso de precipitado [27].*

### **3.2.3 Método de recolección de orina por tubo capilar**

Hayashi & Sakaguchi [33] demostró que se podía utilizar tubos capilares para recoger orina de ratas Sprague-Dawley macho. La rata se sujetaba con una mano y se presionaba con el pulgar y el tercer dedo de la otra mano la parte baja del abdomen, en torno a la vejiga, produciendo así la excreción urinaria. La orina excretada era recogida de forma directa e inmediatamente se depositaba en dos tubos capilares sujetos entre el dedo índice y el dedo corazón. El método se encontró adecuado para análisis de orina rutinarios en ratones y ratas, aunque no fue posible estimar el volumen de orina recogida mediante este proceso.

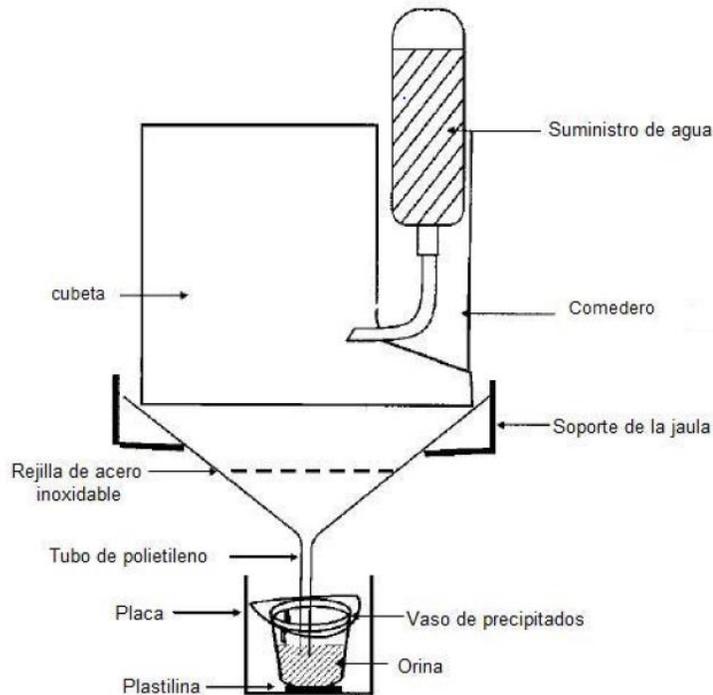
## **3.3 CONTENCIÓN MODIFICADA UTILIZADA PARA LA COLECCIÓN DE ORINA DE 24 HORAS**

### **3.3.1 Método del embudo de polietileno**

En el trabajo de Perline (1971) [34] se diseñó un aparato para recoger orina de ratón utilizando un embudo de polietileno de 22,5 cm de diámetro. En este se insertó un tamiz de nylon (1,410 mm de mallado cortado con un diámetro de 12,5 cm) y se colocó un tamiz de acero inoxidable (4,76 mm de mallado/25 mm cortado con un diámetro de 11,25) sobre los bordes del tamiz de nylon que quedaron hacia arriba. Ambos tamices se sujetaron al embudo realizando 6

### Capítulo III: Colección de muestras de orina

pares de agujeros alrededor de su perímetro y asegurándolos con alambre y luego se recortó el sobrante de tamiz de nylon (imagen 5). Después se colocó el ratón en el embudo, encerrándolo con una tapa de plástico agujerada para la ventilación. Se dispuso finalmente el dispositivo en un soporte adecuado y se colocó un vaso de precipitado debajo del mismo. No se documentó la cantidad de orina colectada por el dispositivo.



*Imagen 5 Sistema sencillo y económico para colección de orina de ratón [27].*

#### 3.3.2 Dispositivo para la recolección de orina de 24 horas en ratones

En el trabajo de Jones *et al* (1973) [35] se documenta un dispositivo para la colección de orina de un único ratón. Se componía de una jaula para animales Gridweld (17,5x17,5x15 cm), un embudo de aluminio calibre 24 de 20 cm<sup>2</sup> con un orificio de 0,94 cm de diámetro en el vértice y un tubo de polietileno (12,5 cm de largo y 0,78 cm de diámetro). La jaula se mantiene dentro del embudo y debajo de ella se coloca una rejilla de acero inoxidable (3,360 mm/25mm). El embudo y la rejilla se bañan en silicona para reducir la superficie de tensión y facilitar el paso de la orina. El tubo de polietileno permanece en el recipiente de recolección y sobresale por el embudo, evitando así el paso de las heces al recipiente, pero sin impedir el paso de la orina. El ratón es

colocado en el dispositivo y se le permitió aclimatarse durante 24 horas antes de comenzar la recolección de orina. Luego se colectaba la orina durante 16 horas y luego se retiraba el embudo y se pasaba a dar alimento por un periodo de 8 horas.

#### **3.4 MÉTODOS CON JAULAS METABÓLICAS COMERCIALES PARA LA RECOLECCIÓN DE ORINA DE 24 HORAS**

Numerosa es la cantidad de jaulas metabólicas comerciales para contener animales de experimentación con el objetivo de obtener muestras de orina. Entre las más utilizadas encontramos a Harvard Apparatus, MA, USA [36] y Tecniplast, NJ, USA [37].

Estas jaulas están construidas para separar de forma efectiva las heces y la orina en tubos dispuestos en el exterior de la jaula. El proceso es muy eficiente, obteniéndose una separación completa, sin contaminación de la orina y sin ninguna posibilidad de que la orina entre en el contenedor de las heces. La construcción de una jaula metabólica comercial es la siguiente:

El individuo se mantiene en un compartimiento de policarbonato transparente y resistente a las mordeduras provisto con respiraderos. También, cuenta con un compartimiento para la comida fuera de la jaula que contiene un cajón con alimento. Este se puede abrir desde el exterior de la jaula, haciendo más fácil así la reposición del alimento y evitando la contaminación de la orina. El contenedor del alimento es pequeño, lo que evita que el ratón pueda dormir en él. Las jaulas tienen bebederos calibrados a prueba de derrames, para evitar que el agua entre a la jaula. Los tubos para la recolección de orina y heces están hechos de polimetilpenteno (PMP) impermeable, permitiendo que estas fluyan dentro de los tubos recolectores respectivos. Los desechos pueden retirarse sin molestar al animal, lo que permite que las pruebas puedan realizarse por periodos de tiempo prolongado. También todos los componentes de la jaula pueden esterilizarse.

Se han descrito diferentes modelos de jaulas metabólicas para la recolección de orina de animales, pero no se ha demostrado con claridad que estos procedimientos no sean estresantes para los animales, lo que es especialmente cierto en animales que se alojan en jaulas mucho más pequeñas que las dimensiones recomendadas para alojar animales de laboratorio para experimentación [38]. También las jaulas metabólicas están construidas con mallas de alambre como piso para el compartimiento del ratón. Esto puede conllevar a incomodidad para el animal o

### Capítulo III: Colección de muestras de orina

incluso daños en los tejidos de las patas si el alojamiento es por un tiempo prolongado, mayor a 24 horas, produciendo úlceras por presión [39]. Se ha demostrado la importancia del bienestar animal en la obtención de buenos resultados experimentales [40]. Por otro lado, el costo de adquisición de estos equipos es muy alto y esto es debido a la calidad de materiales que utilizan en la fabricación, la eficiencia que proveen los sistemas de colección y tratamiento de muestra que proveen estos equipos, y que aseguran los fabricantes, y la falta de alternativas en el mercado.

Habitualmente a los roedores se les ha mantenido en habitáculos pequeños en condiciones altamente estandarizadas, con el fin de reducir la variabilidad de los resultados en las investigaciones. El énfasis en las condiciones de hospedaje del animal se ha puesto en proporcionar elementos que ayuden al animal a alcanzar ciertas condiciones de rendimiento. También se ha demostrado que un entorno más complejo, comparado a la jaula regular, reduce las respuestas de ansiedad [41]. El sistema actual de alojamiento no satisface los requerimientos del comportamiento animal, a pesar de incluir habitáculos de comida y agua. Los roedores han demostrado tener un variado repertorio de comportamientos, que se ve interrumpido cuando se exponen a condiciones convencionales de laboratorio. Por consiguiente estos animales presentan comportamientos no habituales lo que indica que están sometidos a cuadros de estrés [42]. Alojamiento de roedores en jaulas que los exponen a aislamiento social, pisos de grilla, pequeño espacio y falta de material para hacer un nido puede causar cambios fisiológicos debido a las respuestas ocasionadas por el estrés. Alojamiento de roedores en jaulas metabólicas puede constituir un potencial problema de bienestar para estos. Las jaulas metabólicas tradicionales necesitan ser desarrolladas para ser más eficientes en la colección de la orina y heces, mientras que permiten a los animales desarrollar sus comportamientos naturales, como por ejemplo anidar [43].

En el Anexo A3 se muestra una tabla comparativa de los métodos para la recolección de orina en pequeños roedores descritos en la literatura.

## **CAPÍTULO IV: DISPOSITIVO MICROFLUIDICO**

## 4.1 GENERALIDADES

Recientemente se ha producido un considerable progreso en el campo de la miniaturización. Hoy es posible miniaturizar toda clase de sistemas a tamaños micrométricos, como, por ejemplo; mecánicos, electromecánicos, térmicos, etc. En los años 80, estos logros dieron vida a un nuevo campo conocido como Sistemas microelectrico-mecánicos o MEMS por sus siglas en inglés. Tiempo después se diversificó la fabricación y utilidad de estos dispositivos, encontrándose aplicaciones para biología, química y biomedicina. Estos sistemas utilizan flujo de fluidos bajo condiciones poco usuales, que condujo a la aparición de un nuevo campo de estudio llamado Microfluidica. Esta puede ser definida como el estudio de flujos de fluidos de variados tipos y condiciones, en microsistemas del orden de micrómetros a milímetros [44].

Algunos ejemplos de las aplicaciones biomédicas de estos dispositivos son; suministros y control de drogas; manipulación, detección y transporte de ADN y proteína, entre otros [45]. Este último tiene un especial aporte para esta tesis, dado que uno de los objetivos es poder detectar la presencia de proteína (albúmina) en muestras de orina.

Microfluidica en general consiste en dos grandes componentes:

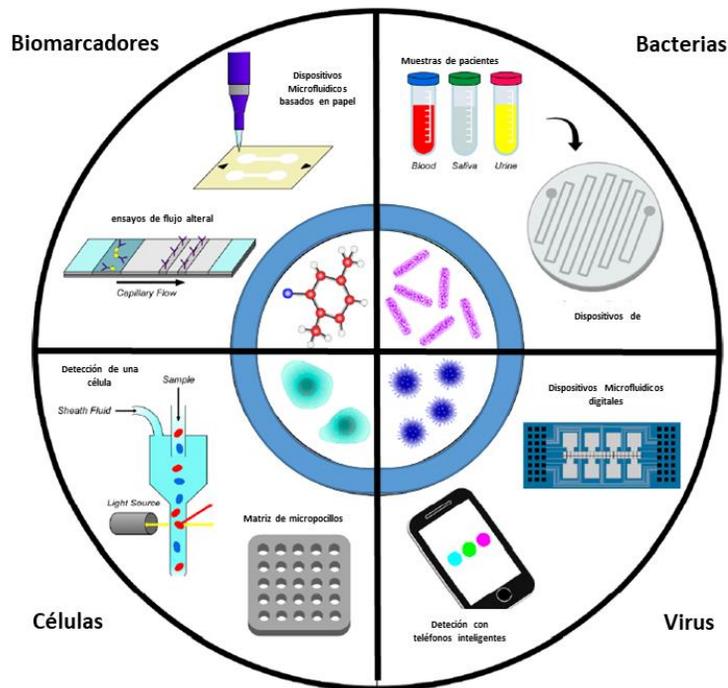
- Modelamiento teórico y numérico.
- Fabricación y métodos experimentales

En el siguiente capítulo se mencionarán los diferentes métodos para detección de proteínas en microsistemas y se escogerá al más idóneo. Luego, se estudiarán y aplicarán distintos métodos de fabricación. Finalmente, a los dispositivos creados se les realizará pruebas de laboratorio para testear su capacidad como biomarcadores.

## 4.2 MODELAMIENTO TEÓRICO-NUMÉRICO Y OBTENCIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES

### 4.2.1 Detección de biomoléculas y biomarcadores

Para facilitar el diagnóstico temprano, se debe poder identificar el tipo de infección o el biomarcador clave asociado a la enfermedad del paciente. El proceso de identificación incluye coleccionar muestras del paciente, como; saliva, sangre, orina. A través de técnicas de laboratorio con ajustes clínicos es posible testear estas muestras en búsqueda de patógenos o biomarcadores específicos como proteínas, azúcares, u otras biomoléculas relevantes para ciertas enfermedades. Nuevos enfoques han sido desarrollados para aislar, detectar y cuantificar patógenos y biomarcadores, otorgando así indicios de la progresión de una enfermedad [46]. La imagen 6, muestra los diferentes dispositivos microfluidicos para algunas de las áreas de uso más importantes.



*Imagen 6 Dispositivos microfluidicos para biomarcadores, células humanas, bacterias, y detección de virus. Adaptado de [46].*

En el extremo izquierdo superior de la imagen 6, se encuentran los biomarcadores que son indicadores medibles de la presencia de algún estado de enfermedad. De entre los métodos y dispositivos microfluidicos utilizados para biomarcadores, los más representativos son los ensayos de flujo lateral y los dispositivos microfluidicos basados en papel.

### 4.2.2 Ensayos de flujo lateral (LFA)

Los ensayos point of care (POC) basados en ensayos de flujo lateral (LFA) han tenido un rápido desarrollo como estrategias para el análisis cualitativo y cuantitativo. Los ensayos de flujo lateral, son realizados sobre una tira, conformada por variados componentes y ensamblada en un sustrato plástico. Estos componentes son,

- Almohadilla de muestra (Sample pad)
- Almohadilla del conjugado (Probe pad)
- Membrana de nitrocelulosa (Detection membrane)
- Almohadilla de adsorción (Adsorbent pad)

Agentes pre-inmovilizados, en distintas zonas de la tira, se activan a medida que fluye sobre ellos el fluido de muestra. Las características más destacables de los LFA son; análisis rápido, bajo costo operacional, instrumentación simple, poca o ninguna interferencia debido a la separación por cromatografía, alta especificidad y estabilidad de largo plazo en diferentes condiciones de medioambiente [47]. La imagen 7 muestra la configuración básica de un LFA:

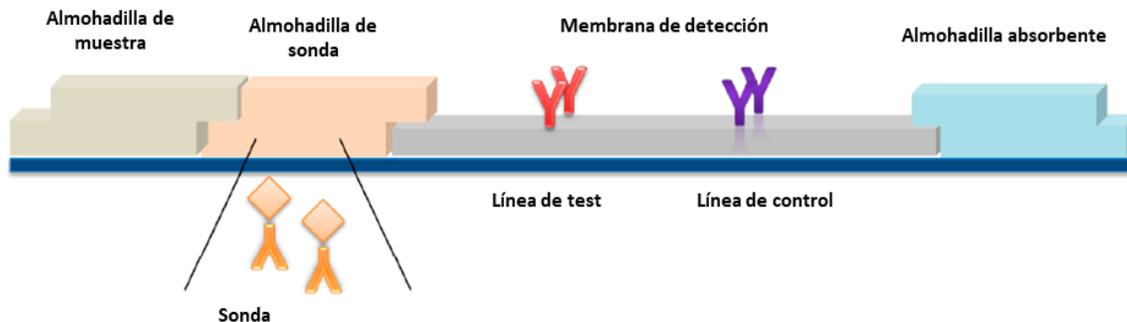


Imagen 7 Esquema típico de un ensayo de flujo lateral (LFA) [48].

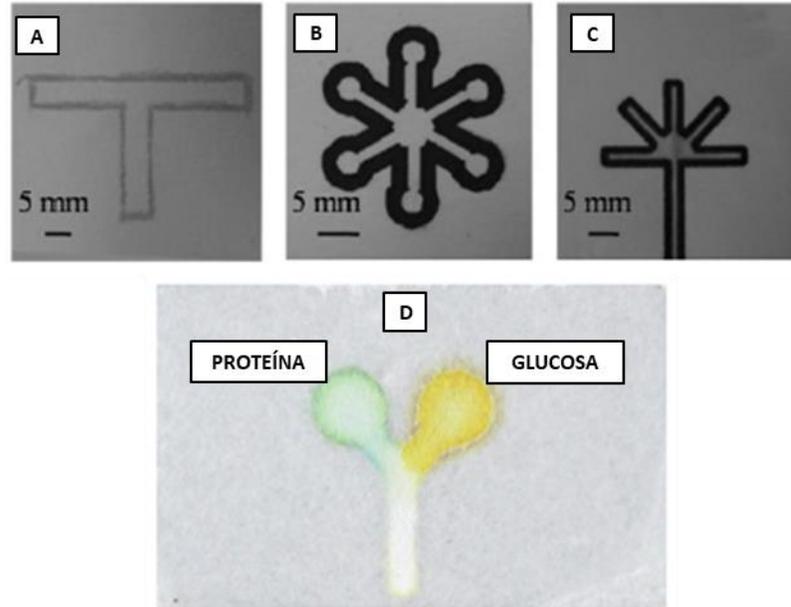
La almohadilla de muestra es donde se deposita la muestra en estudio. La almohadilla del conjugado es donde se deposita el marcador de bioreconocimiento, que usualmente es partículas de oro coloidal. La membrana de nitrocelulosa realiza un aporte fundamental en la sensibilidad del test. Esta se encuentra en diferentes grados, que corresponde a diferentes densidades, porosidades y, en definitiva, diferentes características de transporte. La membrana de nitrocelulosa es dividida por dos líneas dibujadas sobre ella, siendo estas de test y de control. La línea de test se busca fijar y, por tanto, aumentar la concentración del Analito que se busca en la muestra. En ambas líneas se genera una reacción de cambio de color, que, con una simple inspección visual, proporciona el resultado del test (línea de test) y nos dice si el test fue realizado correctamente (línea de control).

### 4.2.3 $\mu$ PADs

Los dispositivos microfluidicos analíticos basados en papel o  $\mu$ PADs, son similares a los LFA, salvo que en estos son grabadas barreras hidrofóbicas que delimitan el flujo del fluido de la muestra, también no tienen dibujadas dos líneas para mostrar el resultado del test, entre otras características, permitiendo así una amplia variedad de posibilidades. Los  $\mu$ PADs han ganado un gran interés en los últimos años debido a su fácil uso y bajo costo. El tipo y el recubrimiento del papel, para generar las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas, y la geometría del dispositivo, permiten diferentes configuraciones que ayudan a detectar una amplia gama de biomoléculas. Como limitación de estos dispositivos, se encuentra la incapacidad para detectar las concentraciones de las biomoléculas deseadas, esto sin ayuda de equipos de laboratorio adecuados [44]. Existe algunos dispositivos que escapan de la norma y que logran entregar resultados cuantitativos, pero estos ensayos requieren condiciones controladas para operar de la manera adecuada.

Para detectar biomoléculas en estos dispositivos, en la mayoría de los casos, se graban patrones en el sustrato de papel con químicos para marcar y encontrar las moléculas deseadas a través de un cambio de color que es fácilmente reconocible a simple vista, o integrando un electrodo impreso con productos químicos de detección en el papel, proporcionando así un output eléctrico o electroquímico-luminiscente. Algunos  $\mu$ PAD son diseñados para detecciones simultáneas de glucosa, nitratos y proteínas, utilizando actuadores basados en papel y lecturas colorimétricas, permitiendo así la detección de variadas moléculas [45]. Estos simples dispositivos proveen nuevos métodos que son viables para el testeo medico en áreas poco desarrolladas del

mundo, debido a su relativamente larga vida útil, fácil transporte, bajos requerimiento de equipos y bajo costo de fabricación. En la imagen 8 se puede apreciar  $\mu$ PADs de diferente fabricación y alguna de las detecciones que se pueden realizar en ellos.



*Imagen 8  $\mu$ PADs fabricados con cera donde; a) patrón a mano alzada, b) impresión con inyección de tinta en papel de nitrocelulosa y repaso a mano alzada con lápiz de cera, c) impresión dedicada de cera; d) [49], test a una muestra de orina [50].*

#### 4.2.4 Selección del tipo de dispositivo de trabajo

En esta tesis se realizará, debido a su versatilidad, la fabricación de  $\mu$ PADs para la detección de proteína en muestra de orina. Se buscará realizar la detección de una proteína que sea de alta concentración y estandarización en plasma y orina, para esto se utilizará albúmina. Ésta es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo humano y en la orina, y juega un rol muy importante en las funciones fisiológicas incluido el mantenimiento de la presión osmótica coloide. También tiene efectos antioxidantes y anticoagulantes, actúa como transporte para factores nutricionales y drogas. En la tabla 1, se aprecian los valores normales de concentración de albúmina en humanos [48],

*Tabla 1 Valores de referencia de concentración de referencia de albúmina en muestras de orina humana.*

| Nº de sujetos           | Método | µg/ml    | µg/min   | mg/24h   | Referencia |
|-------------------------|--------|----------|----------|----------|------------|
| 100 adultos             | FIA    | 0,2-17,3 | 0,8-14,6 | 1,1-21,0 | [49]       |
| 20 adultos              | RIA    |          | 5-20     | 3,6-23   | [50]       |
| 11 adultos              | RIA    | 8,13     | 7,1      | 10,2     | [51]       |
| 20 niños                | ELISA  |          | 1,2-15,9 | 1,7-22,9 | [52]       |
| NHANES III <sup>a</sup> | FIA    | 30       | 2,9-4,4  |          | [53]       |
| 646 adolescentes        | FIA    |          |          |          | [54]       |

<sup>a</sup> Es el The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES por sus siglas en inglés)

Para detectar esta proteína existen diversos métodos. De entre ellos se ha escogido el verde de bromocresol que es un indicador orgánico para valoración ácido-base. Pertenece a la familia de los colorantes llamada sulfoneftalinos. También corresponde a una de las técnicas más antiguas y comúnmente usadas, debido a su simpleza y alta eficacia para la detección de albúmina en animales y humanos [55]. Este pasa de un tomo verde amarillento, una vez que es impregnado en el papel, hasta llegar a tonos de verde a azul, una vez que entra en contacto con la albúmina. La concentración mínima de albúmina en orina humana que este compuesto es capaz de detectar y generar tonalidades de azul en concentraciones de alrededor de 0,0014 g/dL de albúmina [56]. Las configuraciones del µPAD que se probarán son las siguientes:



Con V = verde de bromocresol, A = albúmina y M = muestra

*Imagen 9 Configuraciones del µPAD a desarrollar. Fuente propia.*

Estas configuraciones serán fabricadas y probadas de la siguiente manera. En la primera configuración A, se busca emular la de los LFA, donde la muestra es depositada en el extremo inferior. Luego se encuentra impregnado en la tira de papel una línea de verde de bromocresol, lo que produce la línea de test. Posteriormente se deposita albúmina de suero bovino, la que, al ser desplazada por el fluido reacciona con el verde de bromocresol que forma la línea de control, al final de la tira, y genera una reacción de color.

En la segunda configuración B, la muestra se deposita en el centro, dejando en el extremo superior la línea o zona de test, y en el inferior, la línea o zona de control. Se probará la capacidad de los test con estas configuraciones simples.

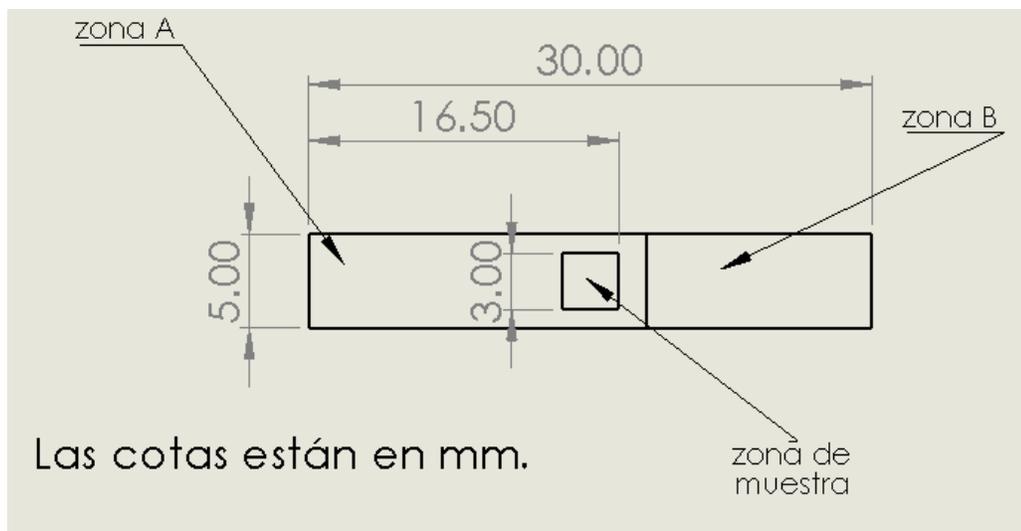
Las características de materialidad de estas configuraciones rectangulares se discutirán en el apartado de fabricación. Se realizará, también, una simulación computacional del comportamiento del fluido en estas configuraciones rectangulares. Además, se buscará realizar geometrías y configuraciones más complejas, para ver si es factible agregar nuevas detecciones de biomoléculas para la misma muestra. Esto será discutido en el apartado de fabricación y métodos experimentales.

### 4.2.5 Modelo teórico

En esta sección se describirá la simulación computacional realizada. Para ello, primero se define la situación física, luego se obtienen los datos necesarios para la simulación, algunos de ellos experimentalmente, y finalmente se describe la simulación realizada.

La configuración B, mostrada en la imagen 9, será la escogida para realizar la simulación. La muestra será depositada en la zona de muestra, que se definió como un cuadrado de 3x3mm y simula la zona que cubre la gota de muestra una vez que entra en contacto con el sustrato. Luego se define la zona o línea de test, en la que el Analito (albúmina) deberá llegar con la concentración adecuada ( $\pm 10-14 \mu\text{g/ml}$  para tonalidades de verde y azul), para reaccionar con el agente marcador (verde de bromocresol) y producir un cambio de color. Finalmente, en el otro extremo se encuentra la zona de control definida a partir de los 18 mm como lo muestra la imagen 10. En esta zona se encontrará impregnada en la tira, albúmina, la que fluirá junto con la muestra hacia la zona donde estará depositado el agente marcador. Esto nos asegura de que efectivamente se logre una reacción

y posterior cambio de color en la zona del marcador, aunque la muestra posea menos de la mínima concentración de albúmina o no tenga en lo absoluto, proporcionando así la línea o zona de control.



*Imagen 10 Dimensiones de la configuración utilizada para definir la situación física en la simulación computacional. Zona A corresponde a la zona de testeo, la zona de muestra es donde se deposita la muestra de fluido y la zona B es la zona de control. Fuente propia.*

Para realizar la simulación, fue necesario obtener los coeficientes de transporte o de difusión del fluido sobre el sustrato. Para este caso, se distinguen dos coeficientes de difusión; el de la orina en el papel en la zona de test y el otro en la zona control. Estos coeficientes fueron obtenidos experimentalmente.

Este procedimiento consistió en depositar una cantidad determinada de muestra de orina humana en tiras reactivas hechas de papel de filtro whatman °2, impregnadas con reactivos, verde de bromocresol y albúmina de suero bovino, según la segunda configuración B que se muestra en la imagen 9.

En este experimento se utilizaron los siguientes materiales:

- Papel de filtro whatman °2
- 3  $\mu$ L de solución de verde de bromocresol (BCG)
- 2  $\mu$ L de solución de suero bovino
- Micropipeta
- Pinzas

## Capítulo IV: Dispositivo Microfluídico

- Guantes quirúrgicos estériles
- 30  $\mu\text{L}$  de muestra de orina humana
- Cronómetro
- Lápiz grafito 2B

Antes de desarrollar el procedimiento experimental del dispositivo rectangular basado en papel, es necesario preparar las soluciones de reactivos que se van a utilizar. El procedimiento se describe a continuación:

- Para el verde de bromocresol, se disuelven 419mg de verde de bromocresol en 10ml de agua. Se mezclan 250ml de solución de verde de bromocresol con 750ml de tampón de succinato y se ajusta el pH a 4,0 con solución de hidróxido de sodio 0,1N.
- Para el tampón de succinato, se disuelve 11,8g de ácido succínico en 800ml de agua y se ajusta el pH a 4,0 con 0,1N de hidróxido de sodio.
- Para la albúmina de suero bovino, se prepara una solución en agua bidestilada a una concentración de 60mg/ml, y se preparan soluciones seriadas hasta llegar a 5mg/ml.

La imagen 11, muestra el resultado de la configuración B, elaborada en el papel de filtro whatman con los reactivos marcados en ella, siendo el lado izquierdo la zona de test y el derecho la zona de control. Posteriormente, en la imagen 12, se muestra el cambio de color producido por el contenido de albúmina de la muestra de orina.

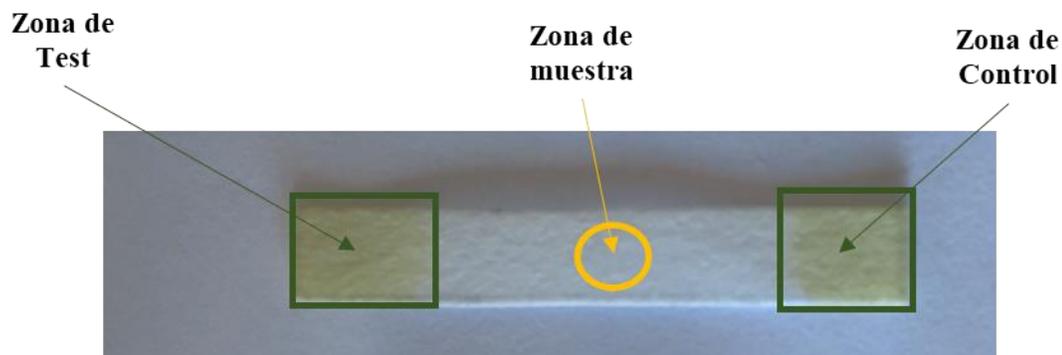


Imagen 11 Configuración B impregnada con reactivos en un sustrato de papel de filtro whatman °2, para pruebas de difusión. Fuente propia.

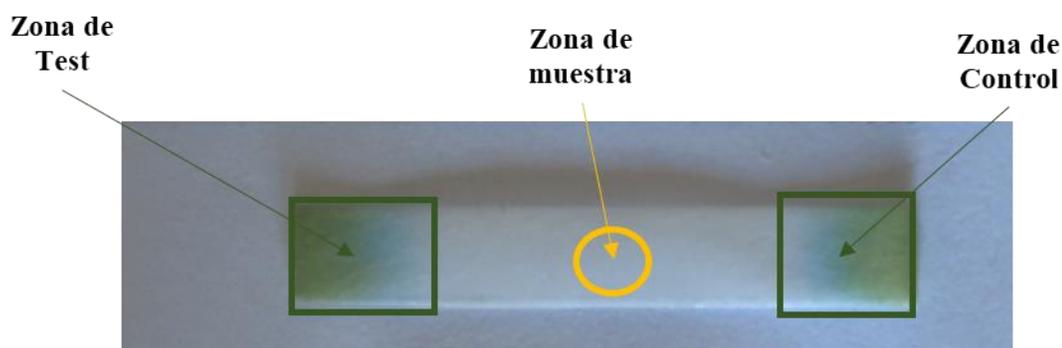


Imagen 12 Generación de color en configuración B impregnada con reactivos en un sustrato de papel de filtro whatman °2, luego de ser depositada una muestra de orina humana. Fuente propia.

Finalmente se registraron los tiempos que se tardó la concentración mínima de analito en llegar a las zonas de marcaje y generar la respuesta cromatografica buscada. Los tiempos reflejados son 9.72 segundos para la zona de test y 12.26 segundos para la zona de control. Con estos datos y conocida el área de sustrato donde se realizó el experimento, es posible obtener ambos coeficientes de difusión.

#### 4.2.5.1 Cálculo de Coeficiente de Difusión

$$D_{test} = \frac{\text{Área tira reactiva}}{\text{tiempo difusión test}} = 7,771 \times 10^{-6} \frac{m^2}{s}$$

$$D_{control} = \frac{\text{Área tira reactiva}}{\text{tiempo difusión control}} = 6.117 \times 10^{-6} \frac{m^2}{s}$$

Donde

$D_{test}$  = Coeficiente de Difusión del fluido en la zona de test

$D_{control}$  = Coeficiente de Difusión del fluido en la zona de control

#### 4.2.5.2 Cálculo de Concentración en % de masa de la albúmina en la orina humana

$$[Albúmina] = 30 \frac{\mu g}{ml} = 0.03 \frac{kg}{m^3}$$

$$Masa\ solución = \rho_{orina} * V_{orina} = 1024 \frac{kg}{m^3} * 1\ m^3 = 1204\ kg$$

$$\%Masa = \frac{0.03\ kg}{1024\ kg} * 100 = 2,953 \times 10^{-3}$$

Donde

$[Albúmina]$  = Concentración de albúmina en la orina humana

$\rho_{orina}$  = Densidad de la orina humana

$V_{orina}$  = Volumen de una muestra de orina humana

$\%Masa$  = Concentración en porcentaje de masa de la albúmina en la orina humana

En la tabla 2 se resumen las propiedades de interés de los elementos mencionados y datos necesarios para realizar la simulación:

Tabla 2 Datos de las propiedades ingresadas a la simulación.

| Propiedad                           | Valor         | Comentario | Referencias |
|-------------------------------------|---------------|------------|-------------|
| Calor específico del aire           | 1012 [J/kg*K] |            | [57]        |
| Calor específico de la orina humana | 4178 [J/kg*K] |            | [58]        |

---

|   |  |   |      |
|---|--|---|------|
| Conductividad térmica del aire  | 0.025 [W/m*K]                              |   | [59] |
| Conductividad térmica del papel de nitrocelulosa                                | 0.105 [W/m*K]                              |   | [60] |
| Porosidad del papel de nitrocelulosa  | 0.567                                      | Relación entre el volumen poroso y el volumen total del papel | [61] |
| Densidad del aire a 293 K   | 1,170 [kg/m <sup>3</sup> ]                 |   | [62] |
| Densidad del papel de nitrocelulosa   | 1150 [kg/m <sup>3</sup> ]                  |   | [63] |
| Coeficiente de difusión de la orina humana sobre papel de nitrocelulosa whatman | 7,716*10 <sup>-6</sup> [m <sup>2</sup> /s] | Dato obtenido experimentalmente                               |      |
| Coeficiente de difusión del agua a 293 K  | 6,652*10 <sup>-6</sup> [m <sup>2</sup> /s] | Dato obtenido experimentalmente                               |      |
| Coeficiente de difusión de la orina humana sobre papel de nitrocelulosa whatman | 6,117*10 <sup>-6</sup> [m <sup>2</sup> /s] | Dato obtenido experimentalmente                               |      |
| °2 y en presencia de albúmina de suero bovino                                   |  |   |      |
| Temperatura del papel de nitrocelulosa  | 293 [K]                                    | Dato obtenido experimentalmente                               |      |
| Temperatura de la orina   | 296 [K]                                    | Dato obtenido experimentalmente                               |      |

---

---

|  |                        |      |
|--|------------------------|------|
| Concentración de albúmina en muestra de orina humana | 30 [μg/ml]             | [53] |
| % masa de albúmina en muestra de orina humana        | 2.953x10 <sup>-3</sup> |      |

---

#### 4.2.6 Modelamiento matemático

La situación física estudiada considera fenómenos de difusión en el sustrato de papel, en dos dimensiones, transiente y donde se asume flujo incompresible, debido al gradiente de concentración que existe entre el volumen de muestra y el sustrato. Las ecuaciones que definen el modelo matemático se describen a continuación:

##### 4.2.6.1 Transporte de especies diluidas: Ley de Fick

$$\frac{DC}{Dt} = \frac{\partial C}{\partial t} + \vec{V}\nabla C = D\Delta C + s$$

Donde

C = Concentración local de masa

$\vec{V}$  = Campo de velocidades en x, y ; es definido como  $\vec{V} = (u(x, y, t), v(x, y, t), 0)$

s = Término fuente

D = Coeficiente de difusión de la especie de concentración C

t = Tiempo

El primer término  $\frac{DC}{Dt}$ , corresponde a la derivada material de la concentración de masa C en el tiempo, que es la variación en el tiempo de la concentración C mientras esta cambia también según el campo de velocidades  $\vec{V}$ . La derivada material difiere del coeficiente de difusión del lado derecho,  $D\Delta C$ , que representa la facilidad de movimiento de un determinado soluto en un solvente y aparece en la ecuación designado con la misma letra. En esta ecuación, el término fuente es cero

debido a que no se añade concentración al dominio y el campo de velocidades también es cero, por lo tanto, se tiene un fenómeno de difusión pura.

#### 4.2.6.2 Continuidad

$$\frac{D\rho}{Dt} + \rho * \nabla \vec{V} = 0$$

Donde

$\rho$  = Densidad de fluido

Para flujos incompresible, el primer término de la izquierda,  $\frac{D\rho}{Dt}$ , corresponde a la derivada material de la densidad en función del tiempo, es igual a cero. Esto significa que el cambio de la densidad en el tiempo, a través de la trayectoria del flujo de fluido es cero, por lo tanto, se tiene flujo incompresible.

#### 4.2.6.3 Ecuaciones de Navier-Stokes

$$\frac{\partial \vec{V}}{\partial t} + (\vec{V} * \nabla) \vec{V} = \frac{1}{\rho} \vec{B} - \frac{1}{\rho} \nabla p + \frac{\mu}{\rho} \nabla^2 \vec{V}$$

Donde

$\mu$  = Viscosidad dinámica del fluido

$\vec{B}$  = Vector de fuerzas volumétricas o fuerzas externas

$\nabla p$  = Vector gradiente de presión

Las fuerzas volumétricas, que corresponden a la acción de fuerzas como la gravedad, son despreciables en la micro escala. También, al estar frente a una situación de difusión pura, se tiene que los componentes  $u, v$ , que son las respectivas velocidades en x e y, son igual a cero.

#### 4.2.6.4 Ecuación de Transporte de Energía

$$\rho c \frac{DT}{Dt} = \nabla * (k \nabla T) + \tau_{ij} \frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \dot{q}$$

## Capítulo IV: Dispositivo Microfluídico

Donde

$c$  = Calor específico del fluido

$k$  = Conductividad térmica

$\tau_{ij} \frac{\partial u_i}{\partial x_j} = \tau'_{ij} \frac{\partial u_i}{\partial x_j} - p \nabla \vec{V}$ , corresponde a los esfuerzos de corte viscosos y de presión

$T$  = temperatura

$\mu$  = Viscosidad dinámica

$\dot{q}$  = Término fuente

La ecuación de transporte de energía queda definida como  $\rho c \frac{DT}{Dt} = k \nabla^2 T + \dot{q}$ , para flujo compresible a bajas velocidades, asumiendo que no existe un campo de eléctrico, que la energía interna queda expresada como  $e = c_v T = c_p T = cT$  y para un coeficiente de calor específico constante. Esto porque el término de disipación viscosa  $\tau_{ij} \frac{\partial u_i}{\partial x_j}$  es despreciable para  $n^\circ$  de Reynolds  $\ll 1$ , como es el caso de la microfluidica [44].

#### 4.2.7 Simulación numérica

Son diversos los paquetes de software computacional con los que se puede simular este tipo de fenómeno. En esta tesis, se utilizará FORTRAN 90 para la simulación computacional. Este es un lenguaje de propósito general, orientado a la computación matemática, en campos como en el de la ingeniería. FORTRAN es un acrónimo de formula translator. Algunas versiones de este lenguaje son:

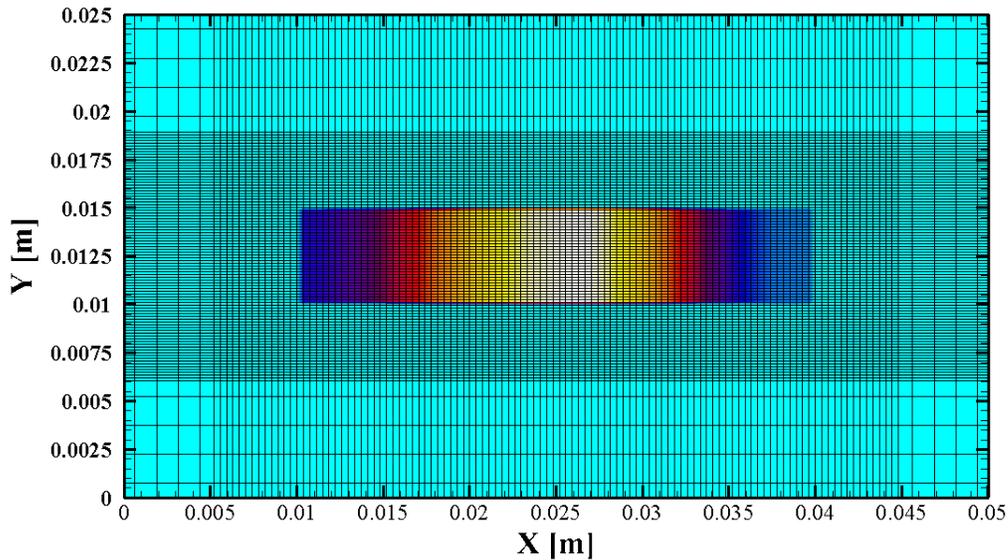
- FORTRAN 66
- FORTRAN 77
- FORTRAN 90
- FORTRAN 2000

Para editar, compilar y ejecutar el código escrito en FORTRAN 90, se utilizó el software Microsoft Developer Studio. Este código tiene incluido, para la solución del problema, el algoritmo SIMPLE o Semi-Implicit method for Pressure-Linked equations. Este algoritmo ha sido ampliamente utilizado en mecánica computacional como procedimiento de solución para las ecuaciones de Navier-Stokes, si se está resolviendo iterativamente un problema transiente. Este método permite:

- Encontrar una aproximación del campo de velocidades resolviendo la ecuación de momentum. El gradiente de presión es calculado usando la distribución de presión desde la iteración previa o una condición inicial.
- Es formulada y resuelta la ecuación de presión, para así obtener la nueva distribución de presiones.
- Las velocidades son corregidas y un nuevo conjunto de flujos conservativos es calculado.

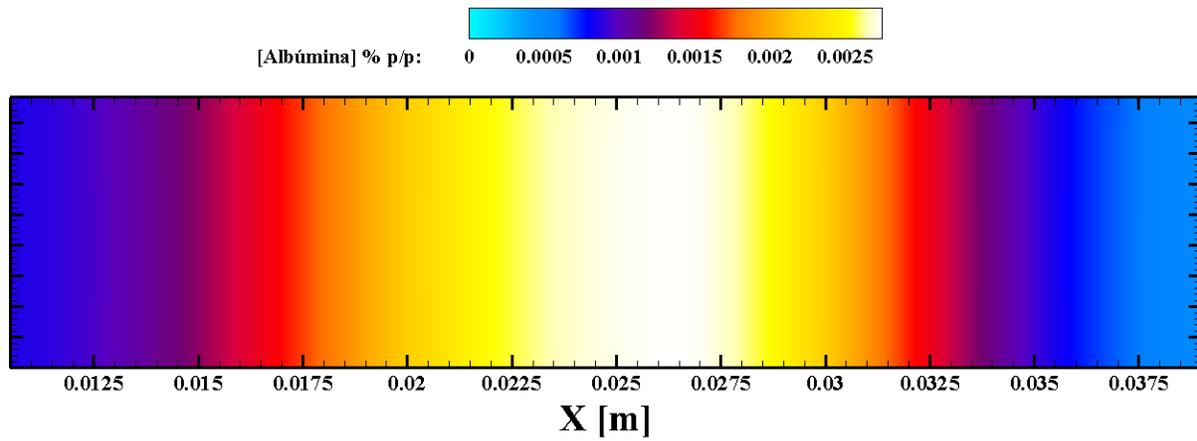
Para visualizar los resultados y generar gráficos, se utilizó el software Tecplot.360 EX. Los resultados se muestran en las siguientes ilustraciones:

La malla generada fue cuadrada con 116 nodos en X y 98 nodos en Y (imagen 13).

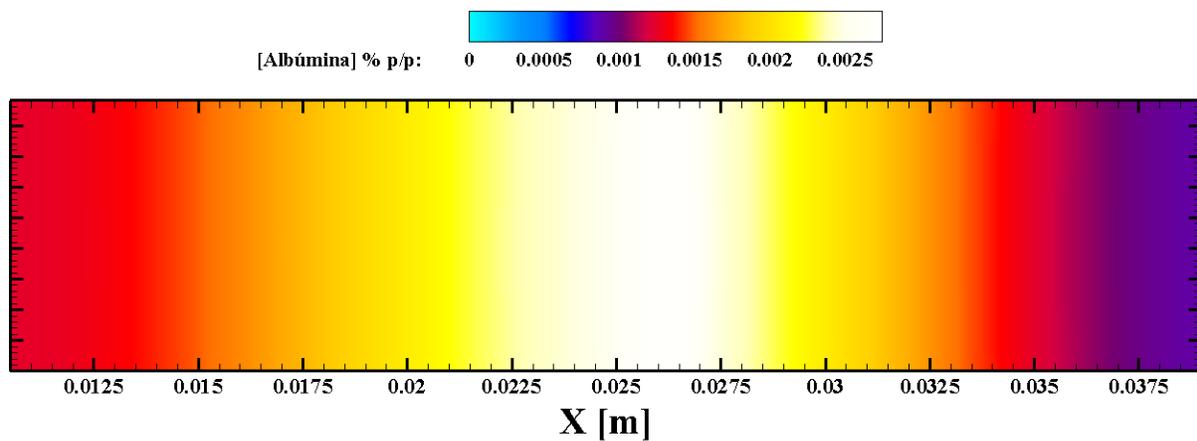


*Imagen 13 Malla utilizada en la simulación. Se observa el refinamiento de malla sobre la geometría en estudio. Fuente propia.*

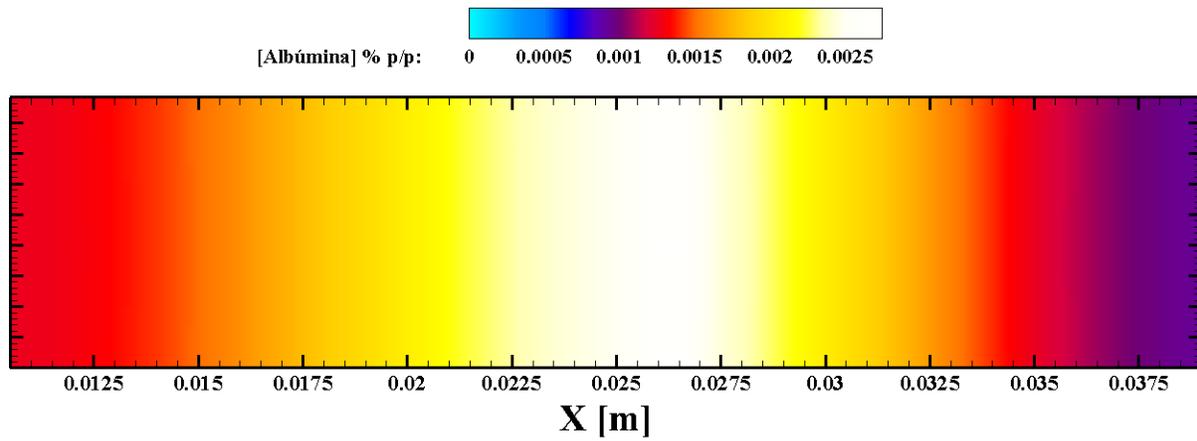
En las siguientes ilustraciones, se muestra el avance de la concentración de analito (albúmina) en cuatro tiempos diferentes desde iniciada la simulación. En la imagen 14, se aprecia que existe una gran concentración de albúmina en el centro de la tira reactiva de alrededor de 28  $\mu\text{g/ml}$ , esto indica que la difusión en el papel es mínima a los 3.210 s segundos de iniciada la simulación. En la imagen 15 se aprecia un avance de la concentración hacia el lado izquierdo (zona de test), que es ligeramente superior al derecho (zona de control). Esto tiene relación con la diferencia en los coeficientes de difusión de la orina, en ambos sentidos de la tira reactiva. La imagen 16 muestra que la concentración alcanzó niveles de 10-14  $\mu\text{g/ml}$  en el lado izquierdo de la tira reactiva, tonalidades de rojo intenso según la escala de color asociada, lo que indica que ha alcanzado la concentración mínima para mostrar un leve cambio de tonalidad, aunque no tan notorio, en esa zona de la tira. Algo similar ocurre en la imagen 17 con la zona de control en el lado izquierdo de la tira reactiva. Con esto se prueba que la simulación muestra el efecto de la diferencia del coeficiente de difusión en ambas zonas del test. Finalmente, en la imagen 18 se aprecia un gradiente de concentración desarrollado a lo largo de toda la geometría y una mayor intensidad de color en ambas zonas para los 13.418 segundos.



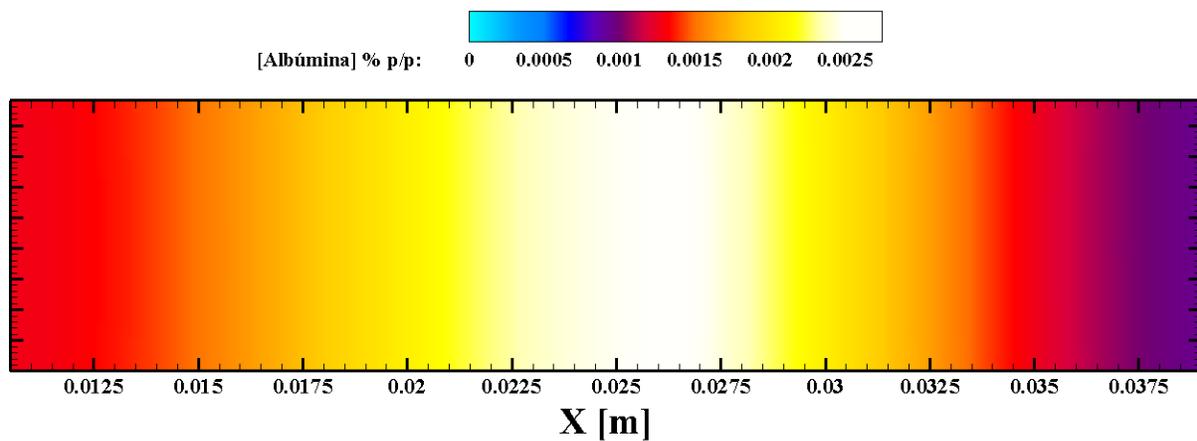
*Imagen 14 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 3.210 s de simulación. Fuente propia.*



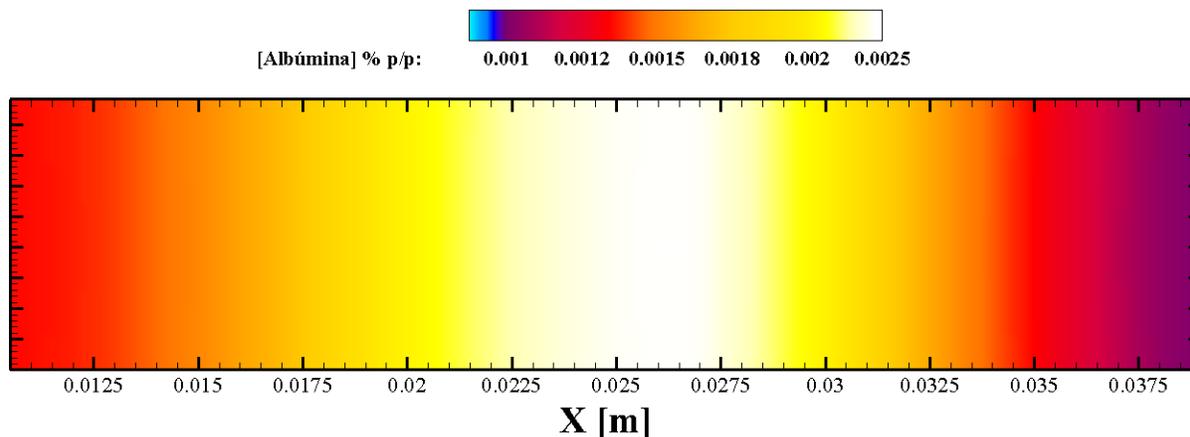
*Imagen 15 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 6.834 s segundos de simulación. Fuente propia.*



*Imagen 16 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 7.349 s de simulación. Fuente propia.*



*Imagen 17 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 8.580 s de simulación. Fuente propia.*



*Imagen 18 Concentración de albúmina en la tira reactiva a los 13.418 s de simulación. Fuente propia.*

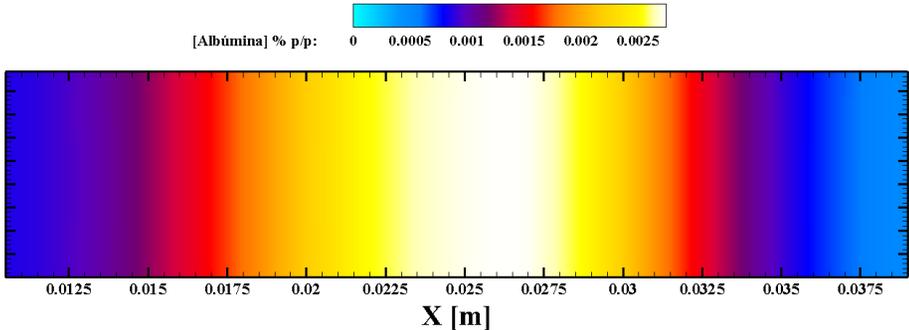
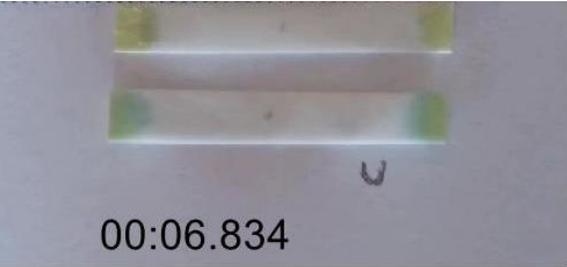
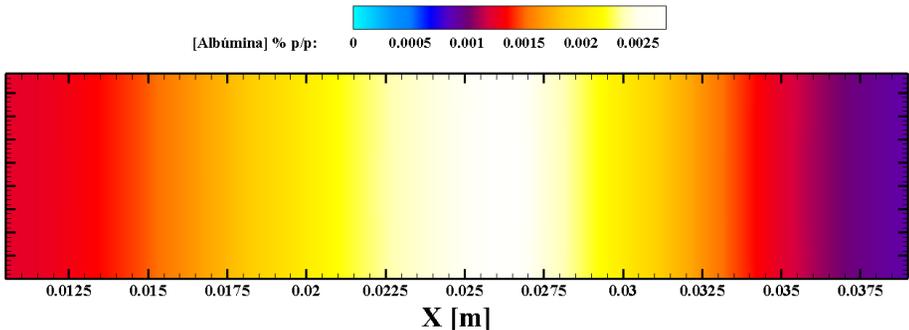
En la tabla 3 se muestra una comparación entre la simulación computacional de la tira reactiva y la prueba experimental, realizada con 30  $\mu\text{l}$  de muestra de orina humana. Las imágenes de la prueba experimental muestran el tiempo desde iniciada la prueba con un cronómetro en la parte inferior en cada una de ellas. También está marcada con una “c” la zona de control en la tira reactiva, la que coincide con el lado derecho de la geometría en la simulación. Por último, se muestra a modo de comparación en la parte inferior de la imagen, una tira con la concentración de albúmina desarrollada a la que se le realizó la prueba 1 minuto antes. Ambas geometrías, en la tira reactiva de papel y en la simulación, tienen las mismas dimensiones.

En el tiempo 1 se aprecia que la tira reactiva de papel tiene un color amarillo con tonalidades de verde en sus extremos. Esto nos indica que a pesar de haber sido implantada la muestra de orina hace alrededor de 3 segundos, la concentración de albúmina ni el frente húmedo aún alcanzan las zonas de test ni la de control. En el tiempo 2 se aprecia que el frente húmedo ya alcanzó el inicio de la zona de test en el lado izquierdo de la tira de papel, produciendo un cambio de color muy leve en el inicio de esa zona (0.013 mm) producto de la humectación de la zona y en menor medida de la concentración de albúmina, lo que tiene relación con la simulación para el mismo periodo de tiempo donde se alcanza un valor aproximado de 13.056  $\mu\text{g/ml}$  que corresponde a un valor cercano

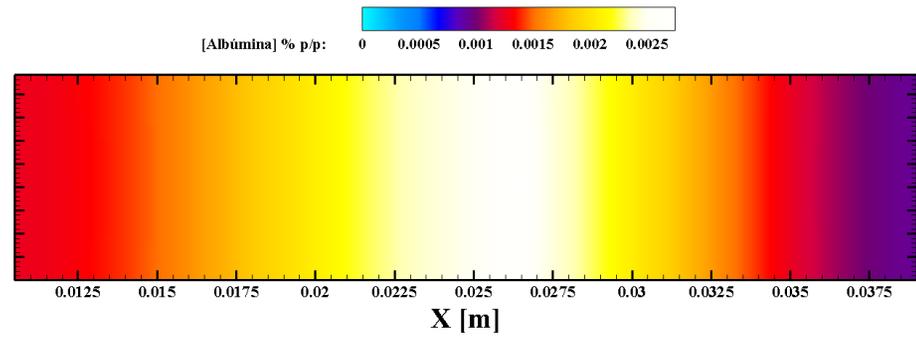
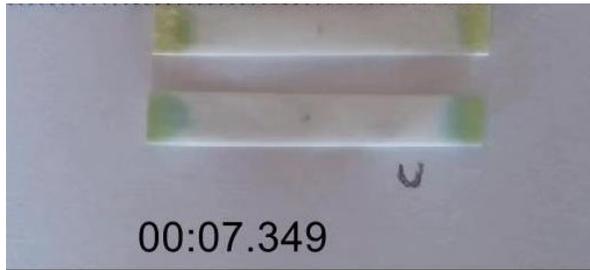
## Capítulo IV: Dispositivo Microfluídico

al de la mínima detección de albúmina por el verde de bromocresol. En el tiempo 3 ya se ha sobrepasado una concentración mínima para generar una respuesta en el marcador de verde de bromocresol de la zona de test y se aprecia un cambio más notorio en la zona. Esto sucede para la zona de control en el tiempo 4, donde ya se ha alcanzado niveles de concentración de albúmina adecuados para generar un cambio de color y se aprecia el inicio de la coloración en esa zona. La diferencia de tiempo entre el inicio de la coloración de una zona y la otra es producto de los coeficientes de difusión de cada una de ellas, siendo mayor el de la zona de test. Por último, se aprecia en el tiempo 5 el instante donde la zona de control alcanza un cambio de color completo, logrando un estado similar al de la tira reactiva comparativa que se ve en cada imagen en la zona inferior.

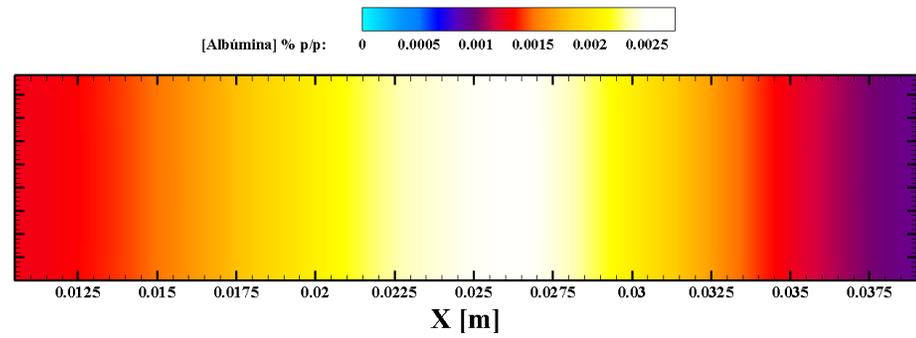
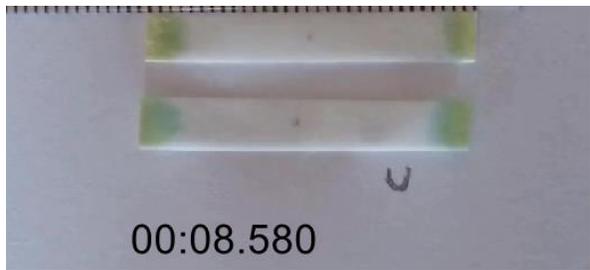
Tabla 3 Comparativa de la situación experimental y la simulación computacional para cinco tiempos diferentes.

| Tiempo | Situación Experimental  | Simulación Computacional   |
|--------|---|--|
| 1      |  <p>00:03.021</p>  |  <p>[Albumina] % p/p: 0 0.0005 0.001 0.0015 0.002 0.0025</p> <p>X [m]</p>  |
| 2      |  <p>00:06.834</p> |  <p>[Albumina] % p/p: 0 0.0005 0.001 0.0015 0.002 0.0025</p> <p>X [m]</p> |

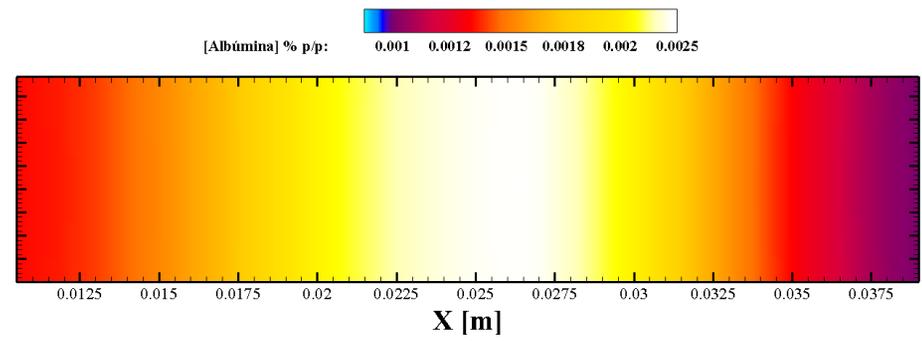
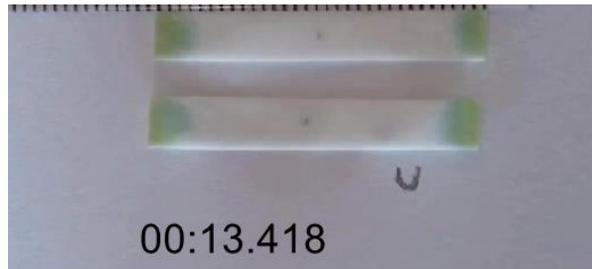
3



4



5



---

Fuente: Propia.

### 4.3 FABRICACIÓN Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Uno de los objetivos de esta tesis es desarrollar micro-dispositivos, capaces de poder detectar la presencia de proteína en muestras de orina humana.

En el apartado anterior se explica a grandes rasgos, y, se documentan los resultados, del experimento realizado para la detección de albúmina en papel de filtro, en una configuración de una tira reactiva predeterminada. En el presente apartado, se explica el proceso de fabricación en detalle. También, se expondrá otro método para la fabricación de este tipo de dispositivos. Este es el de inmersión en parafina derretida utilizando un molde de metal.

#### 4.3.1 Fabricación de dispositivo rectangular en papel de filtro, para la detección de albúmina en muestras de orina humana

El objetivo es determinar cualitativamente la presencia de albúmina en una muestra de orina humana. Para esto, se utilizará la técnica del verde de bromocresol. Los materiales para la realización experimental se describen en el anexo B1:

Las dimensiones de las tiras reactivas fabricadas son las siguientes:

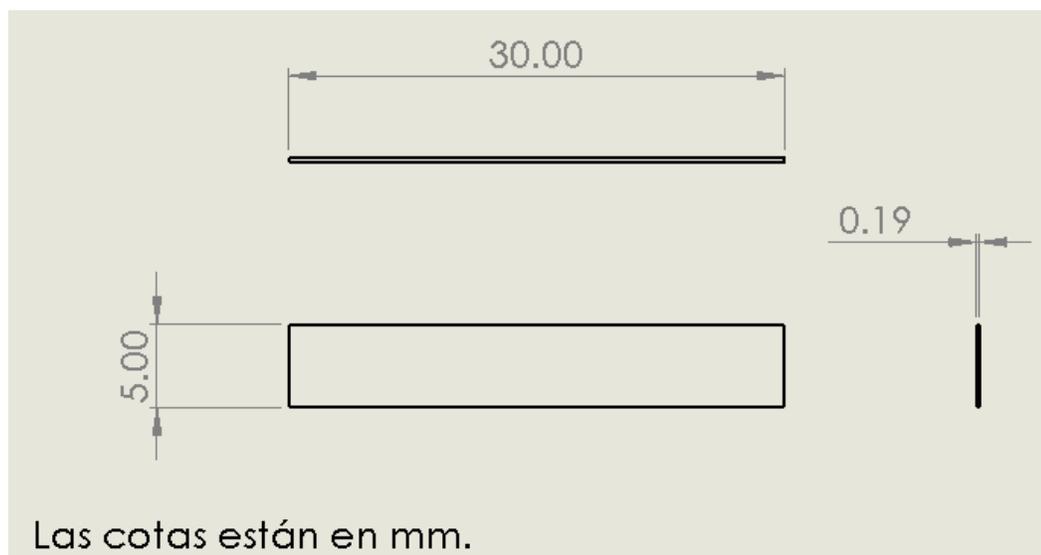
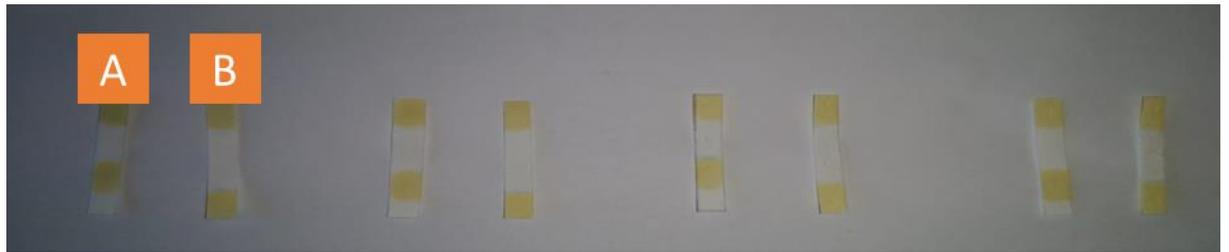


Imagen 19 Dimensiones de las tiras reactivas rectangulares. Fuente propia.

## Capítulo IV: Dispositivo Microfluídico

El protocolo de fabricación se describe en el Anexo B4.



*Imagen 20 Disposición de marcaje con las configuraciones A y B. Fuente propia.*

En la imagen 20 se aprecia la configuración de marcaje de los reactivos, albúmina y verde de bromocresol, en las tiras reactivas, según el esquema descrito en la imagen 9.



*Imagen 21 Parejas de tiras reactivas impregnadas con verde de bromocresol y albúmina de suero bovino, según las configuraciones A y B. Fuente propia.*

En la imagen 21 se muestran cuatro parejas de tiras reactivas. La n°1 será probada con 30 $\mu$ l de una muestra de orina, la n°2 con 60 $\mu$ l de muestra y la n°3 con 120 $\mu$ l de muestra, mientras que la n°4 será probada con 30 $\mu$ l de agua bidestilada.



*Imagen 22 Cambio de color en parejas de tiras reactivas, producto de la difusión de la orina. Volúmenes de muestra de 30, 60, 120  $\mu$ l y control con agua bidestilada. Fuente propia.*

En la imagen 22 se aprecia que, una vez depositada la muestra de orina en cada de una de las parejas, el frente húmedo alcanzó el extremo contrario de la disposición A (imagen 20), y ambos extremos partiendo desde el centro de la disposición B (imagen 20), en un tiempo de 25.54 segundos, 20.28 segundos y 06.12 segundos para las parejas de tiras reactivas 1, 2 y 3 respectivamente. En las parejas de tiras reactivas 1, 2 y 3 mostradas en la imagen 22, se aprecia un intenso cambio de color desde verde a azul, producto del contenido de albúmina de la muestra de orina. Mientras que, en la cuarta pareja de tiras reactivas, el cambio es mucho menor debido a que, sólo reaccionó el contenido de albúmina, depositado en la zona de control, que fue desplazado por la muestra de agua bidestilada. Los ensayos fueron realizados sobre papel de parafina para proveer una superficie hidrofóbica y evitar derrames.

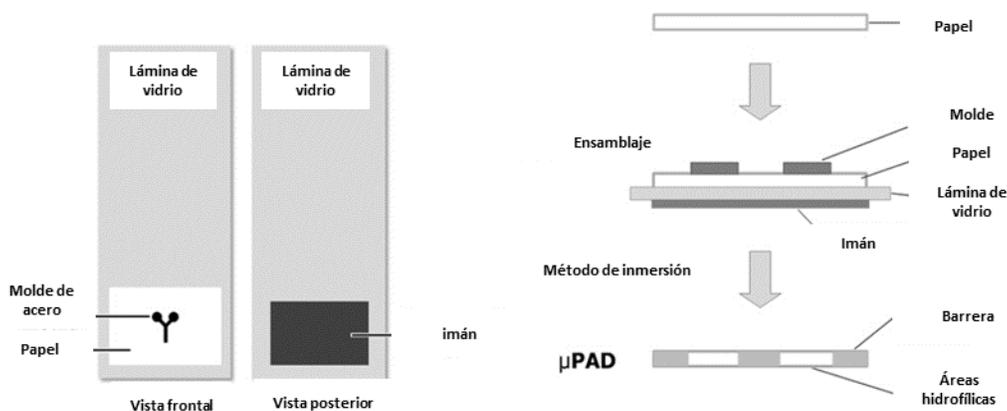
#### **4.3.2 Fabricación de $\mu$ PAD a través de inmersión en parafina, para la detección de albúmina en muestras de orina humana**

Se ha producido un auge en el desarrollo de nuevos métodos para la fabricación simple y de bajo costo de microdispositivo como los  $\mu$ PADs [64]. Ya que, este tipo de dispositivos,

representa una excelente herramienta alternativa para el diagnóstico de enfermedades en países en vías de desarrollo [65].

En este sentido, se busca aplicar, un método de fabricación basado en la inmersión de papel de filtro en parafina [66], para fabricar microcanales en el sustrato. Luego, se realizan ensayos cualitativos en las configuraciones desarrolladas y se muestran y analizan los resultados.

La metodología de trabajo es la siguiente. Sobre una lámina de vidrio se coloca el papel de filtro, la cual es la superficie hidrofílica, donde se producirá la difusión de la muestra. Luego, se coloca el molde de metal ferroso, que tiene la forma de la configuración deseada, encima del papel. Después, por detrás del vidrio se coloca el imán. En presencia del campo magnético del imán, se imantará el molde metálico, uniendo así todo el sistema. Finalmente, se sumerge al sistema, dentro de la parafina, previamente derretida, por 1 segundo. Esto creará una superficie hidrofóbica en el papel, por todo el contorno de la geometría metálica, creando así microcanales en el sustrato y el dispositivo microfluídico. El esquema es el siguiente:



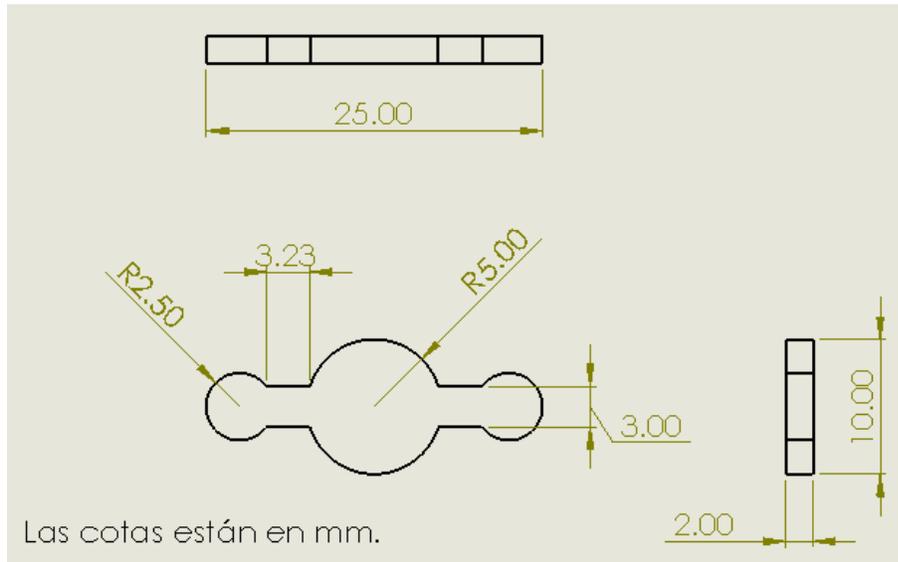
*Imagen 23 Esquema que explica el procedimiento para aplicar el método de fabricación por inmersión de parafina. Adaptado de [50].*

Los materiales utilizados fueron los siguientes utilizados para la fabricación se describen en el anexo B2.

Para el molde metálico se diseñaron seis geometrías diferentes. Estas geometrías fueron diseñadas para probar diferentes configuraciones de μPAD, con diferentes dimensiones de

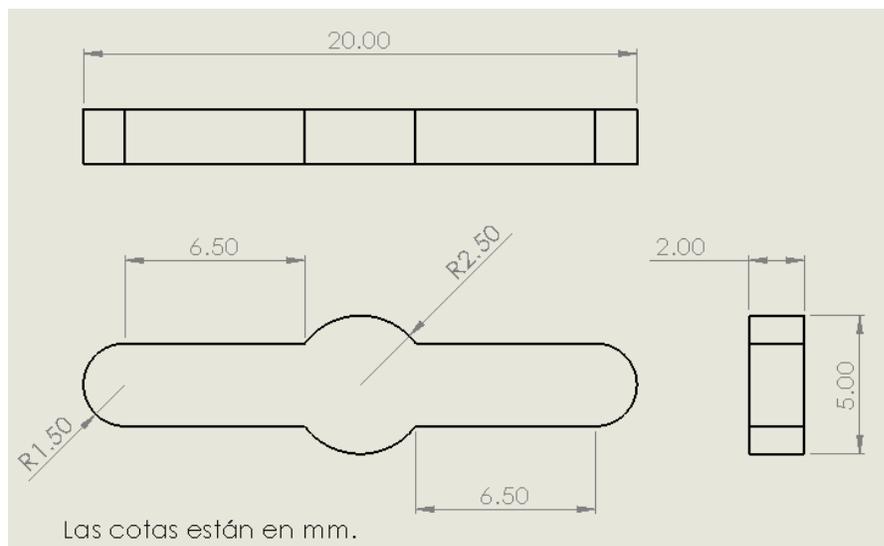
## Capítulo IV: Dispositivo Microfluídico

microcanales, zonas de test, muestra y control. La configuración de las zonas de marcaje se muestra en la imagen 30. Las geometrías se muestran en las siguientes ilustraciones.



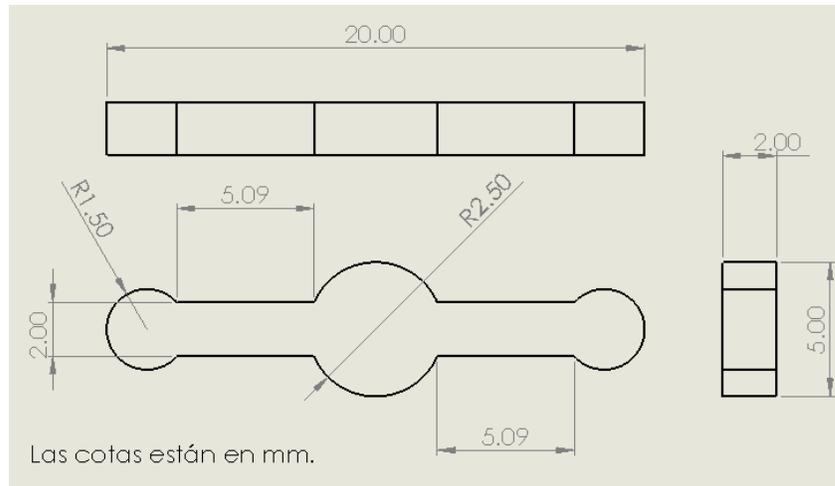
*Imagen 24 Geometría 1 para molde metálico. Fuente propia.*

En la imagen 24 se muestra la geometría n°1. En ella se busca probar zonas de test y de control de 5mm y canales de 3mm de ancho y 3,23mm de largo.



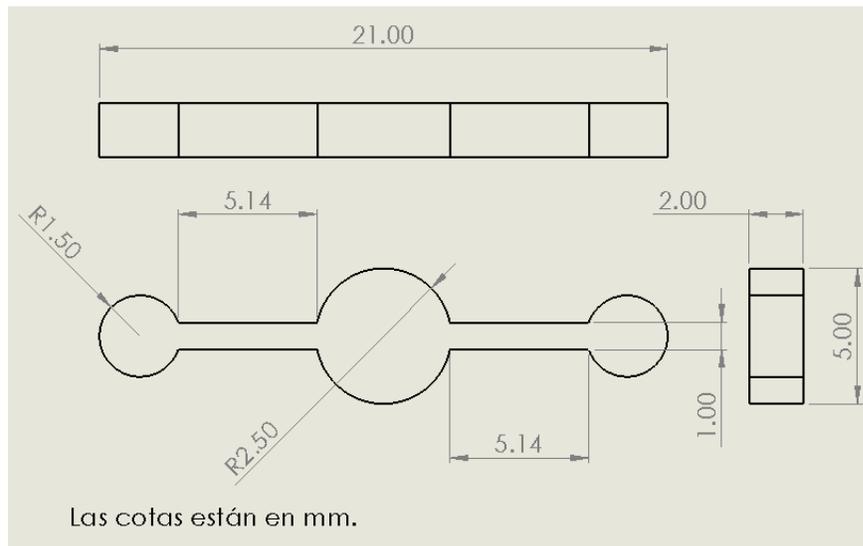
*Imagen 25 Geometría 2 para molde metálico. Fuente propia.*

En la imagen 25 se muestra la geometría n°2. En esta se busca probar zonas de muestra del mismo tamaño que el ancho del canal de 3mm, y probar canales más largos que la geometría anterior, manteniendo la misma zona de muestra.



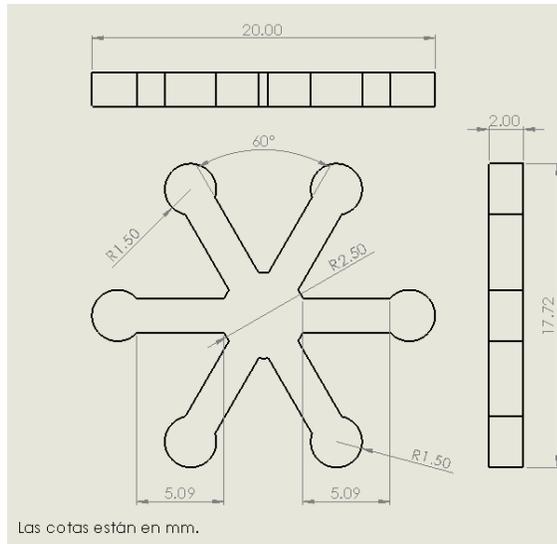
*Imagen 26 Geometría 3 para molde metálico. Fuente propia.*

En la imagen 26 se muestra la geometría n°3. Con esta geometría se busca experimentar con canales más pequeños que la anterior, con 2mm de ancho. Pero manteniendo la zona de muestra de 5mm de diámetro.

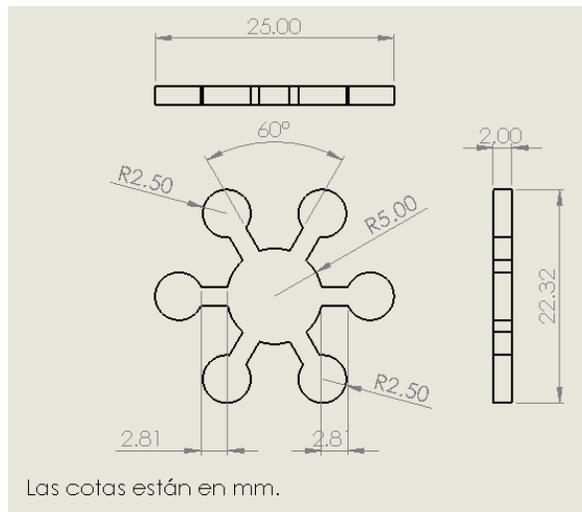


*Imagen 27 Geometría 4 para molde metálico. Fuente propia.*

La imagen 27 muestra la geometría n°4. En ella se probaron canales de 1mm de ancho, los más pequeños, y se mantuvo la zona de test de 5mm de diámetro.

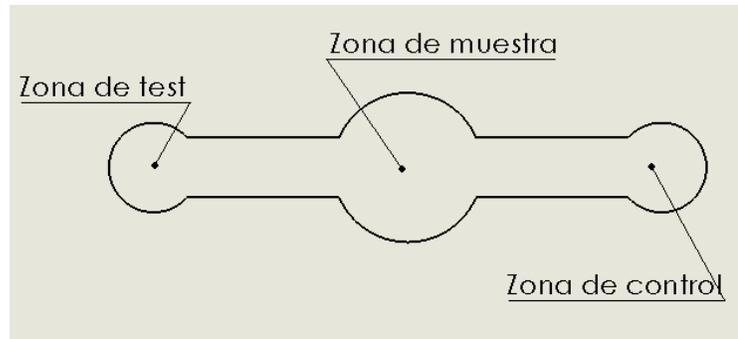


*Imagen 28 Geometría 5 para molde metálico. Fuente propia.*



*Imagen 29 Geometría 6 para molde metálico. Fuente propia.*

Las imágenes 28 y 29 muestran las dos geometrías diseñadas para fabricar  $\mu$ PAD de multi-detección. En la imagen 29, cada una de las circunferencias de 2.5mm de radio, corresponde o a una zona de test o a una de control, y la circunferencia que se encuentra frente a ella es su contraparte. Se diseñaron con diferentes largo y ancho de canal, radio de las zonas de muestra, control y test. Se busca poder realizar el mismo patrón de marcaje descrito en la imagen 30 y repetirlo tres veces. Probar este tipo de fabricación podría ayudar en pruebas posteriores para testear otras biomoléculas, por ejemplo.

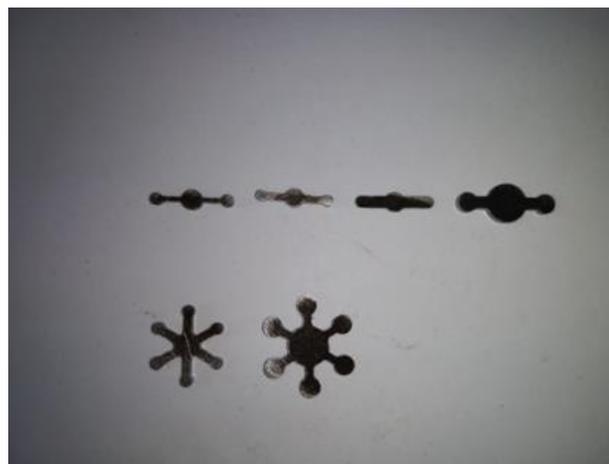


*Imagen 30 Esquema que representa el marcaje de los reactivos y la muestra en el microdispositivo. Fuente propia.*

Para obtener los moldes, se cortó un trozo de 15x15 cm de la plancha laminada de acero A36. Ver Anexo B3.

Las perforaciones se realizaron para poder colocar el material base en la sufridera del centro de mecanizado vertical CNC ROMI modelo Discovery 760. Este equipo, se encuentra en la Escuela de Ingeniería Civil Mecánica de la Universidad de Talca.

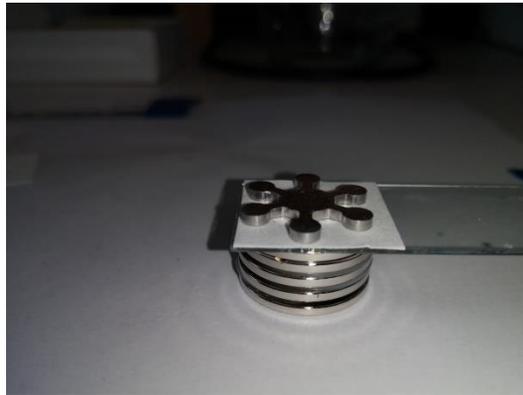
Una vez mecanizado el material y mejorado la calidad superficial de las geometrías resultantes con lima fina y lija manual para metal, el resultado se muestra en la imagen 31:



*Imagen 31 Moldes de metal resultantes. Fuente propia.*

## Capítulo IV: Dispositivo Microfluídico

En las siguientes imágenes se muestran el sistema acoplado, antes y después de la inmersión, y el resultado del microdispositivo.



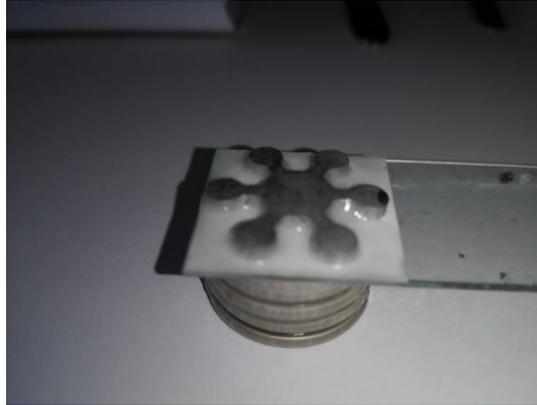
*Imagen 32 Sistema acoplado de imán, lámina de vidrio, papel de filtro y molde de metal. Fuente propia.*

En la imagen 32 se aprecia el sistema acoplado del conjunto (desde abajo hacia arriba); imán, lámina de vidrio, papel de filtro, molde metálico.



*Imagen 33 Vista superior del sistema acoplado luego de ser sumergido en parafina derretida. Fuente propia.*

En la imagen 33 y 34, se aprecia el conjunto luego de ser sumergido en el matraz con la parafina derretida, visto desde dos ángulos.



*Imagen 34 Vista lateral del sistema acoplado luego de ser sumergido en parafina derretida.  
Fuente propia.*



*Imagen 35 Cinco de las seis geometrías enfriándose para luego retirar el molde de metal correspondiente. Fuente propia.*

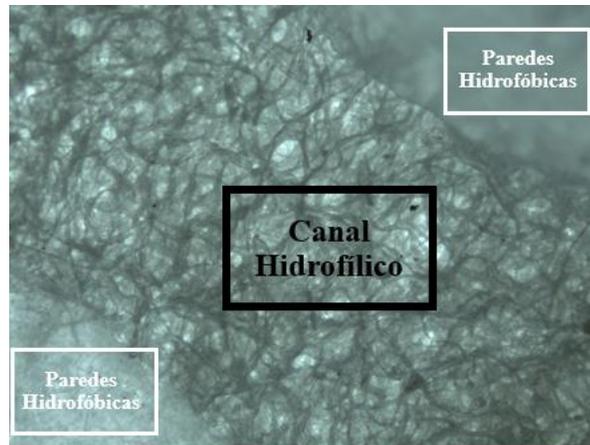
En la imagen 35 se aprecia el conjunto acoplado luego de haber sido sumergido en el matraz con la parafina derretida, de los cinco moldes metálicos que fueron probados.



*Imagen 36 Dispositivo microfluídico donde al interior de la geometría se tiene la zona hidrofílica y al exterior la zona hidrofóbica. Fuente propia.*

Una vez realizada la fabricación del dispositivo microfluídico, imagen 36, con sus microcanales definidos por la zona hidrofóbica (exterior de la geometría) y la zona hidrofílica (interior de la geometría), se procede con el testeo de las capacidades de los dispositivos creados para la detección de proteína (albúmina) en muestra de orina humana. En la imagen 37 muestra

una magnificación de los microcanales realizados, donde se aprecia las paredes hidrofóbicas hechas con parafina solidificada y el canal de papel de nitrocelulosa.



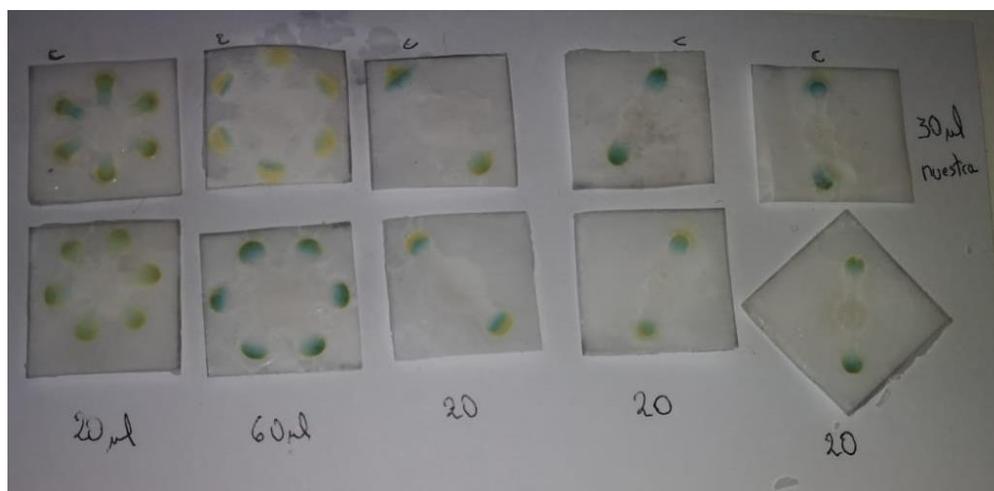
*Imagen 37 Vista con un magnificación 400X del microcanal realizado en papel de filtro de nitrocelulosa con parafina líquida. Fuente propia.*

Cabe mencionar que, de las seis geometrías mecanizadas, sólo se pudo realizar la fabricación con cinco. Esto dado que, con la geometría n°3 mostrada en la imagen 26, no se logró realizar el acoplamiento del sistema, y por tanto lograr una buena zona hidrofóbica e hidrofílica. También mencionar que el tiempo de inmersión, al igual que la temperatura de la parafina, juegan un rol fundamental en el desarrollo de los microcanales en el papel. Al igual que el tiempo de enfriamiento post inmersión. Idealmente debe dejarse enfriando con el imán unido al sistema. Importante también es desacoplar al sistema con cuidado, evitando así que la superficie del papel

#### Capítulo IV: Dispositivo Microfluídico

deje de ser plana, dado que la parafina lo endurece y toma así formas irregulares producto de la acción de alguna fuerza hecha por el operador sobre él.

Finalmente se realiza el procedimiento experimental en los dispositivos microfluidicos resultantes, y así ver la factibilidad y capacidad de estos para detectar cualitativamente la presencia de albúmina en la muestra de orina.



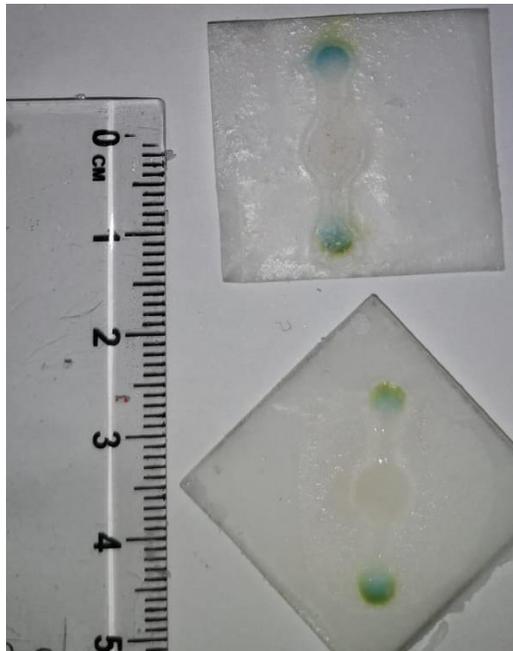
*Imagen 38 Prueba de detección con las cinco geometrías resultantes. En la fila superior se probó con 30 µl de orina, en la inferior con 20 y/o 60µl. Fuente propia.*

Las geometrías fueron marcadas con la configuración de zona de test y de control anteriormente descrita. En la zona de test se depositó 3µl de la solución de verde de bromocresol, al igual que en la zona de control. Mientras que en el microcanal, que une la zona de muestra con la zona de control, se depositaron 2 µl de la solución de albúmina de suero bovino. También se aprecia que fue marcado con una “c” la circunferencia correspondiente a la zona de control. En la fila inferior, la zona de control es idéntica a la superior. En la fila superior, que muestra la imagen 38, se depositaron 30 µl de la muestra de orina humana. En la segunda geometría de izquierda a derecha, la geometría n°6, que se muestra en la imagen 29, fue la única donde no se produjo una reacción de cambio de color del amarillo al verde con tintes de azul, como ocurre en las otras geometrías. Esto es debido a que, las dimensiones de la geometría son superiores al alcance de la difusión de la orina y el volumen depositado es incapaz de alcanzar las zonas de control y test correctamente. Con respecto al resultado en las otras geometrías, fueron satisfactorias para 30µl de muestra, por lo que en la fila inferior se probó con un volumen menor. El volumen seleccionado

## Capítulo IV: Dispositivo Microfluídico

para todas las geometrías, a excepción de la n°6, fue de 20  $\mu\text{l}$ . En ellas se produjo un cambio de color, aunque en menor medida. Esto se puede apreciar comparando la geometría n°5, que se muestra en la imagen 28, de la fila superior con la de la fila inferior, por ejemplo. En la segunda iteración de la geometría n°6, se probó con el doble de volumen de muestra, 60  $\mu\text{l}$ , apreciándose así que el cambio de color fue logrado perfectamente, alcanzado tonalidades de verde y azul. El límite de detección para esta geometría debe estar entre los 30 $\mu\text{l}$  - 60  $\mu\text{l}$  de orina humana.

En la imagen 39, se muestra la comparación del cambio de color asociado a la cantidad de volumen de muestra depositado. En el dispositivo superior fue depositado 30 $\mu\text{l}$ , mientras que en el inferior se depositó 20 $\mu\text{l}$ .



*Imagen 39 Primer plano de la geometría n°3, después de realizada la prueba de detección de proteína con 30  $\mu\text{l}$  y 20  $\mu\text{l}$  respectivamente. Fuente propia.*

## **CAPÍTULO V: DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL EQUIPO**

### 5.1 GENERALIDADES

En este capítulo se documentan las propuestas de diseño realizadas para dar solución a la problemática inicial. Se detallan los criterios que fueron utilizados para cada propuesta, los diseños 3D de los elementos elaborados con el software SolidWorks y sus respectivos componentes electrónicos.

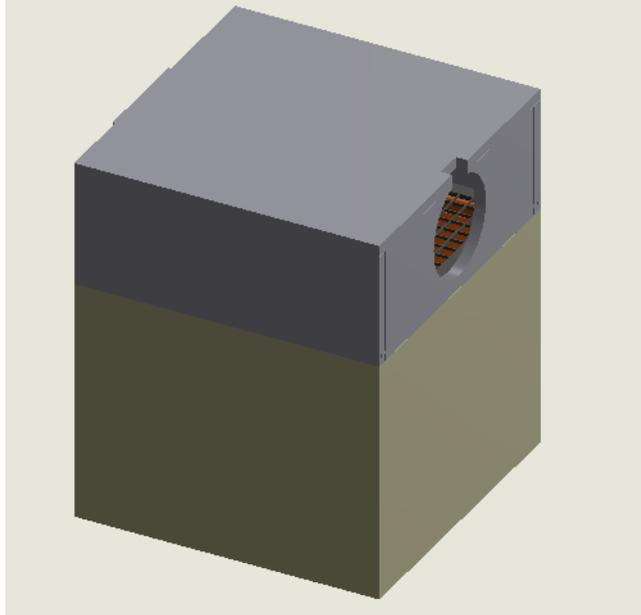
El desafío propuesto, trata de realizar pruebas para la verificación de la presencia de proteínas en muestras de orina de ratones vivos silvestres (familia Cricetidae), en condiciones de terreno (fuera del laboratorio). Por esto se requiere, en primera instancia, capturar al ratón y mantenerlo vivo durante un determinado periodo de tiempo, para coleccionar la muestra de orina necesaria. Este periodo de tiempo debe ser el necesario para coleccionar el volumen de muestra requerido, que es de un mínimo de 30 $\mu$ l, como se expuso en el capítulo anterior. Según los métodos de colección documentados en el capítulo 3, es posible coleccionar este volumen en un periodo no mayor a 8 horas. Apresar al animal durante este periodo, debe regirse según los protocolos de bienestar animal, para prevenir situaciones que puedan aumentar los niveles de estrés o de ansiedad de este.

Otro punto es que la colección de orina debe ser eficiente y prevenir la contaminación de la muestra. Por último, una vez realizado el test se debe detectar/leer el resultado y debe ser enviado de manera remota.

### 5.2 PROPUESTA DE DISEÑO 1° PROTOTIPO

Según lo anteriormente descrito se propuso el diseño de un sistema de trampeo para ratones vivos de pequeña envergadura, basado en una jaula metabólica para la separación y colección de orina y heces (imagen 40). Muchos de los métodos descritos en el capítulo 3 requieren la intervención humana, por esto se optó por utilizar un diseño similar al de una jaula metabólica, al ser más sencillo poder incorporar un sistema de captura y utiliza la filtración por gravedad. Por otro lado, el requerir una pequeña muestra de orina se traduce en un menor tiempo en que el roedor debe estar dentro del equipo, por lo que el tipo de piso no representará un inconveniente para realizar pruebas con animales en ambiente controlado ni en terreno.

**Vista trimétrica del prototipo 1.**



*Imagen 40 Vista trimetrica del diseño del prototipo 1. Fuente propia.*

Este sistema consta de dos niveles: el nivel superior de color gris en la imagen 40, donde se captura y mantiene al roedor durante el tiempo necesario para la colección de la muestra de orina. Y el nivel inferior de color verde, que protege los componentes de separación y colección de orina, como también los componentes electrónicos.

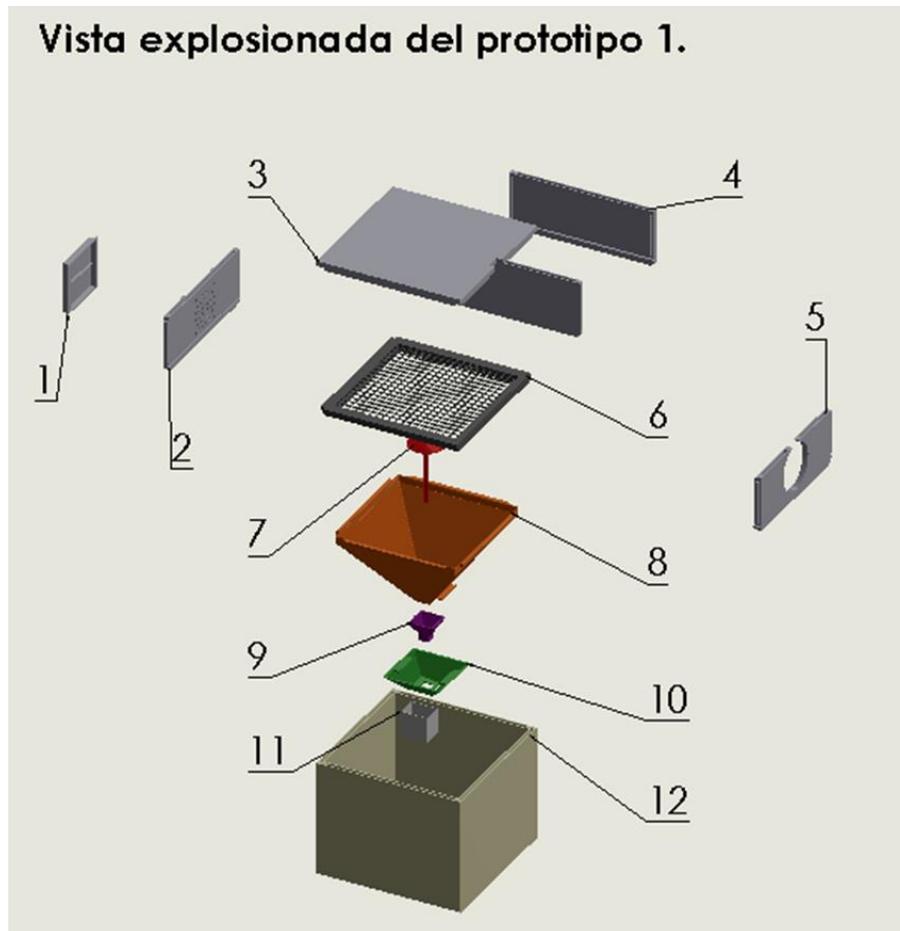


Imagen 41 vista explosionada del diseño del prototipo 1. Fuente propia.

### 5.2.1 Diseño 3D de componentes

En la imagen 41, se aprecian rotulados todos los componentes del diseño de este prototipo.

Estos son:

- 1 compartimiento del cebo
- 2 muro trasero nivel superior
- 3 techo del nivel superior
- 4 muros laterales nivel superior
- 5 muro frontal nivel superior
- 6 piso nivel de superior (rejilla)
- 7 dispositivo para el rebote de la orina y la feca
- 8 embudo colector A
- 9 embudo colector B

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

- 10 embudo colector C
- 11 receptáculo de feca
- 12 muros nivel inferior

Se puede apreciar con más detalle cada uno de estos componentes en el Anexo C1.

En el interior del nivel superior se tiene un piso de malla (10x10 mm de grilla), referencia 6 de la imagen 41. Se determinó esta área de piso según los parámetros mínimos de espacio para que el roedor manifieste y exprese un comportamiento normal dentro del nivel de trampeo [67]. Los muros, paredes y el techo del nivel superior, se diseñaron con un sistema de pestañas para las uniones, con el fin de proporcionar un armado sencillo, rápido y también para no requerir elementos de unión de estructuras como pernos, por ejemplo. Estas pestañas también están incluidas en la unión del piso con el nivel superior y, entre el nivel superior e inferior. Inserto en el exterior del muro trasero se dispuso un compartimiento para el cebo (referencia 1 de la imagen 41). También en el muro trasero se realizaron perforaciones para permitir que el ratón pudiera detectar al cebo mediante el olfato. Por lo general son utilizados como cebo alimentos dulces altamente calóricos como la mantquilla de maní o miel de abejas y la aerolización de estos aromas puede atraer a estos animales. Por otro lado, como los roedores tienen una dieta basada en plantas y semillas un puñado de estas también podría atraerlos. Finalmente, el uso de feromonas, que es una señal química específica de cada especie se muestra como una opción más segura que logre atraer a la especie indicada y no a otras al haber utilizado como un cebo algún tipo de alimento [68].

En el nivel inferior, se encuentra el sistema de separación de orina y heces. Este se compone de 3 embudos (A, B y C). El funcionamiento es el siguiente; El embudo A (referencia 8 de la imagen 41) colecta toda la orina y heces que caen a través del piso del nivel superior. Justo en el centro del embudo A, se encuentra el dispositivo de rebote (referencia 6 de la imagen 41), el que evita que la orina caiga en el embudo B (referencia 9 de la imagen 41) y luego en el colector de heces. Este, también tiene la función de permitir que la orina se deslice entre el embudo A y B permitiendo que llegue al embudo C (referencia 10 de la imagen 41). Este embudo tiene la función de coleccionar toda la orina y depositarla en el vaso colector de orina. Para proveer la superficie adecuada para el deslizamiento del fluido en las paredes, los embudos deberían estar fabricados de materiales como porcelana o vidrio con un ángulo de inclinación de 58° a 60°, siguiendo las

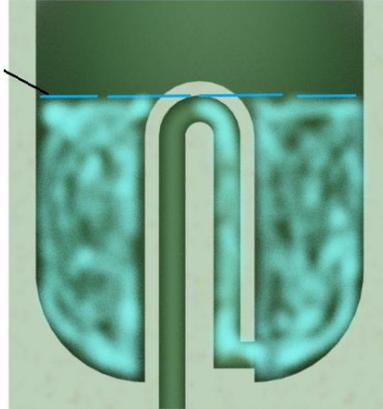
## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

especificaciones ASTM E1095 [69]. Para la fabricación de este prototipo se utilizó PLA y luego se realizó un tratamiento de baño de acetona para lograr un acabado más suave y permitir un mejor deslizamiento de la orina.



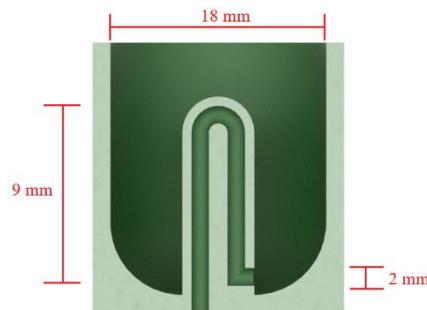
*Imagen 42 Vista en corte del vaso de Pitágoras. Fuente propia.*

El vaso colector o vaso de Pitágoras, es un dispositivo que está diseñado para dejar escapar todo el fluido en su interior una vez este haya alcanzado cierto nivel. Este sigue la ley de los vasos comunicantes de Pascal y cuando el nivel de fluido en el vaso es superior al de la columna interior, se produce un efecto de sifón dentro de la columna interna, dejando escapar todo el fluido a través de ella. En la imagen 42 se puede apreciar una vista en corte de este dispositivo. Este vaso se diseñó para vaciar su contenido cuando se colecte 1000  $\mu\text{l}$ . El volumen máximo que es capaz de coleccionar este dispositivo antes de vaciar su contenido se muestra en la imagen 43. El volumen interno del cuerpo del vaso de Pitágoras se calculó utilizando el software SolidWorks con la herramienta “Intersect” y creando dos planos de referencia uno en la entrada del fluido y otro en la salida. Así se generó un nuevo sólido al que se le calculó el volumen, obteniéndose un valor de 5071.5  $\mu\text{l}$ .



*Imagen 43 Nivel de vaciado del vaso de Pitágoras. Fuente propia.*

También se determinó el tiempo de vaciado del fluido en el vaso en este dispositivo. El procedimiento fue desarrollar una ecuación diferencial de primer orden para determinar el tiempo de vaciado utilizando el teorema de Torricelli y condiciones iniciales que relacionen el caudal de salida con la altura del volumen de fluido en función del tiempo. La imagen 44 muestra las consideraciones iniciales en el modelo.



*Imagen 44 Consideraciones de las dimensiones para el cálculo del tiempo de vaciado del contenido del vaso de Pitágoras,  $h=9\text{mm}$  corresponde a la altura máxima que alcanza el fluido antes de escurrir,  $D=18\text{mm}$  es el diámetro interior de todo el cuerpo y  $d=2\text{mm}$  es el diámetro de salida del fluido. Fuente propia.*

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

El desarrollo fue el siguiente:

### 5.2.1.1 Aplicación del Teorema de Torricelli para hallar la velocidad de salida del fluido

$$v_{salida} = C\sqrt{2gh}$$

Donde

$C$  = Coeficiente de descarga y es igual a 0.65 para líquidos de baja viscosidad

### 5.2.1.2 Condiciones iniciales

$$h(t); h(0) = 9 \text{ mm} = 9 * 10^{-3} \text{ m}$$

### 5.2.1.3 Solución ecuación diferencial de primer orden

$$\Delta V_{\text{volumen interior}} = -A_{\text{transversal entrada}} * \Delta h = A_{\text{transversal salida}} * v_{\text{salida}} * \Delta t$$

$$A_{\text{transversal salida}} * (0.65 * \sqrt{2gh}) * \Delta t = -A_{\text{transversal entrada}} * \Delta h$$

Se tendrá como consideración desde ahora que los  $\Delta$  de tiempo y altura corresponderán a diferenciales que tienden a cero. Por lo tanto:

$$\frac{dh}{dt} = \frac{-0.65 * A_{\text{transversal de salida}} * \sqrt{2gh}}{A_{\text{transversal entrada}}}$$

$$\frac{dh}{dt} = -k * h^{1/2}; \text{ con } k = \frac{0.65 * A_{\text{transversal de salida}} * \sqrt{2g}}{A_{\text{transversal entrada}}}$$

$$h^{1/2} dh = -k dt$$

Integrando a ambos lados de la ecuación se obtiene

$$h = \left( \frac{-k * t}{2} + c_1 \right)^2$$

Utilizando el valor de la condición inicial, se puede descubrir el valor de la constante  $c_1$

$$c_1 = \pm 0.0948$$

Por lo tanto, la ecuación que define la altura  $h(t)$  queda determinada por:

$$h(t) = \left[ \frac{-k * t}{2} + 0.0948 \right]^2$$

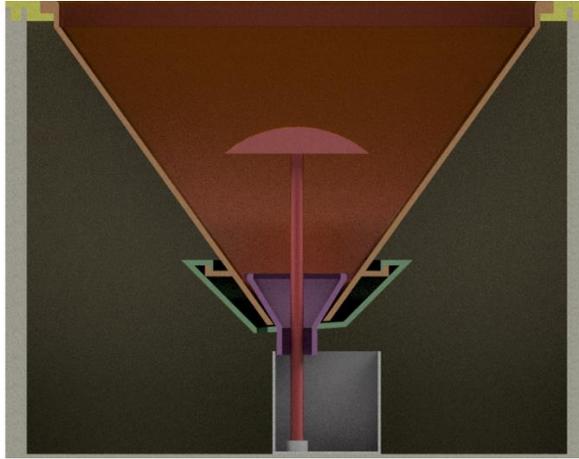
Reemplazando para  $h(t) = 0$  se tiene que el valor del tiempo de vaciado es

$$t = 5.334 \text{ segundos}$$

$$\dot{Q} = \frac{\Delta \mathcal{V}_{\text{volumen interior}}}{\Delta_t} = \frac{1000 \mu\text{l}}{5.334 \text{ seg}} = 187.47 \frac{\mu\text{l}}{\text{seg}}$$

Así se obtuvo el caudal y el tiempo de vaciado del último diseño del vaso de Pitágoras. Se optó por el desarrollo de este componente porque la idea era buscar alternativas que no generaran un consumo energético. Se pensó en utilizar sensores para medir el nivel de fluido en un recipiente y cuando se haya logrado el nivel deseado, controlar la salida de fluido mediante una compuerta, por ejemplo. Para este sensor se disponían de tres alternativas; Control de nivel de agua con un microcontrolador conectado a una resistencia y dos cables, sensor de ultrasonido y sensor de señal análoga de humedad. Estas ideas fueron descartadas luego de realizar iteraciones en la fabricación del vaso de Pitágoras, probando diferentes diámetros externos y de la columna interna, al igual que el del canal interior de la columna que actúa como sifón.

Un detalle en el embudo C es que el piso de este tiene una ligera inclinación de  $15^\circ$  desde la horizontal. Esto se hizo para que la orina pudiera escurrir en él y no quedar acumulada en algún rincón dentro de este embudo.



*Imagen 45 Vista en corte del sistema de colección y separación de orina y heces. Fuente propia.*

En la imagen 45 se puede apreciar una vista del ensamblaje del sistema de colección y separación de orina y heces.

### 5.2.2 Componentes electrónicos

El diagrama de flujo de la imagen 46 ejemplifica los pasos a seguir por el código para la propuesta del prototipo 1.

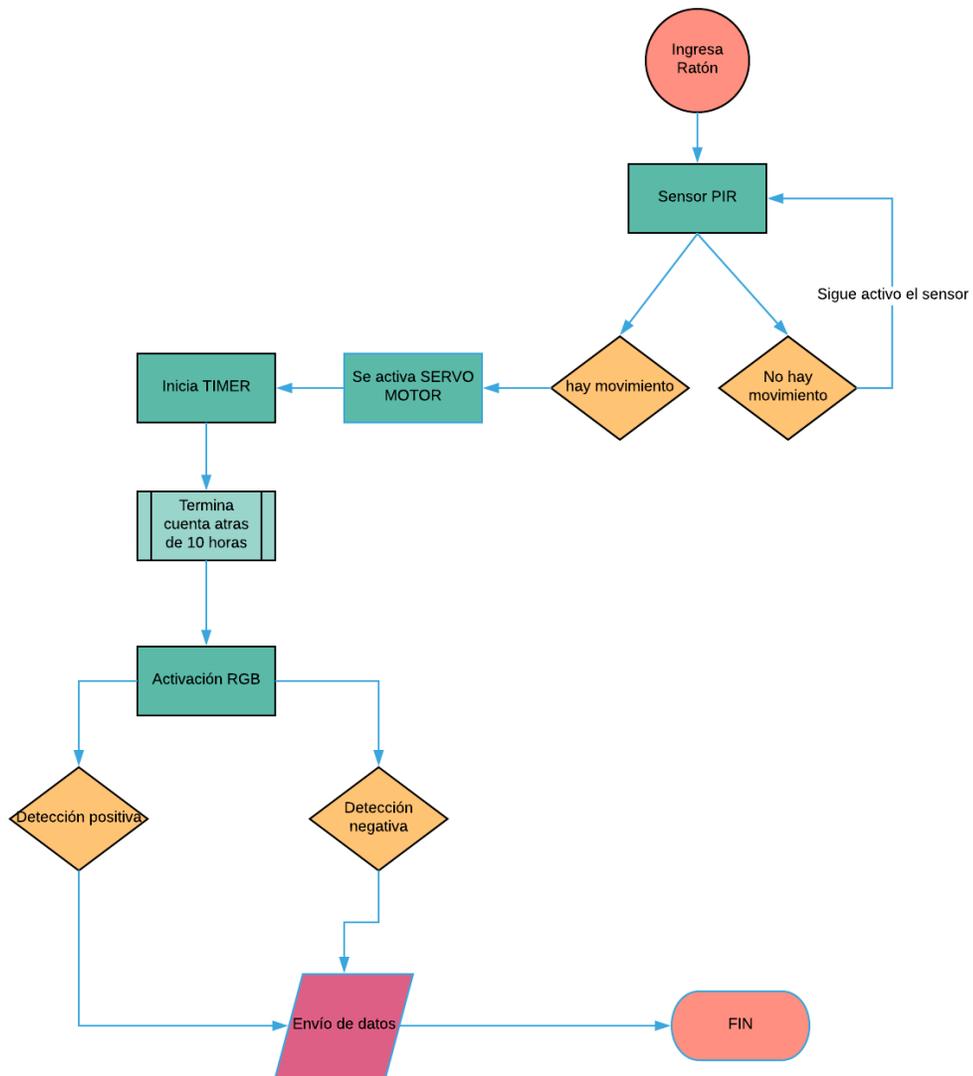


Imagen 46 Diagrama de flujo de programación. Fuente propia.



*Imagen 47 Arduino Pro Mini [70].*

Para dar solución al problema se determinó integrar componentes electrónicos al dispositivo. Ya que uno de los objetivos fue el de diseñar y fabricar un dispositivo automatizado y que enviara los resultados de manera remota a una base de datos. Para lograr esto, fue necesario incorporar microcontroladores, módulo de IoT y sensores electrónicos. Se utilizó la plataforma para prototipos electrónicos Arduino, específicamente el modelo Arduino Pro Mini que se muestra en la imagen 47. La característica primordial de esta es que está basada en hardware y software flexibles y fáciles de usar, a parte que es open-source o de código abierto. Esto significa que tiene una licencia que permite a los usuarios tener acceso al código fuente del software y que puede ser estudiado y/o modificado sin ninguna restricción en el uso del mismo, con la posibilidad de poder redistribuirlo siempre que se cumplan con los términos de la licencia con la que fue adquirido.

El sistema inicia con el ingreso del ratón a la trampa. El sensor de infrarrojo pasivo (PIR) que está dispuesto dentro de la trampa, detecta el movimiento del ratón, cuando este se encuentre cerca del cebo. Este tipo de sensores se basan en la medición de la radiación infrarroja y disponen de un sensor piezo eléctrico capaz de captar esta radiación y convertirla en una señal eléctrica (imagen 48).

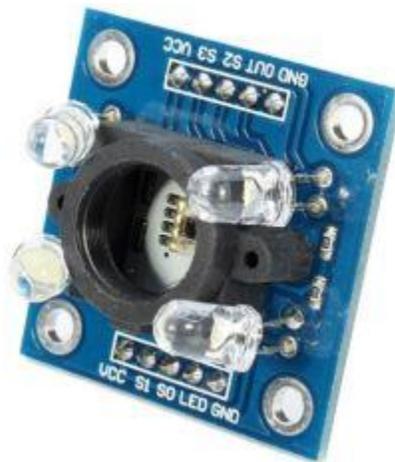


*Imagen 48 Sensor PIR [71].*

Si este sensor detecta movimiento, activa un servo motor (imagen 49) que cierra la puerta de la trampa, dejando al ratón dentro. Luego, inicia el TIMER que es un temporizador de tiempo para un total de 4 a 8 horas. Terminado este tiempo, que se asume es el necesario para poder coleccionar la muestra de orina, se enciende el sensor RGB (imagen 50) que es un sensor óptico que permite detectar el color de un objeto ubicado en frente de él. Éste está formado por una matriz de fotodiodos de silicona junto con un conversor de frecuencia, en un único integrado CMOS.



*Imagen 49 Servo motor MG90S [72].*



*Imagen 50 Sensor RGB TSC 3200 [73].*

Para poder detectar un rango acotado del color que se muestra en la tira del test de flujo lateral, se determinaron rangos para los parámetros R, G y B. Estos se muestran en la tabla 4.

*Tabla 4 Rango de los parámetros RGB*

| Parámetros | R       | G    | B       |
|------------|---------|------|---------|
| Rangos     | 130-180 | 5-70 | 144-250 |

Fuente: Propia.

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

Se definió el Sketch con el nombre “código completo” el que contiene la declaración de variables, void Setup y void Loop de la programación. Las funciones individuales se definen en pestañas separadas. Esto se muestra en el Anexo C2. Los datos técnicos de los sensores se muestran en el anexo C8.

### 5.2.3 Fabricación

Para esta propuesta de diseño se fabricó un mockup con materiales de bajo costo y de rápida fabricación. Para esto, se cambió el sistema de pestañas por un método alternativo de uniones tipo dovetail (cola de pato), que es un tipo de unión especial que elimina la necesidad de elementos de sujeción. El resultado de la fabricación de este prototipo se puede ver en el Anexo C3. Los siguientes materiales fueron utilizados para la fabricación:

*Tabla 5 Lista de materiales de fabricación de la estructura de la 1° propuesta de diseño*

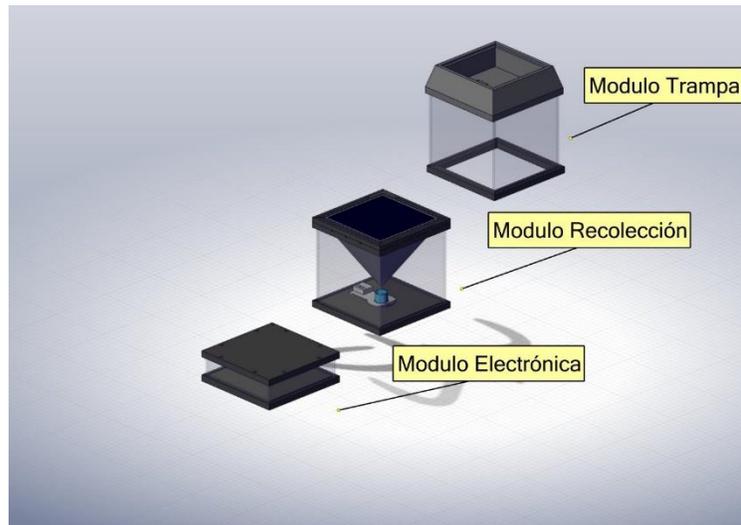
| Materiales utilizados            | Descripción                      |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Madera MDF 3mm                   | Muros y bases                    |
| Malla acero inoxidable n°20 ASTM | Piso Jaula                       |
| PLA 1.75mm                       | Colección y detección de muestra |
| Resina estándar Clear V2         | Colección y detección de muestra |

Fuente: Propia.

En el Anexo C4 están documentados los archivos esquemático y board del prototipo 1. Estos archivos fueron diseñados utilizando el software EAGLE de Autodesk y fabricados utilizando el software BANTAM TOOLS con el equipo de control numérico CNC Othermill de la misma compañía.

### 5.3 PROPUESTA DE DISEÑO 2° PROTOTIPO

En esta propuesta de diseño se mantienen los lineamientos de la versión anterior, pero se agregaron/modificaron algunos componentes. Una de las modificaciones fue agregar el concepto de modularidad al dispositivo (imagen 51). Este consiste en separar los componentes en diferentes niveles, de una forma que permita su rápida unión y desacoplamiento. Este diseño se basa en la modularización de espacios y componentes que permitan optimizar el tiempo de construcción, obtener las características de ser transportable, desarmable y reorganizable permitiendo así impulsar múltiples funcionalidades, como la incorporación de otros equipos comerciales de trapeo que reemplacen al que se diseñó, y su reutilización al generar nuevos usos diferentes al que fue fabricado, como por ejemplo, la captura de diferentes vectores y la subsecuente detección de otro virus. Se mantuvo el nivel de captura del roedor (módulo trampa) y el nivel de separación y colección de la muestra (módulo recolección), pero se agregó un nuevo nivel que contiene y separa la electrónica (módulo electrónico) del resto de componentes. En la imagen 52 se aprecia una vista general del diseño del prototipo 2.



*Imagen 51 Concepto de modularidad. Fuente propia.*



Imagen 52 Vista isométrica del diseño del prototipo 2. Fuente propia.

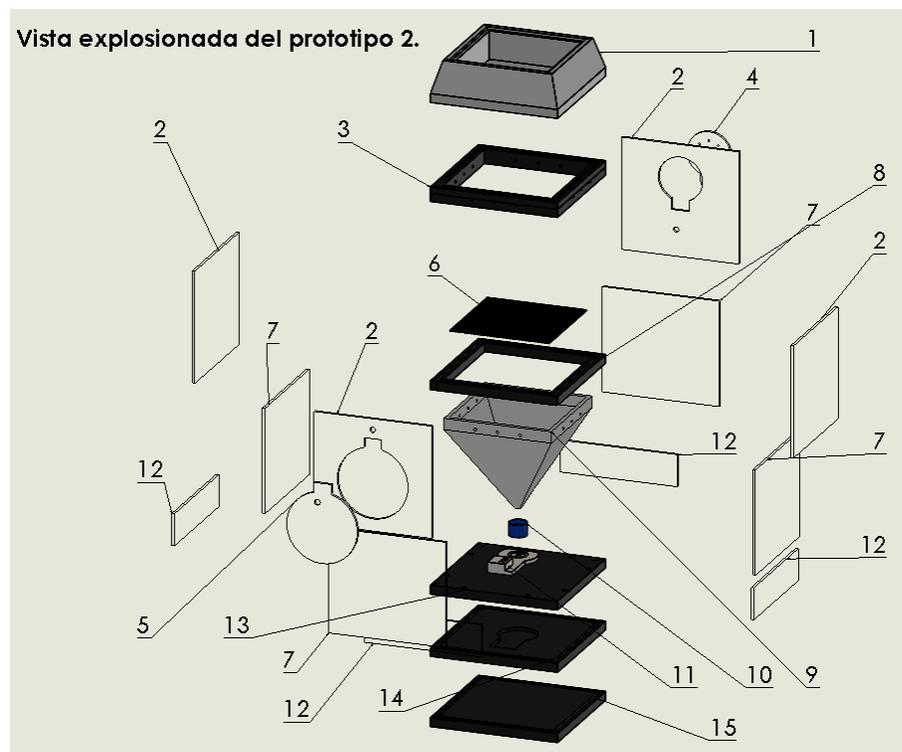


Imagen 53 vista explosionada del prototipo 2. Fuente propia.

### 5.3.1 Diseño 3D de componentes

En la imagen 53, se aprecian rotulados todos los componentes del diseño de este prototipo. Estos son:

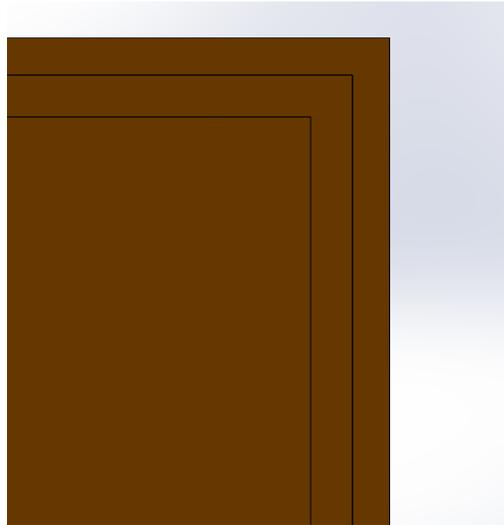
- 1 techo módulo de captura
- 2 muros módulo de captura
- 3 unión inferior módulo de captura

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

- 4 puerta cebo
- 5 puerta de entrada módulo de captura
- 6 piso módulo de captura (rejilla)
- 7 muros módulo de recolección
- 8 unión superior muros módulo de recolección
- 9 Embudo y filtro A
- 10 Vaso de Pitágoras
- 11 Case del dispositivo microfluídico
- 12 muros módulo electrónica
- 13 unión inferior muros módulo recolección
- 14 unión superior muros módulo electrónica
- 15 unión inferior muros módulo electrónica

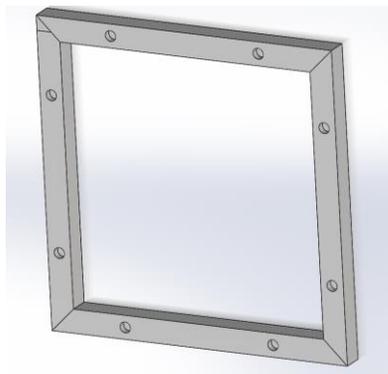
Se puede apreciar algunos de estos componentes con más detalle en el Anexo C5. El diseño de este prototipo tiene en consideración una restricción básica, la que hace referencia al espacio en la jaula (módulo de captura) para que el ratón desarrolle y exprese su comportamiento normal a pesar de estar en cautiverio. Esto se refiere a que pueda pararse en dos patas, por eso se requiere un espacio no menor a  $96,7\text{cm}^2$  aproximadamente [67]. Para dar cumplimiento a lo anterior, se definió una configuración cuadrada para el piso (referencia 6 en la imagen 53) de 13x13cm.

Para acoplar de mejor manera el diseño a la idea de modularidad, se diseñaron sistemas de acople para los muros en cada módulo utilizando muescas. Este sistema se puede ver incorporado en el techo del módulo de captura (referencia 1 de la imagen 53), como lo muestra la imagen 54.



*Imagen 54 Acercamiento de la muesca para el acople rápido de los muros en la estructura. Fuente propia.*

También fueron incorporadas muescas para imanes en las uniones superiores e inferiores de cada nivel (referencias 3, 8, 13 y 14 según la imagen 53). Esto se puede apreciar en la imagen 55.



*Imagen 55 Muecas para imanes en la unión superior del módulo de recolección. Fuente propia.*

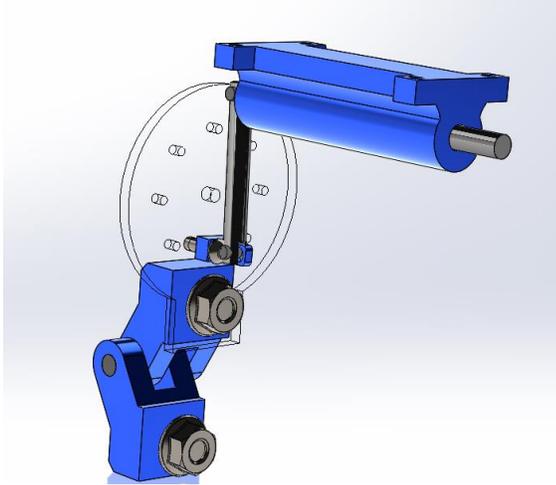
Esta característica fue incluida para aportar al fácil acoplamiento de cada uno de los módulos.

Por otro lado, se mantuvo el sistema contenedor y vaciado de orina (referencias 10 y 11 de la imagen 53), pero el sistema de colección fue reemplazado por un solo embudo y filtro A. Esto se hizo pensando en brindar otra alternativa a la propuesta anteriormente en el prototipo 1, que

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

fuera más sencilla y disminuyera las pérdidas de fluidos que se ocasionaron en las pruebas de diseño en la colecta con el diseño anterior, que podrían deberse a razones como: fabricación de los componentes impresos en 3D o ensamblaje del equipo. Los componentes del embudo y filtro A pueden verse en el Anexo C5.

Los muros del módulo de captura fueron diseñados con una altura de 13,56 cm, dada la restricción de alturas  $> 12,7\text{cm}$  para pequeños roedores [67].



*Imagen 56 Sistema de cierre puerta de cebo. Fuente propia.*

Finalmente, se muestra el sistema de cierre de puerta del cebo para el ratón en la imagen 56.

### 5.3.2 Componentes electrónicos

En este apartado también se realizaron algunas modificaciones. Primero se reemplazó el sensor PIR por un mecanismo de cierre del dispositivo. Una vez el roedor hace ingreso en busca del cebo, este se activa para liberar la puerta, dejando al animal encerrado, y también para accionar un micro switch que permite el paso de la energía eléctrica en el circuito, energizando así al microcontrolador. Una vez hecho esto, se continúa con el resto de la secuencia, la que se describe en el siguiente diagrama.

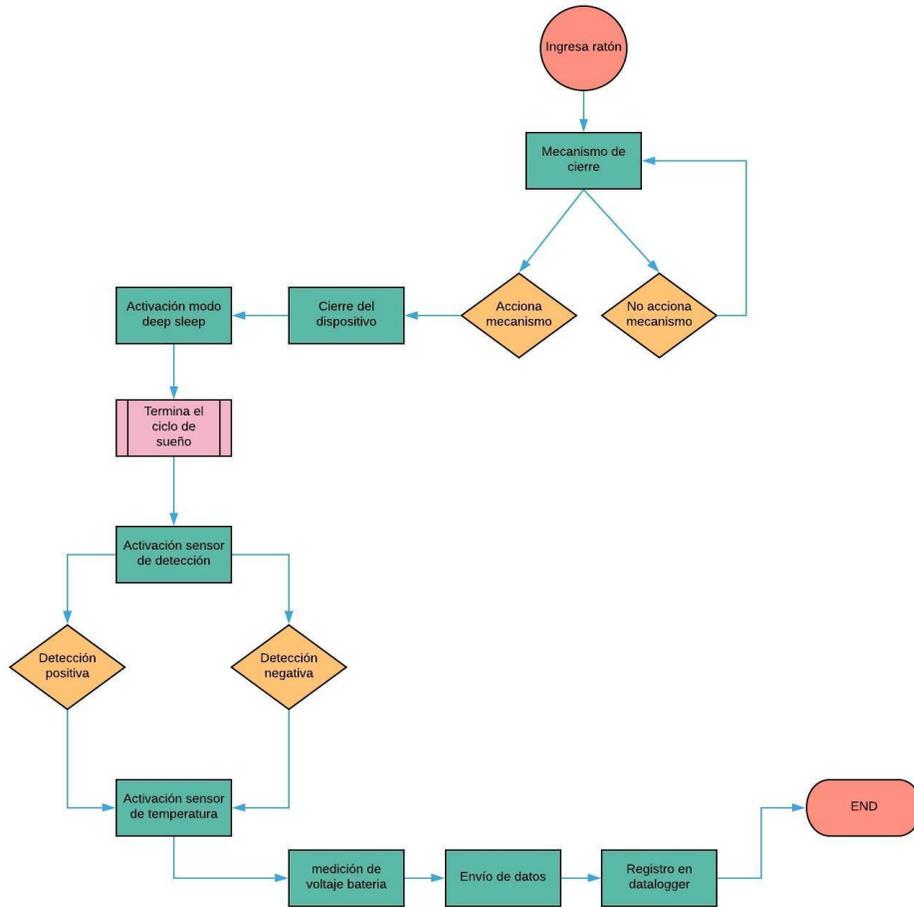
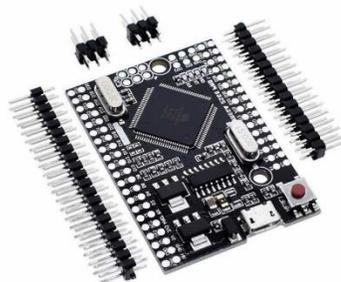


Imagen 57 Diagrama de flujo de la programación. Fuente propia.

El microcontrolador utilizado para este prototipo fue el Arduino Mega pro mini ATmega2560. Este se muestra en la imagen 58.



*Imagen 58 Mega 2560 PRO MINI AT-mega 2560 [74].*

El microcontrolador entra en modo de sueño (Deep sleep) por el periodo de tiempo necesario para coleccionar la muestra de orina necesaria, que se estima sea entre 4 a 8 horas, pero debe verificarse mediante pruebas con roedores vivos en ambiente controlado. Esta función nos ayuda a reducir el consumo del microcontrolador al ponerlo en modo sueño, produciendo en él una desconexión de un gran número de funciones. Esto es muy útil porque ayuda a prolongar la vida de la batería.

Una vez terminado este proceso, se activa el sensor que lee el resultado de la presencia o ausencia de proteína en la tira reactiva. Este es un sensor LDR que es una resistencia que varía su valor, disminuyendo o aumentando el voltaje, según la luz que incide sobre ella.

Paso siguiente, se determina la temperatura y humedad dentro del dispositivo mediante un sensor de temperatura DHT11 y se determina y registra el nivel de voltaje de la batería. Luego se realiza el envío de la información coleccionada a una base de datos online (planilla Excel) y se registra todo en el datalogger incorporado a la placa PCB del equipo.

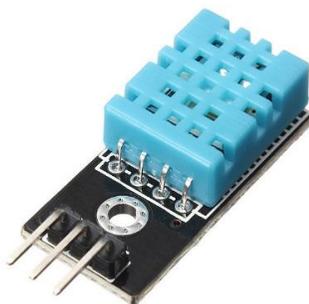
El sensor DHT11 es un sensor de humedad relativa y temperatura. Integra un sensor capacitivo de humedad y un termistor para medir el aire circundante, y proporciona los datos medidos a través de una señal digital. Este también tiene otra función importante dentro del equipo que se comenta a continuación.

### 5.3.2.1 Control del microambiente del animal

El diseño de instalaciones para animales confinados con un apropiado alojamiento y manejo son esenciales para contribuir en el bienestar del animal, la calidad de la investigación, probar nuevos programas, velar por la salud y cuidado del personal.

El microambiente de animales terrestres es el ambiente físico que lo rodea, en este caso sería la jaula o el nivel de trampeo. Este debe contener todos los recursos con los que el animal entre directamente en contacto y otorga los límites del ambiente inmediato. Algunas características del microambiente son; la iluminación, temperatura, humedad y composición del aire. El ambiente físico como un cuarto de laboratorio es el macro ambiente.

Son utilizados unos parámetros para definir la temperatura óptima para el animal, estos son: Low Critical Tempetures (LCT), Upper Critical Tempetures (UCT) y Thermo Neutral Zone (TNZ). Los dos primeros corresponden a los límites de temperatura donde peligra la vida del roedor, mientras que el TNZ es la zona termo neutral donde la termorregulación ocurre sin la necesidad de utilizar mecanismo energéticos extras. Este rango va desde los 26°C a los 34°C. El TNZ juega un rol importante ya que los roedores escogen temperaturas menores a los 26°C, menor temperatura en el rango del TNZ, para realizar actividades evitando el estrés generado por el calor. Mientras que el rango de humedad relativa ideal es entre 30 a 70%. De aquí la importancia de añadir un sensor capaz de medir este parámetro. La imagen 59 muestra el sensor utilizado.



*Imagen 59 Sensor DHT11 [75].*

Para el envío de datos se utilizará el módulo GSM sim 800 L, que se muestra en la imagen 60. Este módulo utiliza un chip de teléfono para conectarse a la red 2G. Existen otros módulos como el SIM 900 que podrían también ser utilizados para realizar el envío de datos, pero el SIM800 L es más económico, tiene una calidad muy similar a la del SIM 900, integra la opción de conexión con

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

antena Bluetooth y es una versión más actualizada del SIM900, el que pronto será discontinuado por la compañía SIMCOM [76].



*Imagen 60 Modulo Sim 800L [77].*

Los datos técnicos de los componentes seleccionados se muestran en el anexo C8.

### 5.3.2.2 Dimensionamiento y selección de la batería y panel fotovoltaico

La alimentación del dispositivo está dada según el siguiente esquema:



*Imagen 61 Esquema de alimentación para el prototipo 2. Fuente propia.*

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

En primer lugar, se tiene el panel fotovoltaico que colecta la energía solar. En estos componentes se distinguen dos tipos; Monocristalinos y policristalinos. La eficiencia de los paneles fotovoltaicos monocristalinos es de 15% al 20%, mientras que los policristalinos es del 13% al 16%. Luego pasa a la unidad de carga que son módulos que cuentan con sistemas de protección y de regulación de voltaje de salida para poder energizar nuestras baterías, muchas veces permitiendo utilizar otros métodos a parte del panel fotovoltaico. Luego sigue la batería que nos permita energizar a nuestro proyecto y el MCU que es en este caso el microprocesador Mega Mini pro.

Para realizar el dimensionamiento de la batería y posteriormente el del panel fotovoltaico es necesario conocer el consumo energético del dispositivo. Este se resume en la siguiente tabla.

*Tabla 6 Componentes del 2° prototipo y su correspondiente consumo energético.*

| Componente                   | Potencia consumida en W |
|------------------------------|-------------------------|
| Mega 2560 Pro Mini           | 0.465                   |
| Módulo GSM SIM 800L          | 4.44                    |
| Regulador de voltaje LM2596s | 0.05                    |
| Resistencia 220 ohm          | 0.11                    |
| Sensor LDR + 2 leds          | 0.025                   |

Fuente: Propia.

Así la potencia requerida por el prototipo 2 es de 5.09W con un consumo de 1.018A. El cálculo de la batería se deben tener las siguientes consideraciones:

- i. Asegurarse que el dispositivo sobrepase las noches de invierno.
- ii. Asegurarse que el dispositivo sobrepase un periodo de mal tiempo.
- iii. Asegurarse que el dispositivo sobreviva el peor mes del año.
- iv. Se realizará una medición cada 12 horas.

Para esto se debe contar con un lugar de referencia donde será ubicado el dispositivo para realizar pruebas de campo. De acuerdo al trabajo realizado en F. Astorga *et al* (2018) [78] donde se obtuvieron 390 ocurrencias de localidades para el ratón colilargo se demostró que existe evidencia de vectores del virus del Hanta desde la zona centro hasta la zona austral de Chile. Como

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

referencia se tendrá la zona de los Queñes, específicamente latitud -34.986 y longitud -70.8528 en la ciudad de Curicó, de la que se obtuvieron datos de radiación utilizando el explorador solar del Ministerio de Energía de Chile [79]. El mes con menor radiación por día es junio con  $2.01 \frac{kWh}{m^2} / día$ . La noche más larga del año en esta zona del país se da en el mes de julio y tiene una duración de 14 horas aproximadamente [80]. Por último, la cantidad de días donde no es posible recolectar energía con el panel fotovoltaico por condiciones medioambientales o la energía colectada es despreciable, es de 1 día. Por lo tanto, se tiene:

$$\text{Consumo por hora} = \frac{1h * 1.018A}{12h} = 0.085A$$

$$\text{Horas de la noche más larga} = 14h * 0.085A = 1.188Ah$$

$$\text{Días de mal tiempo} = 1día * 24h * 0.085A = 2.04Ah$$

Así la batería necesaria para que el prototipo se mantenga energizado y sin problemas de energía durante el periodo en que se necesitará mayor autonomía es de 3.228Ah.

Por otro lado, para el dimensionamiento del panel fotovoltaico se tiene:

$$\text{Menor radiación durante el año (junio)} = 2.01 \frac{kWh}{m^2} * día$$

$$\text{Potencia obtenida} = \frac{2.01 \frac{kWh}{m^2}}{24h} = 83.75 \frac{W}{m^2}$$

A la potencia obtenida se le debe aplicar una reducción debido a la eficiencia del panel fotovoltaico y de la unidad de carga/batería, quedando aproximadamente un 10% del total obtenido.

$$\text{Reducción por eficiencia de equipos} = 83.75 \frac{W}{m^2} * 0.1\eta = 8.375 \frac{W}{m^2}$$

$$\text{Tamaño panel fotovoltaico} = \frac{5.09W}{8.375 \frac{W}{m^2} * \frac{1m^2}{100^2cm^2}} = 6077.612cm^2$$

$$\text{Reducción del consumo función deep sleep} = 6077.612cm^2 * 0.2 = 1215.52cm^2$$

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

Con esto se obtiene que sería necesario contar con un panel fotovoltaico de 35cm x 35cm para energizar el proyecto durante el mes con menor radiación del año, realizando 1 detección cada 12 horas.

Fueron seleccionados los siguientes componentes:

*Tabla 7 Componentes seleccionados para energizar el 2° prototipo.*

| Componente                                      | Descripción   | Referencia |
|---|---|------------|
| Lipo rider CN3065                               | tiene la función de cargar una celda de ion de litio o baterías de polímero de litio regulando el voltaje de salida a 4.2V. Este tiene la característica de recibir la energía del panel fotovoltaico o de cargar la batería a través de una fuente externa y además muestra el nivel de carga de la batería. | [81]       |
| Batería de Ion de Litio 6000 mAh                | Se seleccionó esta batería dado que podría ser necesario en pruebas futuras agregar componentes como servo motores que tienen un alto consumo energético (alrededor de 2.5A).   | [82]       |
| Panel fotovoltaico 10W 5V<br>650 x 200 x 0.3 cm | Panel solar monocristalino.   | [83]       |

Fuente: Propia.

### 5.3.3 Fabricación

Para este prototipo se continuó utilizando la unión tipo dovetail para la estructura de cada nivel. También se agregó el uso de imanes para la rápida unión y separación de los distintos niveles. Se incorporó impresión 3D en ABS y PLA, para los componentes diseñados y que no pudieron ser mecanizados con corte láser en material MDF y los muros de la estructura se fabricaron en acrílico. El resultado de la fabricación de este prototipo se puede ver en el Anexo C6. La siguiente tabla muestra los materiales utilizados:

*Tabla 8 Lista de materiales de fabricación 2° propuesta de diseño*

| Materiales utilizados            | Descripción                             |
|----------------------------------|---|
| Madera MDF 3mm                   | Estructura superior e inferior          |
| Malla acero inoxidable n°20 ASTM | Piso Jaula                              |
| PLA 1.75mm /ABS 1.75mm           | Techo, colección y detección de muestra |
| Resina estándar Clear V2         | Colección y detección de muestra        |
| Acrílico 3mm                     | Muros de la estructura                  |

Fuente: Propia.

En el Anexo C7 están documentados los archivos esquemático y board del prototipo 2. Estos archivos fueron diseñados utilizando el software EAGLE de Autodesk y fabricados utilizando el software BANTAM TOOLS con el equipo de control numérico CNC Othermill de la misma compañía.

### 5.3.4 Prueba de concepto del prototipo 2 y envío de datos remoto.

Se realizó una prueba de concepto al prototipo 2, donde se dejó caer un volumen de agua de 3000 $\mu$ l con una jeringa dentro del embudo de colección. Luego de 5 minutos se comprobó el estado de la tira reactiva que fue colocada dentro del equipo. La imagen 62 muestra el resultado:



*Imagen 62 Tira reactiva rectangular marcada con la configuración B y probada con agua.  
Fuente propia.*

Los datos a postear son los siguientes:

Input

Hora

Nombre

Dato

Temperatura

Humedad

Voltaje de batería

Estos datos son posteados siguiendo ese orden, uno por cada columna en la base datos. Cada Input corresponde a la iteración del dato enviado. Nombre corresponde a la trampa (módulo GSM) desde donde se está enviando el dato. Dato corresponde al sensor LDR, el que realiza 50 lecturas del resultado del test (cambio de color). La idea es poder calcular posteriormente el

## Capítulo V: Diseño y Fabricación del Equipo

promedio de todas estas. Los parámetros de lectura para el sensor LDR, se describen a continuación:

*Tabla 9 Parámetros del sensor LDR para la lectura del resultado del test.*

| Tramo            | Resultado | Comentario                                 |
|------------------|-----------|--|
| $0 < x < 250$    | 0         | No hay conexión de las luces LED           |
| $500 < x < 700$  | 1         | Hay conexión pero no está presente el test |
| $745 < x < 755$  | 2         | Test fallido                               |
| $760 < x < 790$  | 3         | Test negativo                              |
| $800 < x < 1024$ | 4         | Test positivo                              |

\*Los valores obtenidos desde el sensor van de  $0 < x < 1024$ . Fuente: Propia.

Cabe señalar que estos parámetros fueron obtenidos experimentalmente al calibrar el sensor.

Temperatura y Humedad corresponden a los datos leídos por el sensor DHT11. El voltaje es leído desde el arreglo de voltímetro hecho en la misma placa pcb del prototipo 2.

Utilizando Pushingbox.com que es un servicio gratuito que permite realizar 1000 envíos diarios a la base de datos, en conjunto con el módulo GSM, es posible realizar el envío de datos. Con este servicio no es necesario levantar un servidor para levantar los datos colectados.

Se utiliza la librería de arduino `ArduinoHttpClient.h` y `TinyGsmClient.h`, de las que se adaptaron unos códigos ejemplo incorporados en las librerías y se agregó a la pestaña “SENDATA”, mostrada en la imagen 63. En la línea 12 se agregó una variable String llamada “test” la que realiza la conexión con el servidor de Pushingbox.

Se adaptó un script enlazado con una planilla de Excel de google drive llamada “GSM SEPT 2019”, para utilizarla como base datos. Esta planilla se muestra en la imagen 64.



## **CAPÍTULO VI: COSTOS**

## Capítulo VI: Costos

En este capítulo se revisarán los costos de materiales para la fabricación de ambos prototipos ordenados en dos tablas. En ellas se describen los materiales seleccionados, la cantidad de estos y también se incluyen los cobros de aduana y envío.

*Tabla 10 Detalle de costos en materiales para la fabricación del prototipo 1*

| Ítem                                  | Costo unitario (CLP) | Cantidad | Costo total (CLP) |
|---------------------------------------|----------------------|----------|-------------------|
| MDF 5.5 MM 152x244 cm                 | 9490                 | 1        | 9490              |
| Tornillos M4 50 unidades              | 1356                 | 1        | 1356              |
| Tornillos M3 50 unidades              | 471                  | 1        | 471               |
| Tuerca moleteada hembra M4 50 piezas  | 1061                 | 1        | 1061              |
| Tuerca moleteada hembra M3 100 piezas | 794                  | 1        | 794               |
| Bisagra 3/4 "                         | 290                  | 1        | 290               |
| Malla mosquitera 0.9X3 m              | 3724                 | 1        | 3724              |
| Regulador de voltaje LM2596s          | 675                  | 1        | 675               |
| Módulo GSM SIM 800L                   | 9900                 | 1        | 9900              |
| Arduino nano                          | 1264                 | 1        | 1264              |
| Cables Dupont macho-macho 40 unidades | 1033                 | 1        | 1033              |
| Sensor ldr                            | 500                  | 1        | 500               |
| SIM CARD + bolsa de Internet          | 10000                | 1        | 10000             |
| Resistencia de 220 Ohm / 10kOhm       | 2900                 | 1        | 2900              |
| ABS 1.75mm 1kg                        | 18000                | 1        | 18000             |
| Led                                   | 100                  | 3        | 300               |
| Batería 6000 mAh                      | 30990                | 1        | 30990             |
| Servomotor giro continuo              | 2563                 | 1        | 2563              |
| <b>Total</b>                          |                      |          | <b>77281</b>      |
| <b>Total + costos de envío</b>        |                      |          | <b>85019</b>      |

Fuente: [84], [85].

Capítulo VI: Costos

*Tabla 11 Detalle de costos en materiales para la fabricación del prototipo 2*

| Ítem  | Costo unitario (CLP) | Cantidad | Costo total (CLP) |
|---|----------------------|----------|-------------------|
| MDF 3 MM 152x244 cm                             | 9490                 | 1        | 9490              |
| Tornillos M2 50 unidades                        | 1356                 | 1        | 1356              |
| Tornillos M3 50 unidades                        | 471                  | 1        | 471               |
| Tuerca moleteada hembra M2 50 piezas            | 1061                 | 1        | 1061              |
| Tuerca moleteada hembra M3 100 piezas           | 794                  | 1        | 794               |
| Bisagra 3/4 "                                   | 290                  | 2        | 580               |
| Imanes de neodimio 30 piezas 10x4x2 mm          | 3459                 | 3        | 10377             |
| Lipo rider CN3065                               | 17990                | 1        | 17990             |
| Panel fotovoltaico 10W 5V<br>650 x 200 x 0.3 cm | 20423                | 1        | 20423             |
| Malla acero inoxidable n°20 ASTM                | 6190                 | 1        | 6190              |
| Regulador de voltaje LM2596s                    | 675                  | 1        | 675               |
| Módulo GSM SIM 800L                             | 9900                 | 1        | 9900              |
| Mega 2560 Pro Mini                              | 1264                 | 1        | 1264              |
| Cables Dupont macho-macho 40 unidades           | 1033                 | 1        | 1033              |
| Sensor ldr                                      | 500                  | 1        | 500               |
| SIM CARD + bolsa de Internet                    | 10000                | 1        | 10000             |
| PLA 1.75mm 1kg                                  | 20000                | 1        | 20000             |
| ABS 1.75mm 1kg                                  | 18000                | 1        | 18000             |
| Resina estándar impresión 3D 1lt                | 18990                | 1        | 18990             |

## Capítulo VI: Costos

|                                 |       |   |        |
|---------------------------------|-------|---|--------|
| Acrílico 3mm 80x120 cm          | 34500 | 1 | 34500  |
| JX PDI-6221MG 20kg              | 11274 | 1 | 11274  |
| Resistencia de 220 Ohm / 10kOhm | 2900  | 1 | 2900   |
| Led                             | 100   | 3 | 300    |
| Batería 6000 mAh                | 30990 | 1 | 30990  |
| Total                           |       |   | 229058 |
| Total + costos de envío         |       |   | 240665 |

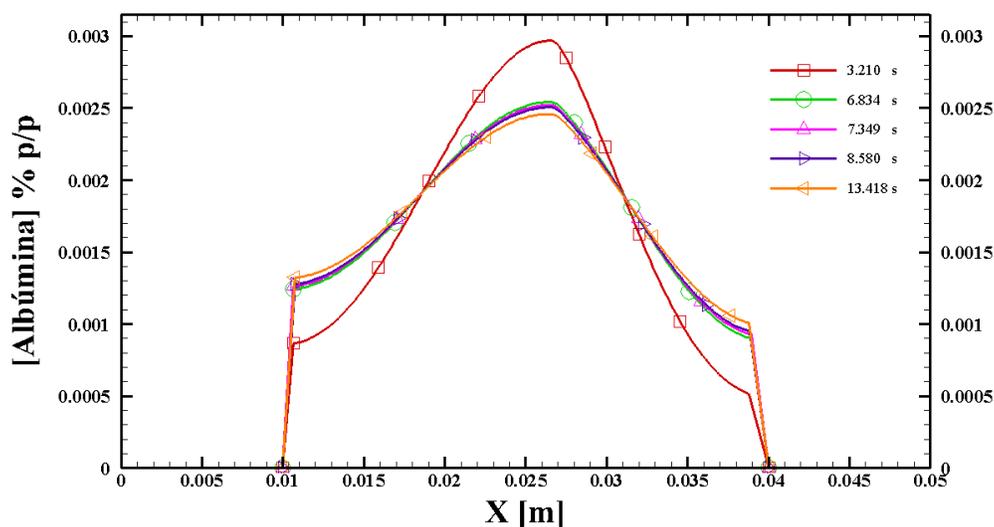
Fuente: [84], [85].

## **CAPÍTULO VII: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se describirán los resultados según el orden del documento. En primer lugar, se discutirá acerca de la simulación numérica; luego de la experimentación en la detección de biomoléculas; posteriormente se discutirá acerca de la fabricación del segundo prototipo, su estado actual y posibles mejoras.

## 7.1 SIMULACIÓN NUMÉRICA

Uno de los objetivos de esta tesis es verificar que la situación experimental se era similar a la simulación computacional. De este modo es posible para otras investigaciones el probar con; diferentes geometrías variando el largo y ancho de canal o configuraciones como zonas de testeo y control con formas de romboide o cuadradas, y encontrar así la forma óptima para un tipo específico de test. Por tanto, el objetivo primordial de la simulación computacional es ahorrar tiempo de trabajo en el laboratorio, fabricando el set de geometrías y configuraciones adecuadas para cada caso. El caso analizado fue difusión pura de orina, sobre una geometría rectangular sencilla fabricada en papel de filtro whatman °2. El siguiente gráfico muestra los perfiles de distribución de la concentración a lo largo de la tira reactiva representada en el eje X para cinco tiempos.



*Imagen 65 Distribución de la concentración de albúmina en X, a los 3.210 segundos; 6.834 segundos, 7.349 segundos, 8.580 segundos y 13.418 segundos de iniciada la simulación. Fuente propia.*

## Capítulo VII: Resultados y Discusión

Del gráfico de la imagen 65 se puede apreciar que la simulación se comporta acorde a la situación experimental. A los 3,210 segundos se aprecia un mayor valor de la concentración al centro del gráfico en comparación con los extremos. Esto se produce ya que al inicio la difusión de la orina hacia las zonas de test y control, las que tienen una longitud de alrededor de 3 mm, es muy baja. A medida que pasa el tiempo, la distribución de la concentración de albúmina va cambiando en la tira reactiva. Este cambio es mucho más rápido en la zona de test (lado izquierdo del gráfico), debido a que el coeficiente de difusión es mayor en esa zona. A los 6.834 segundos logra acumularse la concentración adecuada para generar una respuesta de cambio de color en el primer tercio de la zona de test. Ya en los segundos posteriores aumenta la concentración a lo largo de la zona de test, logrando finalmente una coloración completa de la zona entre los instantes 8.580 segundos y 13.418 segundos. Con respecto a la zona de control, en los tiempos finales se alcanza la concentración mínima para lograr un cambio de color en el reactivo. Esto se contrasta con la situación experimental, ya que en el segundo 8.580 se ve claramente un cambio de color en la primera porción de la zona de control y en el instante 13.418 segundos ya hay un cambio de color completo en dicha zona. Esto se explica ya que la simulación no contempla la concentración de la albúmina de suero bovino depositada en la tira reactiva, la que es desplazada con el fluido permitiendo lograr una mayor concentración de analito en la zona de control y, por ende, un cambio de color en el reactivo verde de bromocresol.

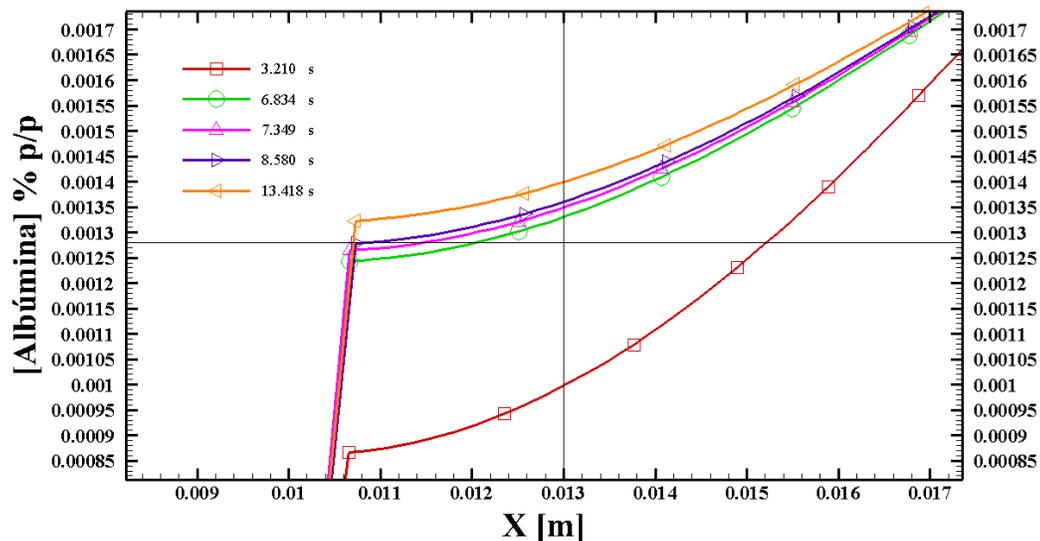


Imagen 66 Distribución de la concentración de albúmina en X para la zona de test comprendida entre los 0.01m – 0.013 m a los 3.210 segundos; 6.834 segundos, 7.349 segundos, 8.580 segundos y 13.418 segundos de iniciada la simulación. Fuente propia.

En la imagen 66, se aprecia con más detalle la relación de la distancia de la geometría (eje X en metros), con la concentración de albúmina en la muestra de orina (eje Y en % de peso). En ella se ha marcado con una línea vertical el límite de la zona de test, que está situada entre 0,01m y 0,013m y con una línea horizontal el límite de detección de albúmina que corresponde a 13  $\mu\text{g/ml}$ . En esta zona se tiene una concentración que comprende valores entre  $0\mu\text{g/ml} < x < 14.336\mu\text{g/ml}$ . Con esto se puede ver que el avance de la concentración se condice con la generación de color en la situación experimental ya que a medida que avanza el tiempo se generan valores superiores al límite de detección que alcanzan porciones mayores de la zona de test. En el inicio, la concentración de analito es significativamente menor que el límite de detección, por lo que no podría producirse una reacción. Esto se puede ejemplificar con la imagen 67, donde se tiene la tira reactiva rectangular a los 3.210 segundos de haber depositado en ella una muestra de orina y no se ha generado un cambio en el color de la zona de test.



*Imagen 67 Situación experimental detección de albúmina en muestra de orina, a los 3 segundos.  
Fuente propia.*

## **7.2 EXPERIMENTACIÓN EN DETECCIÓN DE BIOMOLÉCULAS**

Primero, en el dispositivo rectangular basado en papel, se logra el resultado esperado, con el mínimo volumen de muestra probado  $30\mu\text{l}$ , que es el menor volumen obtenido por micción del ratón [86]. Esto prueba que el tiempo de detención del animal en el equipo, puede ser menor al periodo de tiempo estimado, dado el volumen de muestra que requiere este dispositivo para su funcionamiento. Esto queda propuesto para pruebas futuras de colecta del equipo con roedores vivos. Para volúmenes de muestra mayores,  $60$  y  $120\mu\text{l}$ , el dispositivo sobrepasó su capacidad de humectación (imagen 68). En este caso, si se quisiera coleccionar mayor cantidad de muestra, sería necesario probar con diferentes geometrías del dispositivo, aumentando así el largo o el ancho. También agregar que la configuración A se comportó de mejor manera que la B (ambas mostradas en la imagen 9) debido a que, al probarlas con mayor cantidad de muestra, el fluido mezclaba el color generado en las diferentes zonas, impidiendo así una lectura clara del experimento.

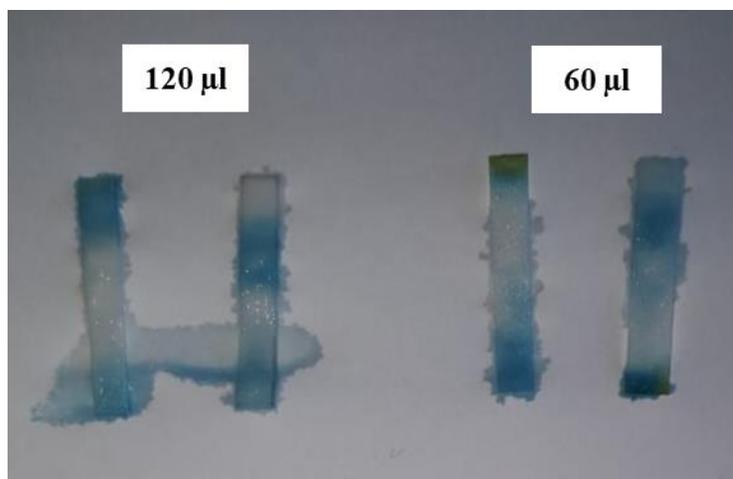


Imagen 68 Pruebas realizadas en canal rectangular con 60µl y 120µl. Fuente propia.

Otro aspecto importante es la discusión del límite de detección de la albúmina por la solución del verde de bromocresol. Se utilizó el software ImageJ en las imágenes de la experimentación con el canal rectangular. En ellas, se determinó el número de píxeles, en escala de grises, y se hizo la comparación con la concentración de albúmina en orina. La tabla siguiente resumen los valores obtenidos:

Tabla 12 Datos de concentración de albúmina en orina humana y su correlación de medición de píxeles

| Concentración de Albúmina en orina µg/ml | Medición n° de píxeles | Descripción  |
|--|------------------------|--|
| 0  | 137.778                | Papel de filtro impregnado con solución de verde de bromocresol (zona de test) sin presencia de Albúmina       |
| X  | 124.380                | Concentración mínima a la que a los 7.349 segundos se genera un cambio en el color notorio en la zona de test. |
| 17                                       | 120.333                | Concentración de albúmina en la zona de  |

test, luego de 70 segundos  
de realizado el test.

Fuente: Propia.

Asumiendo un comportamiento lineal se determina la ecuación de la recta y posteriormente la concentración que corresponde al valor X. La gráfica de esta función se muestra en la imagen 69.

$$N^{\circ} \text{ de pixeles } (x) = -1.0261X + 137,778$$

Para  $n^{\circ}$  de pixeles = 124.380 ; se tiene una concentración  $X = 13.056 \mu\text{g/ml}$

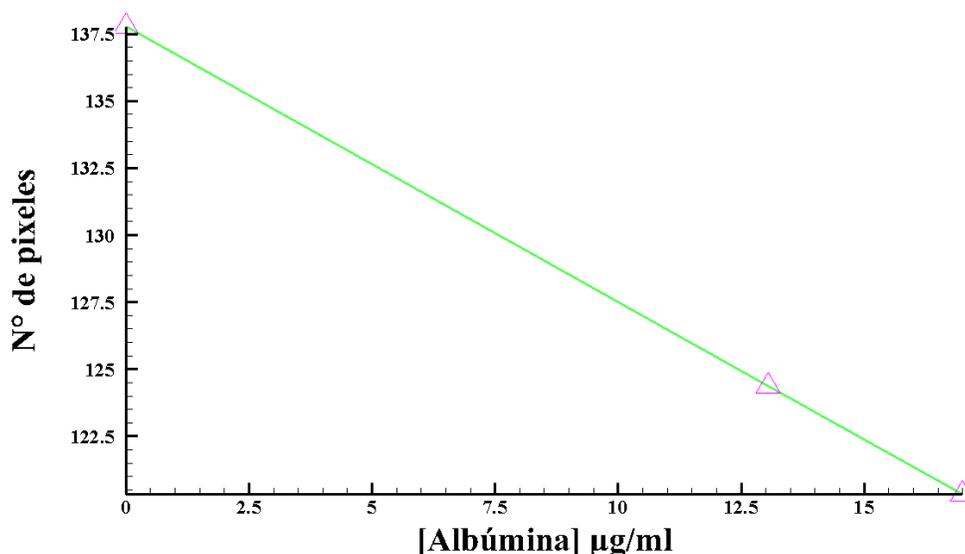


Imagen 69 Gráfica de la función del número de pixeles en función de la concentración de albúmina. Fuente propia.

Así se determina que el valor mínimo de detección, asumiendo un comportamiento lineal de la curva, es de aproximadamente  $13.056 \mu\text{g/ml}$  . Esto corrobora la simulación comparándola con la situación experimental, dado que, a los 7.349 segundos, arroja un valor de concentración mayor que el valor mínimo, en la zona donde se generan los primeros cambios de color.

Por último, los  $\mu\text{PADs}$  creados con inmersión de parafina, mostraron ser una vía útil para crear dispositivos microfluidicos de simple fabricación y bajo costo. Como mejoras, se podría

## Capítulo VII: Resultados y Discusión

agregar fabricar los moldes de metal con corte láser, ya que es un método mucho más rápido y de mayor acceso que el del centro de mecanizado. También, adquirir imanes de mayor tamaño, idealmente de 40 mm de diámetro, asumiendo una forma circular. Esto dado que se generaron problemas con el desprendimiento de algunos moldes, al momento de realizar la inmersión en el matraz con parafina.

También agregar que, para ambos procedimientos experimentales, se realizó el marcaje a mano alzada, lo que dejó con un mayor tamaño las zonas de test y control en las respectivas configuraciones. Este problema podría representar un interesante tema de investigación al desarrollar una máquina que no sólo deje zonas perfectamente delineadas, sino que también, permita ahorrar reactivos disminuyendo las sucesivas iteraciones.

### 7.3 EQUIPO

El desarrollo de este equipo involucró áreas como el diseño mecánico e industrial, electrónica de microcontroladores, selección de componentes y materiales, CFD y experimentación en laboratorios de medicina y bioquímica. Su estado actual, permite desarrollar experimentación para recolección de muestras y detección de analitos, con animales vivos de baja envergadura (ratones), en Bioterios y/o centros de investigación. Estas pruebas arrojarán datos que servirán para realizar nuevas iteraciones de diseño y, en el futuro, ejecutar pruebas de campo con prototipos que se espera, no estén muy distantes con el que hoy se tiene.

Como mejora se propone adaptar al módulo de captura la trampa de captura viva tipo Sherman, que se muestra en la imagen 70, el que es el método predilecto para la captura de roedores [87], permitiendo así contar con un método probado de captura. También se propone incorporar otra alternativa al mecanismo de cierre del prototipo 2, dado que se podrían producir fallas como fractura en las zonas más solicitadas de los componentes impresos en 3D. Esta podría ser incorporar en este prototipo un sensor PIR de movimiento o un sensor infrarrojo en el que se interrumpa la señal cuando el roedor haya ingresado a una distancia determinada al interior de la jaula.



*Imagen 70 Trampa Sherman de captura viva para roedores de pequeña envergadura [88].*

Se propone también probar con uniones imantadas para los componentes electrónicos (imagen 71), para acentuar así el concepto de modularidad de la trampa, permitiendo que sea aún más fácil la conexión y retiro de los módulos.



*Imagen 71 Conexión electrónica modular, uso de terminales imantados [89].*

Por otro lado, se propone incorporar sensores que permitan verificar el nivel de orina en el vaso de Pitágoras durante la recolección. Con esto se tendrá certeza de volumen colectado y el tiempo de colecta para cada roedor testeado. Este sensor podría ser el de nivel de agua para microcontrolador o una resistencia unida a dos cables. En el anexo C8 se muestra una tabla con los datos del sensor.

## **CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA**

## Capítulo VIII: Bibliografía

- [1] C. Técnico, N. 47 Organización, P. De, and L. A. Salud, “HANTAVIRUS EN LAS AMÉRICAS GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO, EL TRATAMIENTO, LA PREVENCIÓN Y EL CONTROL,” 1999.
- [2] C. B. Jonsson, L. Tadeu, M. Figueiredo, and O. Vapalahti, “A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 23, no. 2, pp. 412–441, 2010.
- [3] “OPS/OMS | Hantavirus.” [Online]. Available: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=14911:hantavirus&Itemid=40721&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14911:hantavirus&Itemid=40721&lang=es). [Accessed: 27-Oct-2019].
- [4] O. V. and A. P. Antti Vaheri, “How to diagnose hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores,” *Wiley Intersci.*, 2008.
- [5] “Vigilancia y diagnóstico de virus HANTA | Instituto de Salud Pública de Chile.” [Online]. Available: <http://www.ispch.cl/vigilancia-y-diagnostico-de-virus-hanta>. [Accessed: 27-Oct-2019].
- [6] “GUÍA CLÍNICA DE PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL SÍNDROME CARDIOPULMONAR POR HANTAVIRUS.”
- [7] M. Navarrete, C. Barrera, L. Zaror, and C. Otth, “Rapid immunochromatographic test for hantavirus Andes contrasted with capture-IgM ELISA for detection of Andes-specific IgM antibodies,” *J. Med. Virol.*, vol. 79, no. 1, pp. 41–44, Jan. 2007.
- [8] T. M. H. GALENO A., E. VILLAGRA C., B. Q. J. FERNANDEZ O., B. Q. E. RAMIREZ V., and M. V. J. MORA R., “Técnicas diagnósticas de infección humana por hantavirus,” *Rev. Chil. infectología*, vol. 17, no. 3, pp. 211–215, 2000.
- [9] J. A. Sheedy *et al.*, “The clinical course of epidemic hemorrhagic fever,” *Am. J. Med.*, vol. 16, no. 5, pp. 619–628, May 1954.
- [10] H. W. Lee, P. W. Lee, and K. M. Johnson, “Isolation of the Etiologic Agent of Korean Hemorrhagic Fever,” *J. Infect. Dis.*, vol. 137, no. 3, pp. 298–308, Mar. 1978.
- [11] M. Baró A, J. Vergara O, and M. Navarrete C, “Hantavirus en Chile: revisión y análisis de casos desde 1975,” *Rev. Med. Chil.*, vol. 127, no. 12, pp. 1513–1523, Dec. 1999.
- [12] A. S. Khan *et al.*, “Hantavirus Pulmonary Syndrome: The First 100 US Cases,” *J. Infect. Dis.*, vol. 173, no. 6, pp. 1297–1303, Jun. 1996.
- [13] C. Pavletic Brevis, “Hantavirus: Su distribución geográfica entre los roedores silvestres de

- Chile,” *Revista Chilena de Infectología*, vol. 17, no. 3. pp. 186–196, 2000.
- [14] B. Klempa *et al.*, “Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 4, pp. 617–625, 2008.
- [15] “Virology | Hantavirus | DHCPP | CDC.” [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/hantavirus/technical/hanta/virology.html>. [Accessed: 28-Dec-2018].
- [16] K. Dohmae, M. Okabe, and Y. Nishimune, “Experimental transmission of hantavirus infection in laboratory rats,” *J. Infect. Dis.*, vol. 170, no. 6, pp. 1589–92, Dec. 1994.
- [17] P. Padula *et al.*, “Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 21, pp. 11972–9, Nov. 2004.
- [18] G. E. Glass, J. E. Childs, G. W. Korch, and J. W. LeDuc, “Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*).,” *Epidemiol. Infect.*, vol. 101, no. 2, pp. 459–72, Oct. 1988.
- [19] K. D. Abbott, T. G. Ksiazek, and J. N. Mills, “Long-Term Hantavirus Persistence in Rodent Populations in Central Arizona,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 5, no. 1, pp. 102–112, Feb. 1999.
- [20] L. Piudo, M. J. Monteverde, R. S. Walker, and R. J. Douglass, “[*Oligoryzomys longicaudatus* characteristics’ associated with the presence of Andes virus (Hantavirus)].,” *Rev. Chil. infectología órgano Of. la Soc. Chil. Infectología*, vol. 29, no. 2, pp. 200–6, 2012.
- [21] T. Amada *et al.*, “Development of an immunochromatography strip test based on truncated nucleocapsid antigens of three representative hantaviruses,” 2014.
- [22] “Transcripción reversa | Thermo Fisher Scientific - CL.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/pcr/reverse-transcription.html>. [Accessed: 28-Oct-2019].
- [23] “Diagnostics | Hantavirus | DHCPP | CDC.” [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/hantavirus/technical/hps/diagnostics.html>. [Accessed: 06-Nov-2019].
- [24] S. Mattar, C. Guzmán, and L. T. Figueiredo, “Diagnosis of hantavirus infection in humans,” *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 13, no. 8. Taylor and Francis Ltd, pp. 939–946, 01-Aug-2015.
- [25] H. Du *et al.*, “Clinical characteristics and outcomes in critical patients with hemorrhagic fever with renal syndrome,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 14, p. 191, Apr. 2014.
- [26] O. Vapalahti *et al.*, “Isolation and characterization of Tula virus, a distinct serotype in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae,” *J. Gen. Virol.*, vol. 77, no. 12, pp. 3063–3067,

- 1996.
- [27] B. T. Kurien, N. E. Everds, and R. H. Scofield, “Animalurinecollection,” 2004.
- [28] “La obtención de la muestra de orina | PortalVeterinaria.” [Online]. Available: <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/19460/la-obtencion-de-la-muestra-de-orina.html>. [Accessed: 28-Oct-2019].
- [29] “El genoma de ratón y su importante papel en el estudio de las enfermedades humanas - Genotipia.” [Online]. Available: [https://genotipia.com/genetica\\_medica\\_news/genoma-de-raton/](https://genotipia.com/genetica_medica_news/genoma-de-raton/). [Accessed: 28-Oct-2019].
- [30] “Evaluación Biológica en ratas de Laboratorio (*Rattus norvegicus*) de Fuentes Proteicas usadas en alimentos comerciales para perros.” [Online]. Available: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172003000100004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172003000100004). [Accessed: 28-Oct-2019].
- [31] B. T. Kurien and R. H. Scofield, “Mouse urine collection using clear plastic wrap,” *Lab. Anim.*, vol. 33, no. 1, pp. 83–86, Jan. 1999.
- [32] F. K. Khosho, R. C. Kaufmann, and K. S. Amankwah, “A simple and efficient method for obtaining urine samples from rats,” *Lab. Anim. Sci.*, vol. 35, no. 5, pp. 513–4, Oct. 1985.
- [33] S. Hayashi and T. Sakaguchi, “Capillary tube urinalysis for small animals,” *Lab. Anim. Sci.*, vol. 25, no. 6, pp. 781–2, Dec. 1975.
- [34] I. H. Perline, “An inexpensive mouse urine collection system,” *Physiol. Behav.*, vol. 6, no. 5, p. 597, May 1971.
- [35] R. B. Jones, R. A. Dilks, and N. W. Nowell, “A method for the collection of individual mouse urine,” *Physiol. Behav.*, vol. 10, no. 1, pp. 163–164, Jan. 1973.
- [36] “Mouse Metabolic Chamber with Waste Collection.” [Online]. Available: <https://www.harvardapparatus.com/metabolic-chamber-for-mouse-with-waste-collection.html>. [Accessed: 28-Oct-2019].
- [37] “Metabolic Cages - for rats, mice and single mouse | Laboratory Animal Equipment.” [Online]. Available: <https://www.tecniplast.it/en/product/metabolic-cages.html>. [Accessed: 28-Oct-2019].
- [38] E. Karg *et al.*, “Design, operation and performance of whole body chambers for long-term aerosol exposure of large experimental animals,” *J. Aerosol Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 279–290, May 1992.

## Capítulo VIII: Bibliografía

- [39] “Comfortable Quarters for laboratory animals.”
- [40] W. B. Loyalty, “a Ward W Inning P Apers a Bstracts of a Ward -W Inning T Heses,” vol. 93, no. 2, pp. 650–651, 2011.
- [41] D. M. Lyons, K. J. Parker, and A. F. Schatzberg, “Animal models of early life stress: Implications for understanding resilience.,” *Dev. Psychobiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 402–10, Jul. 2010.
- [42] M. Jennings *et al.*, “Refining rodent husbandry: the mouse: Report of the Rodent Refinement Working Party,” *Lab. Anim.*, vol. 32, no. 3, pp. 233–259, Jul. 1998.
- [43] E. Tarland, “Effect of metabolic cage housing on rodent welfare,” *Dep. Clin. Sci.*, pp. 1–13, 2007.
- [44] C. T. A., *Essentials of Micro- and Nanofluidics: With Applications to the Biological and Chemical Sciences*. 2013.
- [45] A. K. Yetisen, M. S. Akram, and C. R. Lowe, “Lab on a Chip,” pp. 8–15, 2013.
- [46] J. M. Campbell, J. B. Balhoff, G. M. Landwehr, S. M. Rahman, M. Vaithyanathan, and A. T. Melvin, “Microfluidic and paper-based devices for disease detection and diagnostic research,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 9, 2018.
- [47] Z. Li, Y. Wang, J. Wang, Z. Tang, J. G. Pounds, and Y. Lin, “Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 16, pp. 7008–7014, 2010.
- [48] T. D. Fluorometer, “Urine Albumin Urine Fluorescein Immunoassay by Sequoia-,” 2014.
- [49] B. M. Chavers, S. M. Mauer, R. C. Ramsay, and M. W. Steffes, “Relationship between retinal and glomerular lesions in IDDM patients.,” *Diabetes*, vol. 43, no. 3, pp. 441–6, Mar. 1994.
- [50] C. E. Mogensen, “Renal function changes in diabetes.,” *Diabetes*, vol. 25, no. 2 SUPPL, pp. 872–9, 1976.
- [51] “EFLM Biological Variation Database : BIVAC Minimum Data Set for Howey JEA, Bennet WM, Browning MCK, Jung RT and Fraser CG, 1989, *Diabetic Medicine*, 6, 793-6 , Clinical utility of assays of glycosilated haemoglobin and serum fructosamine comapred: use of data on biological variation <br> <a href=’></a> EFLM Biological Variation.” [Online]. Available: <https://biologicalvariation.eu/references/70>. [Accessed: 29-Oct-2019].
- [52] B. A. Fielding, D. A. Price, and C. A. Houlton, “Enzyme immunoassay for urinary

## Capítulo VIII: Bibliografía

- albumin.,” *Clin. Chem.*, vol. 29, no. 2, pp. 355–7, Feb. 1983.
- [53] C. A. Jones *et al.*, “Microalbuminuria in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey.,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 39, no. 3, pp. 445–59, Mar. 2002.
- [54] E. Rademacher, M. Mauer, D. R. Jacobs, B. Chavers, J. Steinke, and A. Sinaiko, “Albumin excretion rate in normal adolescents: Relation to insulin resistance and cardiovascular risk factors and comparisons to type 1 diabetes mellitus patients,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3, no. 4, pp. 998–1005, Jul. 2008.
- [55] C. C. Acta and C. Hospital, “Urinary albumin determination bromcresol green method by the immediate,” vol. 90, pp. 241–248, 1978.
- [56] “BCG (Bromocresol Green) Albumin Assay Kit.”
- [57] “(No Title).” [Online]. Available: [http://www.vaxasoftware.com/doc\\_edu/fis/calorespec.pdf](http://www.vaxasoftware.com/doc_edu/fis/calorespec.pdf). [Accessed: 29-Oct-2019].
- [58] “Heat Capacity » IT’IS Foundation.” [Online]. Available: <https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/heat-capacity/>. [Accessed: 29-Oct-2019].
- [59] “(No Title).” [Online]. Available: [http://www.vaxasoftware.com/doc\\_edu/fis/condutermica.pdf](http://www.vaxasoftware.com/doc_edu/fis/condutermica.pdf). [Accessed: 29-Oct-2019].
- [60] K. Uetani and K. Hatori, “Thermal conductivity analysis and applications of nanocellulose materials,” *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 18, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 877–892, 31-Dec-2017.
- [61] J. Park, J. H. Shin, and J. K. Park, “Experimental analysis of porosity and permeability in pressed paper,” *Micromachines*, vol. 7, no. 3, 2016.
- [62] “Density » IT’IS Foundation.” [Online]. Available: <https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/density/>. [Accessed: 29-Oct-2019].
- [63] D. F. Garcia, “Determinación De Coeficientes De Difusión De Humedad En Papeles Aislantes De Transformador,” *Tesis Dr.*, p. 220, 2012.
- [64] P. Lisowski and P. K. Zarzycki, “Microfluidic Paper-Based Analytical Devices ( 1 PADS ) and Micro Total Analysis Systems ( 1 TAS ): Development , Applications and Future Trends,” pp. 1201–1214, 2013.
- [65] A. W. Martinez, S. T. Phillips, and G. M. Whitesides, “Diagnostics for the Developing World : Microfluidic Paper-Based Analytical Devices,” vol. 82, no. 1, pp. 3–10, 2010.
- [66] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, and W. Laiwattanapaisal, “Talanta Novel ,

## Capítulo VIII: Bibliografía

- simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping,” *Talanta*, vol. 85, no. 5, pp. 2587–2593, 2011.
- [67] E. E. Committee *et al.*, *Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2011.
- [68] R. H. Bind, S. M. Minney, S. Rosenfeld, and R. M. Hallock, “The role of pheromonal responses in rodent behavior: Future directions for the development of laboratory protocols,” *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 52, no. 2, pp. 124–129, Mar. 2013.
- [69] “ASTM E1095 - 99(2016) Standard Specification for Common Laboratory Glass Funnels.” [Online]. Available: <https://www.astm.org/Standards/E1095.htm>. [Accessed: 09-Jan-2020].
- [70] “Arduino Pro Mini 5v pines no soldados - AFEL.” [Online]. Available: <https://afel.cl/producto/arduino-pro-mini-328/?v=5bc574a47246>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [71] “Sensor de movimiento infrarrojo PIR (HC-SR501) - AMG Kits.” [Online]. Available: <https://amgkits.com/home/8-sensor-movimiento-infrarrojo-pir-hc-sr501.html>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [72] “Micro Servo MG90S 2.5Kg - Naylamp Mechatronics - Perú.” [Online]. Available: <https://naylampmechatronics.com/servomotores/246-micro-servo-mg90s.html>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [73] “Sensor de Color RGB TCS3200 con-protección | HeTPro.” [Online]. Available: <https://hetpro-store.com/sensor-de-color-rgb-tcs3200-con-proteccion/>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [74] “Mega 2560 PRO MICRO USB ATmega 2560 USB CH340G board de desarrollo Arduino Arduino | eBay.” [Online]. Available: <https://www.ebay.es/itm/Mega2560-PRO-Micro-USB-ATmega2560-USB-CH340G-development-Arduino-board-Arduino-/323838950931>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [75] “Sensor de Temperatura y Humedad Relativa DHT11.” [Online]. Available: <http://importienda.com/es/inicio/35-sensor-de-temperatura-y-humedad-relativa-dht11.html>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [76] “SIM800 vs SIM900: What is the difference/Similarities? | Random Codes - Elementz Tech

- Blog.” [Online]. Available: <https://elementztechblog.wordpress.com/2017/02/01/sim800-vs-sim900-what-is-the-differencesimilarities/>. [Accessed: 10-Jan-2020].
- [77] “Módulo GSM SIM800L – Startech Robotics.” [Online]. Available: <https://www.startechrobotics.com/producto/modulo-gsm-sim800l/>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [78] F. Astorga *et al.*, “Distributional ecology of Andes hantavirus: A macroecological approach,” *Int. J. Health Geogr.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–12, 2018.
- [79] “Explorador Solar.” [Online]. Available: <http://www.minenergia.cl/exploradorsolar/>. [Accessed: 11-Jan-2020].
- [80] “Sunrise and sunset times in Talca, julio 2019.” [Online]. Available: <https://www.timeanddate.com/sun/chile/talca?month=7&year=2019>. [Accessed: 11-Jan-2020].
- [81] “LiPo Rider Pro | MCI Electronics.cl.” [Online]. Available: <https://www.mcielectronics.cl/shop/product/adaptador-para-paneles-solares-lipo-rider-pro-con-salida-usb-10587>. [Accessed: 11-Jan-2020].
- [82] “Bateria de Lithium Ion - 5000mAh | MCI Electronics.cl.” [Online]. Available: <https://www.mcielectronics.cl/shop/product/bateria-de-litio-ion-6000mah-11293>. [Accessed: 11-Jan-2020].
- [83] “BUHESHUI 10 W 5 V cargador de Panel Solar plegable cargador de batería Solar portátil carga para teléfono senderismo al aire libre venta al por mayor 100 piezas-in Células solares from Productos electrónicos on AliExpress.” [Online]. Available: [https://es.aliexpress.com/item/32911498311.html?spm=a2g0o.productlist.0.0.385e3b936fhsjp&algo\\_pvid=60e46cb6-df66-4f84-9e86-d5f0c920d8fe&algo\\_expid=60e46cb6-df66-4f84-9e86-d5f0c920d8fe-8&btsid=1330f71c-ad80-4d68-89d5-4bd6a9ac79df&ws\\_ab\\_test=searchweb0\\_0,searchweb201602\\_6,searchweb201603\\_53](https://es.aliexpress.com/item/32911498311.html?spm=a2g0o.productlist.0.0.385e3b936fhsjp&algo_pvid=60e46cb6-df66-4f84-9e86-d5f0c920d8fe&algo_expid=60e46cb6-df66-4f84-9e86-d5f0c920d8fe-8&btsid=1330f71c-ad80-4d68-89d5-4bd6a9ac79df&ws_ab_test=searchweb0_0,searchweb201602_6,searchweb201603_53). [Accessed: 11-Jan-2020].
- [84] “MCI Electronics - Electrónica para makers y profesionales DIY.” [Online]. Available: <https://www.mcielectronics.cl/page/homepage>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [85] “(No Title).” [Online]. Available: <https://best.aliexpress.com/?lan=en&spm=a2g0o.detail.1000002.1.3f325484kMHnrF>. [Accessed: 20-Jan-2020].

## Capítulo VIII: Bibliografía

- [86] R. Unit, B. When, and M. Disposable, “A simple capillary tube method for the determination of the specific gravity of 25 and 50 , A quantities of urine,” no. December, 1970.
- [87] J. C. Whittaker, G. A. Feldhamer, and E. M. Charles, “Captures of mice, *Peromyscus*, in two sizes of Sherman live traps,” *Can. Field-Naturalist*, vol. 112, no. 3, pp. 527–529, 1998.
- [88] “Trampa Sherman plegable - MANDALA VERDE - Equipos Ambientales.” [Online]. Available: <https://www.mandalaverde.com.co/producto/trampa-sherman-plegable>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [89] “Reverse 4 pogo pin male and female magnetic connectors M417R-Professional Magnetic Connectors Manufacturer - HytePro.” [Online]. Available: <https://www.hyte.pro/product/m417r.html>. [Accessed: 20-Jan-2020].
- [90] A. Papa, “Dobrava-Belgrade virus: phylogeny, epidemiology, disease.,” *Antiviral Res.*, vol. 95, no. 2, pp. 104–17, Aug. 2012.
- [91] R. Fernando *et al.*, “Infection with New York orthohantavirus and associated respiratory failure and multiple cerebral complications,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 25, no. 6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), pp. 1241–1243, 01-Jun-2019.
- [92] O. Lupi *et al.*, “Hemorrhagic Fever and Arboviruses,” in *Tropical Dermatology: Second Edition*, Elsevier Inc., 2016, pp. 127–151.
- [93] A. Rovid Spickler, “Hantavirus Disease,” 2005.
- [94] R. H. Watts, “A simple capillary tube method for the determination of the specific gravity of 25 and 50 micro l quantities of urine.,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 24, no. 7, pp. 667–668, 1971.
- [95] B. T. Kurien and R. H. Scofield, “Mouse urine collection using clear plastic wrap.,” *Lab. Anim.*, vol. 33, no. 1, pp. 83–6, Jan. 1999.
- [96] W. A. White, “A technic for urine collection from anesthetized male rats.,” *Lab. Anim. Sci.*, vol. 21, no. 3, pp. 401–2, Jun. 1971.
- [97] C. R. Smith, J. S. Felton, and R. T. Taylor, “Description of a disposable individual-mouse urine collection apparatus.,” *Lab. Anim. Sci.*, vol. 31, no. 1, pp. 80–2, Feb. 1981.
- [98] “Single-mouse urine collection and pH monitoring system. - PubMed - NCBI.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28449>. [Accessed: 28-Oct-2019].
- [99] W. D. Black and M. J. Claxton, “A simple, reliable and inexpensive method for the collection of rat urine.,” *Lab. Anim. Sci.*, vol. 29, no. 2, pp. 253–4, Apr. 1979.

## Capítulo VIII: Bibliografía

- [100] A. J. Jackson and J. C. Sutherland, “Novel device for quantitatively collecting small volumes of urine from laboratory rats.,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 73, no. 6, pp. 816–8, Jun. 1984.
- [101] S. Toon and M. Rowland, “A simple restraining device for chronic pharmacokinetic and metabolism studies in rats.,” *J. Pharmacol. Methods*, vol. 5, no. 4, pp. 321–3, Jun. 1981.
- [102] W. D. Denckla, “Low temperature urine collector for unstable compounds.,” *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 68, no. 1, pp. 173–6, Jul. 1966.
- [103] W. D. Denckla, “Inexpensive low-temperature urine collector.,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 26, no. 3, pp. 393–394, Mar. 1969.
- [104] C. W. Lartigue, T. B. Driscoll, and P. C. Johnson, “Low-temperature urine collection apparatus for laboratory rodents.,” *Lab. Anim. Sci.*, vol. 28, no. 5, pp. 594–7, Oct. 1978.
- [105] “Vejam os Equipamentos desenvolvidos pela Uniaço.” [Online]. Available: [http://uniacoltda.com.br/?page\\_id=35&lang=en](http://uniacoltda.com.br/?page_id=35&lang=en). [Accessed: 20-Jan-2020].

## **CAPÍTULO IX: ANEXOS**

**9.1 Anexo A1. Características de algunos tipos de hantavirus**

*Tabla 13 Características de algunos tipos de hantavirus.*

| Hantavirus        | Región Geográfica                                   | Reservorio                 | Patología | Mortalidad | Referencias |
|-------------------|---|----------------------------|-----------|------------|-------------|
| Hantaan           | Asia  | Aodemus agrarius           | Renal     | 5-15%      | [15]        |
| Seoul             | Todo el mundo                                       | Rattus norvegicus          | Renal     | 1%         | [15]        |
| Puumala           | Norte de Europa                                     | Clethrionomys glareolus    | Renal     | 1%         | [15]        |
| Belgrado/Dobrava  | Balcanes  | Apodemus flavicollis       | Renal     | 5-15%      | [90]        |
| Sin Nombre        | Norte América                                       | Peromiscus maniculatus     | Pulmonar  | 40-50%     | [15]        |
| New York          | Este de Norteamérica                                | Peromiscus leucopus        | Pulmonar  | 36%        | [91]        |
| Black Creek Canal | Sureste EE.UU., Centroamérica y norte de Sudamérica | Sigmodon hispidus          | Pulmonar  | 40-50%     | [92]        |
| Bayou             | Sureste EE.UU.                                      | Oryzomys palustris         | Pulmonar  | 40-50%     | [92]        |
| Andes             | Chile, y sur de Argentina                           | Oligoryzomys longicaudatus | Pulmonar  | 40-50%     | [92]        |
| Laguna Negra      | Paraguay, Uruguay, Bolivia, Norte de Argentina      | Calomys laucha             | Pulmonar  | 9-29%      | [93]        |

**9.2 Anexo A2. Protocolo para detección de hantavirus en roedores e insectívoros.**

*Tabla 14 Protocolo para detección de hantavirus en roedores e insectívoros.*

| Indicaciones |   |
|--------------|---|
| 1            | Detección de anticuerpos para Hantavirus (desde sangre secada en papel de filtro) usando IFA, EIA o POC test (point-of-care) para sangre fresca o congelada.      |
| 2            | Detección de individuos seropositivos para antígenos hantavirales (desde, por ejemplo, tejido de pulmón) utilizando inmunotransferencia con anticuerpos contra N. |
| 3            | Detección de individuos antígeno-positivos para ARN hantaviral.   |
| 4            | Secuencia de muestras positivas para ARN (inicialmente segmentos parciales S y/o M, luego completar los S si es necesario).                                       |
| 5            | Realizar análisis filogenéticos.  |
| 6            | Aislar el virus (desde muestras de tejido congelado).   |

\*Fuente Antti Vaheri (2008) [4]

**9.3 Anexo A3. Resumen de los métodos publicados para la recolección de orina de roedores.**

*Tabla 15 Resumen de los métodos publicados para la recolección de orina de roedores.*

| Investigación                   | Especie    | Intervención | Tiempo de colección | Volumen colectado | Referencia   |
|---------------------------------|------------|--------------|---------------------|-------------------|--------------|
| Micción                         | Rata/Ratón | L            | F                   | 30-100µL          | [94]         |
| Vaso de poliestireno            | Rata       | L            | S, F                | X                 | [32]         |
| Plástico transparente           | Ratón      | L            | S                   | 10-250µl          | [95]         |
| Tubo capilar                    | Ratón      | L            | S                   | X                 | [33]         |
| Quirúrgico                      | Rata       | H            | S                   | 6-10ml/h          | [96]         |
| Embudo de polietileno           | Ratón      | L            | S                   | X                 | [34]         |
| Embudo de aluminio              | Ratón      | L            | S                   | X                 | [35]         |
| Tubo de propileno               | Ratón      | L            | 24 horas            | 0,2-2ml           | [97]         |
| Cubeta de cristal               | Ratón      | L            | S                   | X                 | [98]         |
| Papel de aluminio               | Ratón      | L            | 4 horas             | 1ml               | [99]         |
| Aparato de recolección de orina | Rata       | L            | 48 horas            | 0-7ml             | [100]        |
| Tubo de plexiglás               | Rata       | L            | S                   | X                 | [101]        |
| Recolección a baja temperatura  | Rata       | L            | 16 horas            | 1,2-1,4ml         | [102], [103] |
| Recolección a baja temperatura  | Rata       | L            | 24 horas            | <10ml             | [104]        |

\*X= no hay información, L= bajo, M= moderado, H= alto, S = lento, F= rápido

**9.4 Anexo B1. Materiales para fabricación de la tira rectangular en papel de filtro.**

*Tabla 16 Lista de materiales experimento microdispositivo rectangular.*

| Nombre  | Referencia  |
|---|---|
| Papel de filtro °2  |    |
| 80 µl de solución de verde de bromocresol marca Sigma Aldrich                                 |    |
| 80 µl de solución de albúmina de suero bovino marca Sigma Aldrich. De 5mg/ml de concentración |   |
| 300 µl de orina humana estéril  |  |
| Regla de acetato  |  |
| Papel de parafina   |  |

## Capítulo IX: Anexos

---

Hoja de papel de impresión de  
75 gr/m<sup>2</sup>



Pinzas



Lápiz grafito 2B



Alcohol isopropílico al 70%  
marca Winkler

---

Fuente: Propia.

**9.5 Anexo B2. Materiales para fabricación de  $\mu$ PAD a través de inmersión en parafina.**

*Tabla 17 Materiales fabricación de  $\mu$ PAD a través de inmersión en parafina.*

| Nombre  | Referencia  |
|---|---|
| Papel de filtro $\text{^{\circ}2}$  |    |
| 80 $\mu$ l de solución de verde de bromocresol  |    |
| 80 $\mu$ l de solución de albúmina de suero bovino. De 5mg/ml de concentración, diluida en agua bidestilada |   |
| 300 $\mu$ l de orina humana estéril   |  |
| Regla de acetato  |  |
| Papel de parafina   |  |

Hoja de papel de impresión de 75 gr/m<sup>2</sup>



Pinzas



Lápiz grafito 2B



Hot plate



Matraz de vidrio



Agitador



Parafina sólida



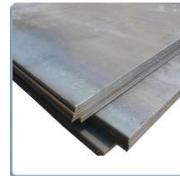
Lamina de vidrio (porta objetos) estériles



Imán de 25mm de diámetro y 2mm de espesor



Plancha laminada A36 de 2mm de espesor



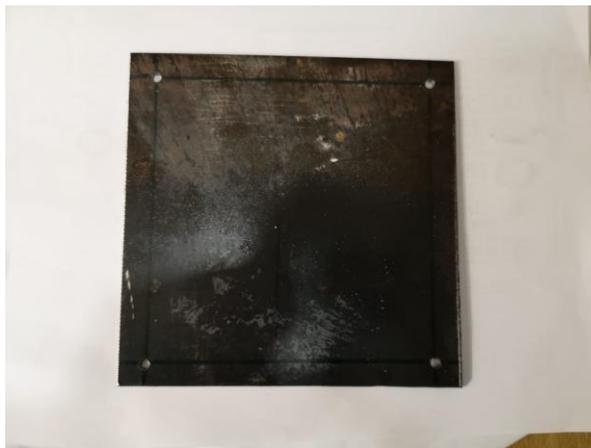
---

Fuente: Propia.

**9.6 Anexo B3. Fabricación de moldes metálicos utilizando el centro de mecanizado CNC ROMI 760.**



*Imagen 72 Trozo de 15x15 cm de plancha laminada acero A36 de 2 mm de espesor. Fuente propia.*



*Imagen 73 Perforaciones a material base de los moldes metálicos. Fuente propia.*



*Imagen 74 Centro de mecanizado vertical CNC ROMI modelo 760 [105].*



*Imagen 75 Material puesto dentro del centro de mecanizado. Fuente propia.*



*Imagen 76 Proceso de mecanizado de material base en el equipo. Fuente propia.*



*Imagen 77 Broca de fresa de 2mm, utilizada para mecanizar el material. Fuente propia.*

### 9.7 Anexo B4 Protocolos de fabricación de Dispositivos.

El protocolo de fabricación para la tira reactiva rectangular en papel de filtro se describe a continuación:

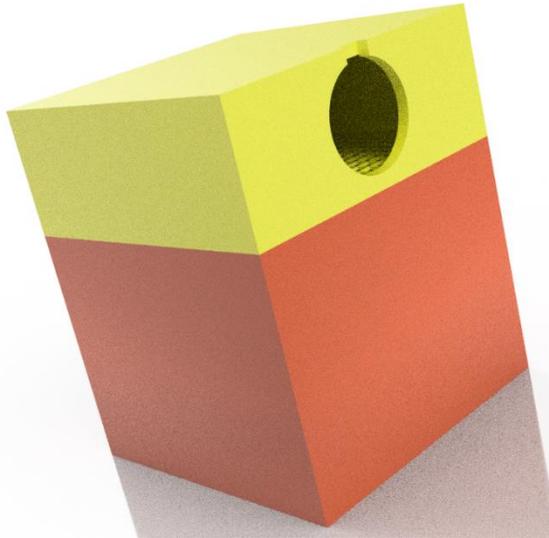
- Se coloca la hoja de papel carta sobre la mesa de trabajo para proporcionar una superficie limpia de trabajo. Sobre el colocar un trozo de papel de parafina para otorgar una superficie hidrofóbica.
- Limpiar todos los instrumentos de trabajo con alcohol etílico 75% (usar guantes quirúrgicos estériles).
- Se marcan cuatro pares de geometrías rectangulares con lápiz grafito 2B, que tengan las dimensiones descritas en la imagen.
- Con la Micropipeta, se debe colocar 3 $\mu$ l de la solución de verde de bromocresol y 2 $\mu$ l de la solución de albúmina de suero bovino.
- Cada par debe ser marcado siguiendo el patrón de las configuraciones A y B, descritas en la imagen 9.
- Finalmente, depositar 30 $\mu$ l, 60 $\mu$ l y 120  $\mu$ l de la muestra de orina en las parejas de tiras reactivas 1, 2 y 3 respectivamente. El cuarto par es utilizado como método de comprobación y en él, se depositan 30 $\mu$ l de Agua bidestilada.

## Capítulo IX: Anexos

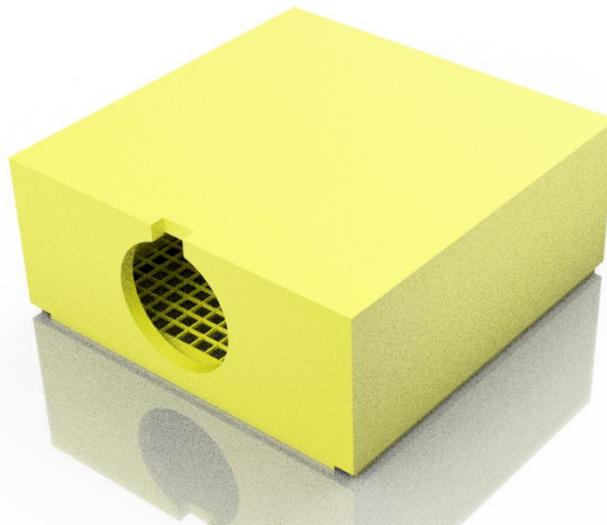
El protocolo de fabricación de  $\mu$ PAD por inmersión de parafina se describe a continuación:

- Seguir el protocolo de limpieza y superficie de trabajo, descrita en el protocolo anterior.
- Marcar con el lápiz grafito 2B, quince cuadrados de 26mm de lado en el papel de filtro y cortarlos.
- Cortar láminas del bloque de parafina sólida y ponerlas dentro de n matraz de vidrio. Luego poner a calentar el matraz en un hot plate a 100°C. Agitar hasta que la parafina esté completamente líquida.
- Utilizando la pinza de trabajo, acoplar el sistema colocando una lámina de vidrio, cuadrado de papel de filtro y molde metálico, en ese orden. Luego, por la cara libre del vidrio, colocar el imán.
- Una vez acoplado el conjunto, sumergir dentro de la parafina derretida por 1 segundo. Retirar del matraz y dejar enfriar por al menos 30 segundos.
- Finalmente, retirar el imán y posteriormente el molde metálico. Teniendo precaución de no contaminar la zona hidrofílica del papel al interior de la geometría.

**9.8 Anexo C1. Diseño 3D de componentes prototipo 1.**



*Imagen 78 Primera propuesta de solución. Fuente propia.*



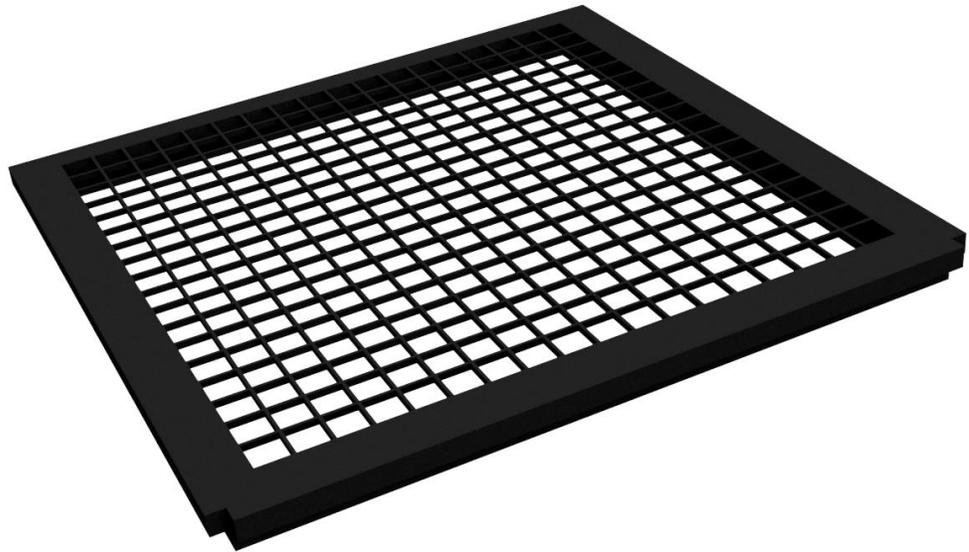
*Imagen 79 Parte superior. Fuente propia.*



*Imagen 80 Muro trasero. Fuente propia.*



*Imagen 81 Compartimiento del cebo. Fuente propia.*



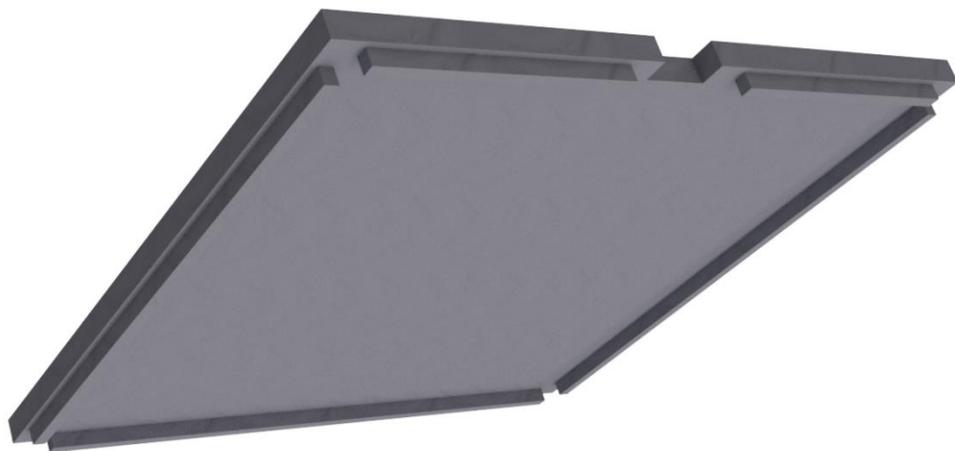
*Imagen 82 Piso parte superior. Fuente propia.*



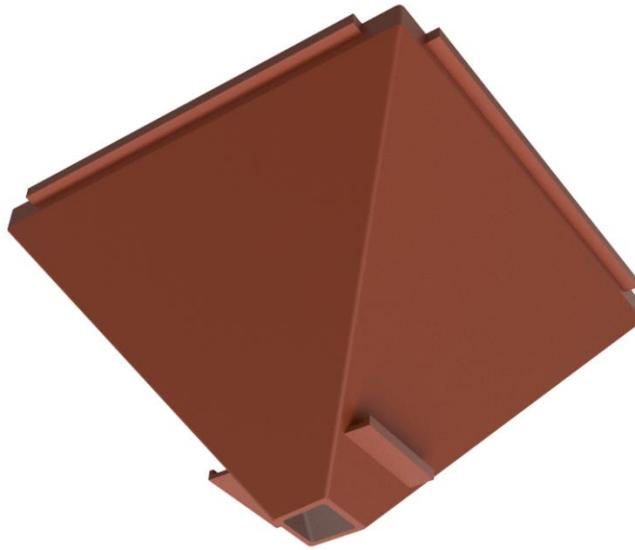
*Imagen 83 Muro frontal. Fuente propia.*



*Imagen 84 Paredes. Fuente propia.*



*Imagen 85 Techo. Fuente propia.*



*Imagen 86 Embudo A vista inferior. Fuente propia.*



*Imagen 87 Embudo A vista superior. Fuente propia.*



*Imagen 88 Dispositivo de rebote. Fuente propia.*



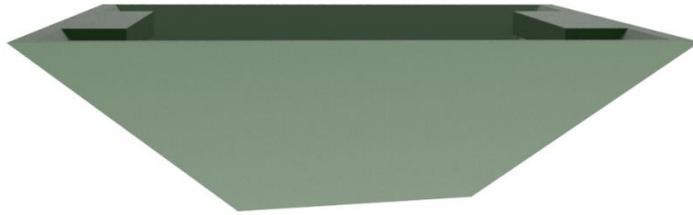
*Imagen 89 Embudo B vista superior. Fuente propia.*



*Imagen 90 Embudo B vista lateral. Fuente propia.*



*Imagen 91 Embudo C. Fuente propia.*



*Imagen 92 Embudo C vista lateral. Fuente propia.*



*Imagen 93 Vaso de Pitágoras. Fuente propia.*



*Imagen 94 Vista en corte del vaso de Pitágoras. Fuente propia.*

## 9.9 Anexo C2. Código de programación en Arduino prototipo 1.

```

CODIGO_COMPLETO  RGB  TIMER  pir  senData  servo
1 //-----variable RGB-----
2 #define S0 3
3 #define S1 4
4 #define S2 5
5 #define S3 6
6 #define sensorOut 7
7 int frecuencia = 0;
8 boolean esColor = false;
9 int R;
10 int G;
11 int B;
12 //-----variable PIR-----
13 const int PIRPin = 2;
14 int pirState = LOW;
15 int val = 0;
16 boolean seMovio = false;
17 //-----variable TIMER-----
18 boolean t = true;
19 boolean tCumplido =false;
20 int mili;
21 int tActual;
22 boolean tReset = true;
23 //-----variable SERVO-----
24 #include <Servo.h>
25 Servo servo;
26 int pos = 0;
27
28 //-----
29
30 void setup() {
31   Serial.begin(9600);
32
33   //-----RGB-----
34   pinMode(S0, OUTPUT);
35   pinMode(S1, OUTPUT);
36   pinMode(S2, OUTPUT);
37   pinMode(S3, OUTPUT);

```

*Imagen 95 Sketch código completo. Fuente propia.*

```

CODIGO_COMPLETO  RGB  TIMER  pir  sendData  servo
38  pinMode(sensorOut, INPUT);
39
40  // Setting frequency-scaling to 20%
41  digitalWrite(80,HIGH);
42  digitalWrite(81,LOW);
43
44
45  //-----PIR-----
46  pinMode(PIRPin, INPUT);
47
48  //-----SERVO-----
49  servo.attach(9);
50
51 }
52
53 //-----
54
55 void loop() {
56   pir();
57   // timer();
58
59   if(seMovio){
60
61     if(tReset){
62       tActual = millis();
63       tReset=false;
64     }
65
66     moverServo(1);
67
68     if((millis()-tActual)>36000){
69
70       for(int i=0;i<=100;i++){
71         RGB();
72       }
73       if (esColor){
74         envioDatos(1);

```

*Imagen 96 Sketch código completo. Fuente propia.*

```

75     }else{
76       envioDatos(0);
77       moverServo(0);
78     }
79   }
80 }
81 }
82 }

```

*Imagen 97 Sketch código completo. Fuente propia.*

```

CODIGO_COMPLETO  RGB  TIMER  pir  senData  servo
1 void RGB () {
2
3   if (t){
4     delay(5000);
5     t = false;
6   }
7
8
9   //-----calcular variable R G B
10  // Setting red filtered photodiodes to be read
11  digitalWrite(S2,LOW);
12  digitalWrite(S3,LOW);
13  // Reading the output frequency
14  frecueny = pulseIn(sensorOut, LOW);
15  R = frecueny;
16  delay(100);
17  // Setting Green filtered photodiodes to be read
18  digitalWrite(S2,HIGH);
19  digitalWrite(S3,HIGH);
20  // Reading the output frequency
21  frecueny = pulseIn(sensorOut, LOW);
22  // Printing the value on the serial monitor
23  G = frecueny;
24  delay(100);
25  // Setting Blue filtered photodiodes to be read
26  digitalWrite(S2,LOW);
27  digitalWrite(S3,HIGH);
28  // Reading the output frequency
29  frecueny = pulseIn(sensorOut, LOW);
30  // Printing the value on the serial monitor
31  B =frecueny;
32  delay(100);
33
34
35  //-----mostar en montor -----
36
37  Serial.print(" ");

```

*Imagen 98 Sketch sensor RGB. Fuente propia.*

```
38 Serial.print("R");
39 Serial.print(R);
40 Serial.print(" ");
41 Serial.print("G");
42 Serial.print(G);
43 Serial.print(" ");
44 Serial.print("B");
45 Serial.print(B);
46
47
48 //-----comparar las variable RGB-----
49
50
51 if (R>130 && R<180 && G>5 && G<70 && B>140 && B<255 ){
52
53   esColor=true;
54   Serial.print("color detectado");
55
56 }
57 }
```

*Imagen 99 Sketch sensor RGB. Fuente propia.*



```
1 void timer() {
2   mili = millis()/1000;
3
4   if (mili == 36){
5     tCumplido = true;
6   }
7   else{
8     tCumplido = false;
9   }
10 }
```

*Imagen 100 Sketch TIMER Fuente propia.*

```
CODIGO_COMPLETO  RGB  TIMER  pir  senData  servo

1 void pir(){
2
3   val = digitalRead(PIRPin);
4   if (val == HIGH) //si está activado
5   {
6
7       if (pirState == LOW) //si previamente estaba apagado
8       {
9           Serial.println("Sensor activado");
10          pirState = HIGH;
11          seMovio = true;
12      }
13  }
14  else //si esta desactivado
15  {
16
17      if (pirState == HIGH) //si previamente estaba encendido
18      {
19          Serial.println("Sensor parado");
20          pirState = LOW;
21      }
22  }
23  }
24
25 }
```

*Imagen 101 Sketch sensor PIR. Fuente propia.*

```
CODIGO_COMPLETO  RGB  TIMER  pir  senData  servo

1 void moverServo(int s){
2
3   if(s==0){
4       servo.write(180); //poscicion 1 del servo
5   }
6   if (s==1){
7       servo.write(0); // posccion 2 del servo
8   }
9 }
```

*Imagen 102 Sketch Servomotor. Fuente propia.*

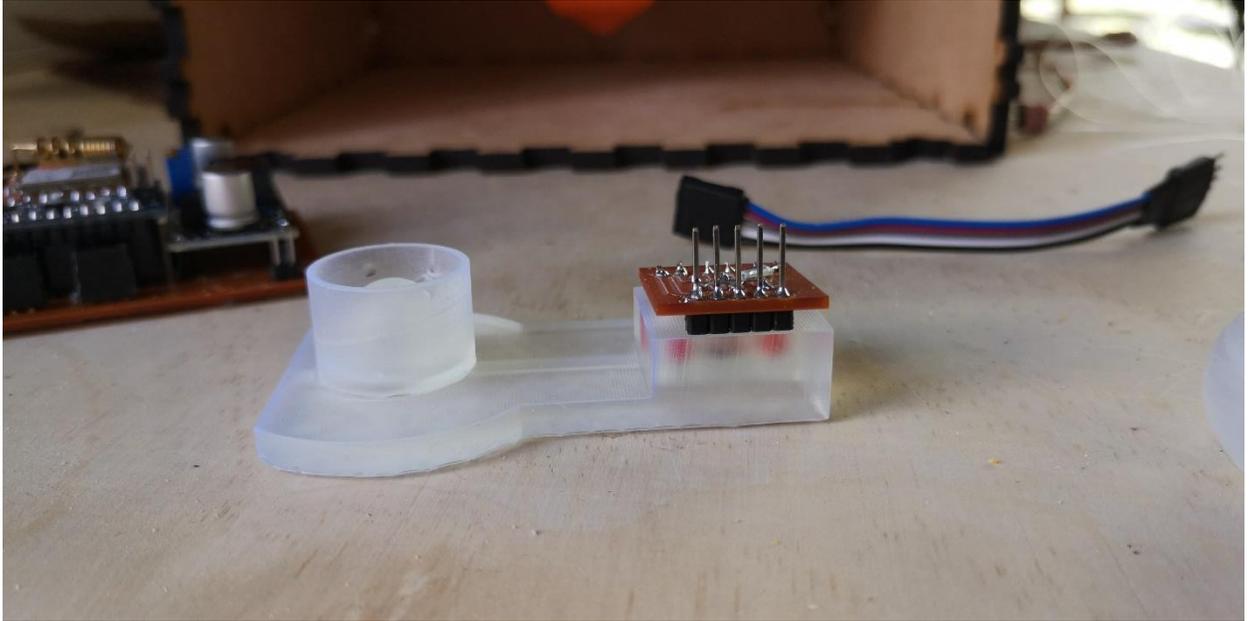
9.10 Anexo C3. Resultado fabricación prototipo 1.



*Imagen 103 Vista frontal. Fuente propia.*



*Imagen 104 Vista interior sección 2. Fuente propia.*



*Imagen 105 Close-up electrónica y detección de muestra. Fuente propia.*

9.11 Anexo C4. Archivo board y esquemático del prototipo 1.

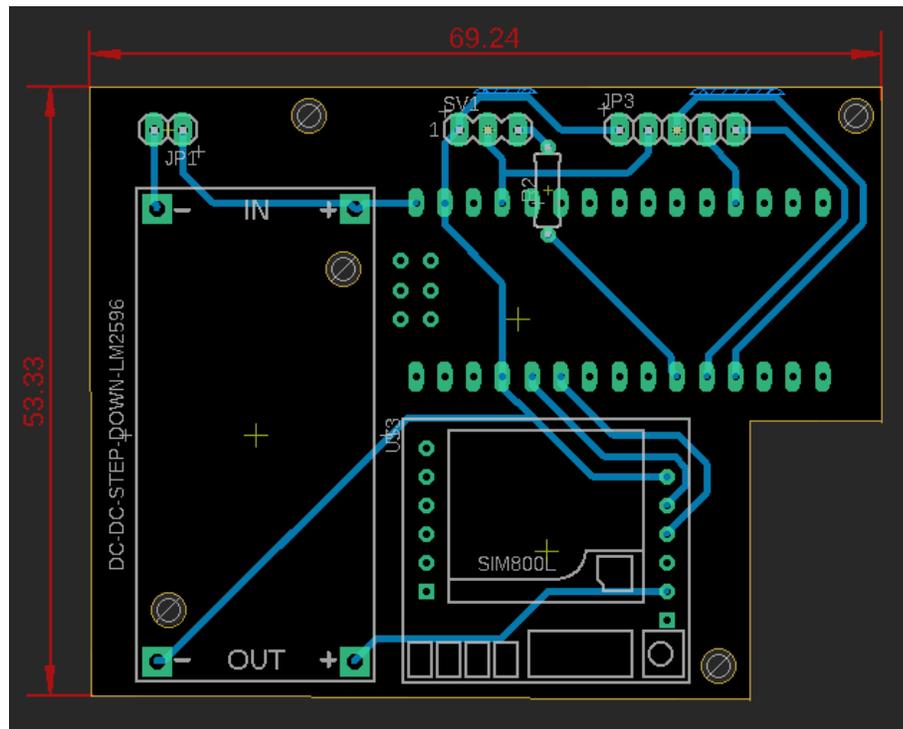


Imagen 106 Archivo board prototipo 1. Fuente propia.

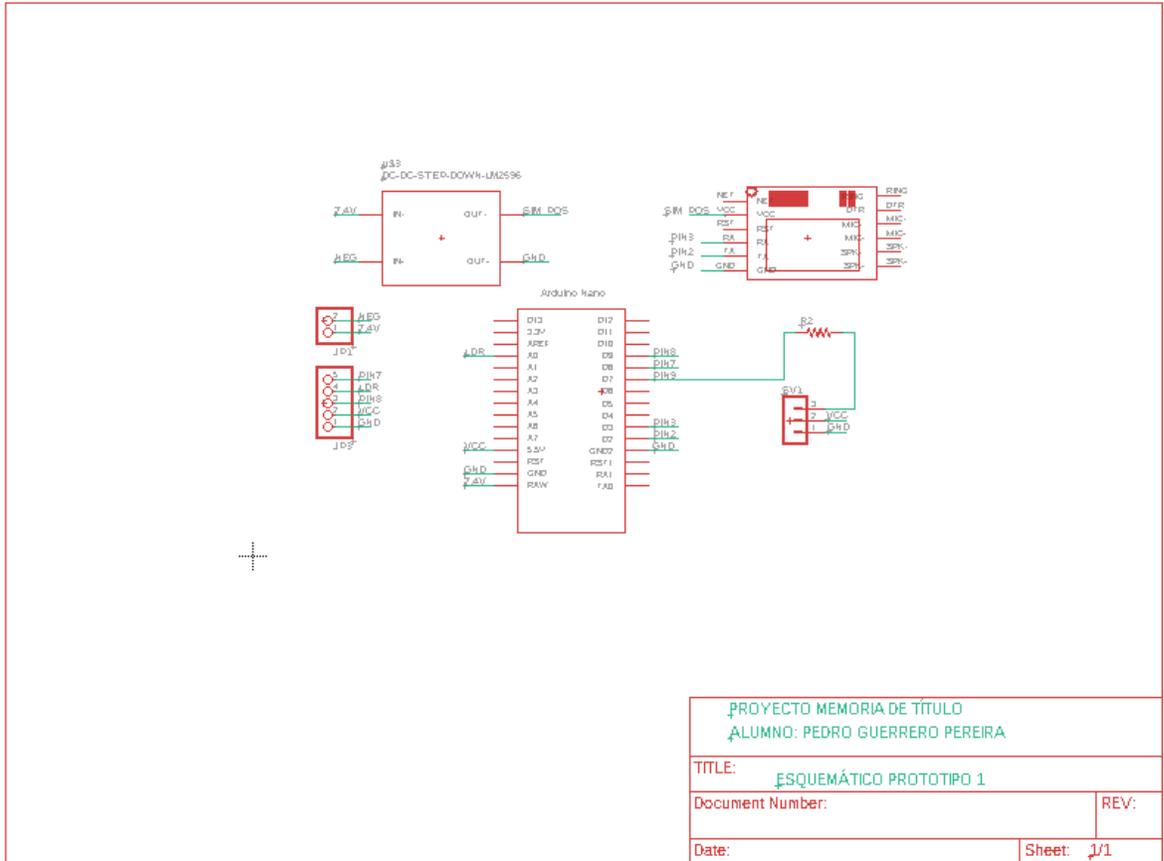
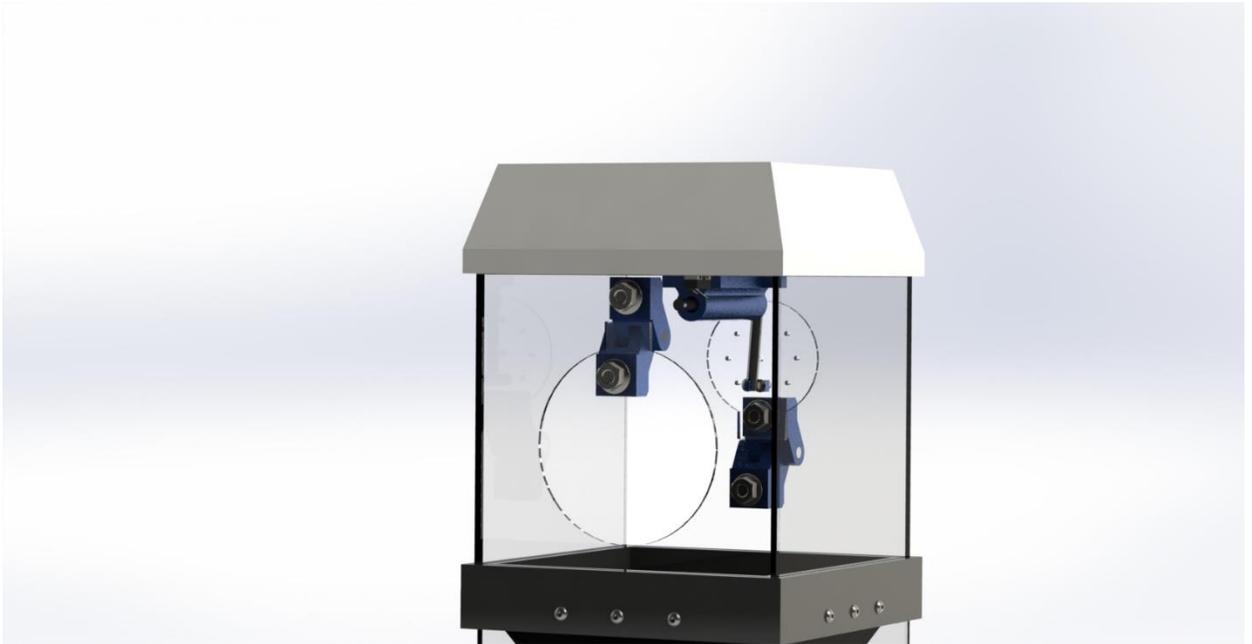
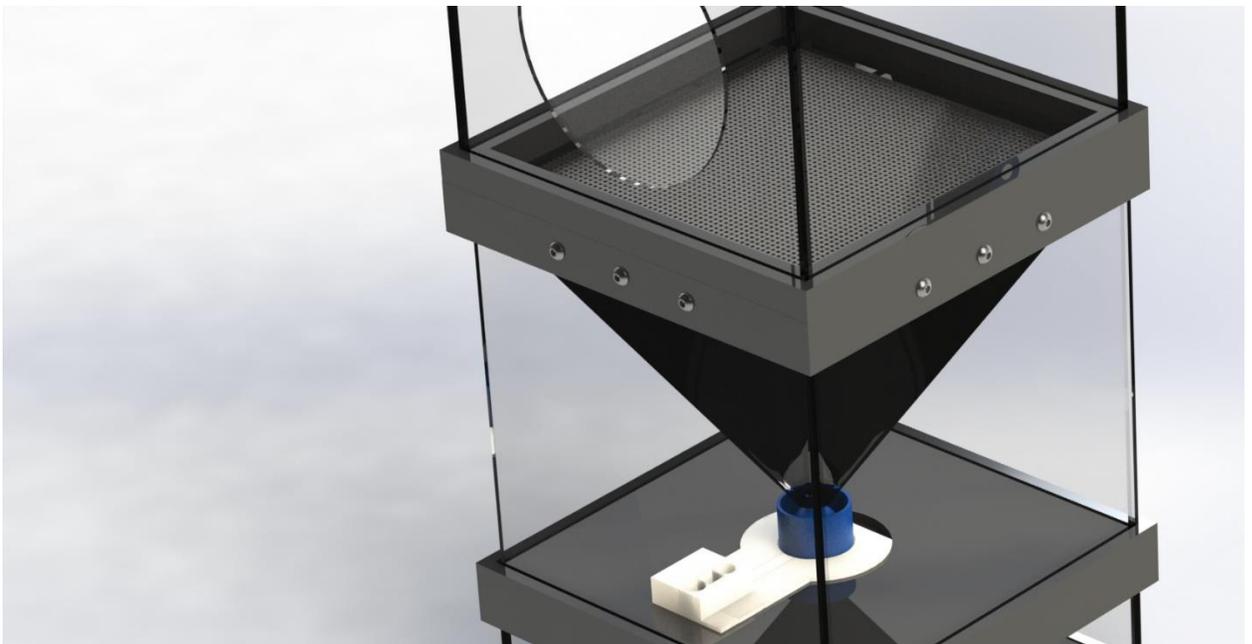


Imagen 107 Esquemático prototipo 1. Fuente propia.

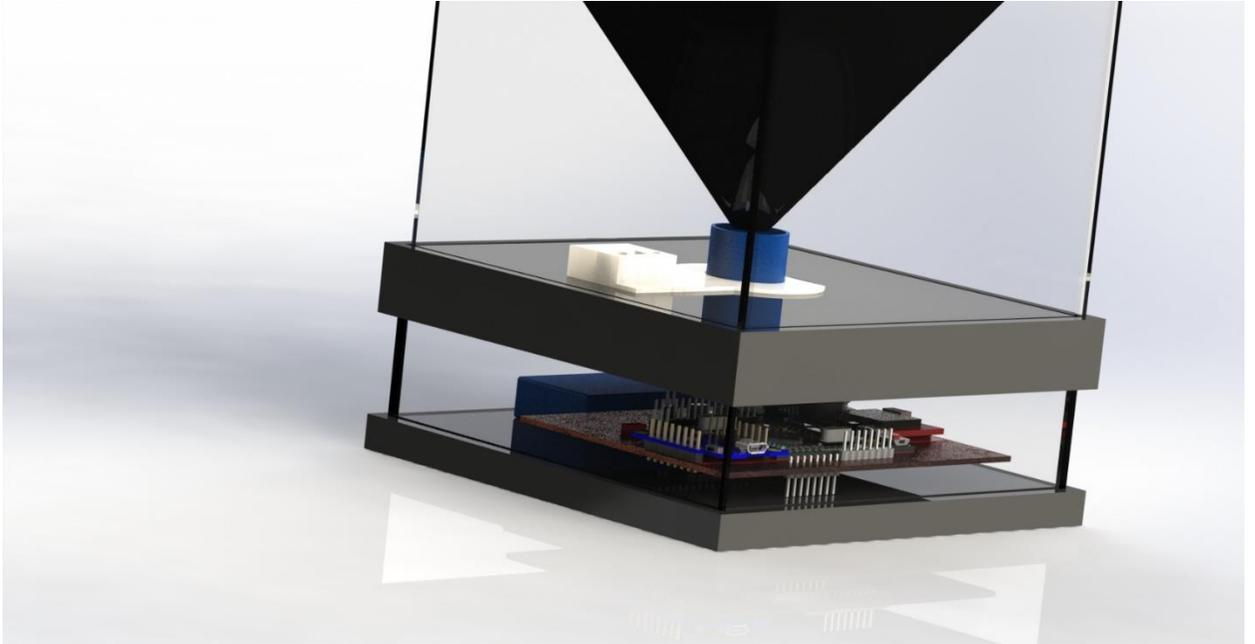
**9.12 Anexo C5. Diseño 3D de componentes prototipo 2.**



*Imagen 108 Nivel 1 de captura. Fuente propia.*



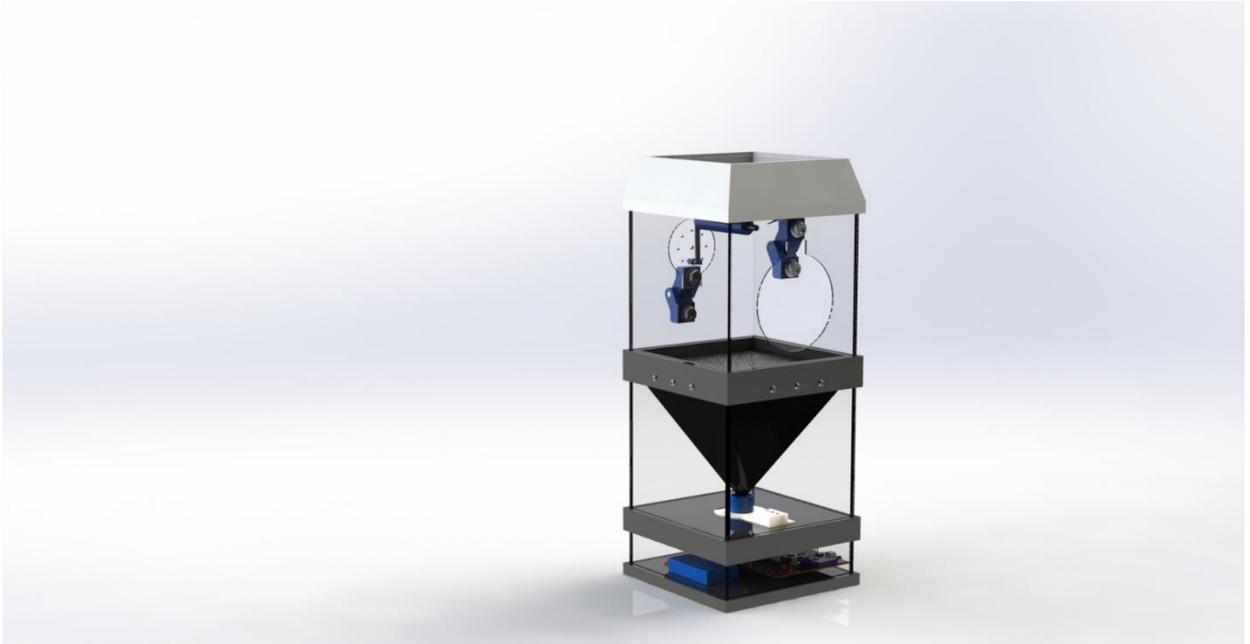
*Imagen 109 Nivel 2 de separación y colección. Fuente propia.*



*Imagen 110 Nivel 3 electrónica. Fuente propia.*



*Imagen 111 Ensamblaje 2° prototipo. Fuente propia.*



*Imagen 112 Ensamblaje 2° prototipo. Fuente propia.*



*Imagen 113 Embudo. Fuente propia.*

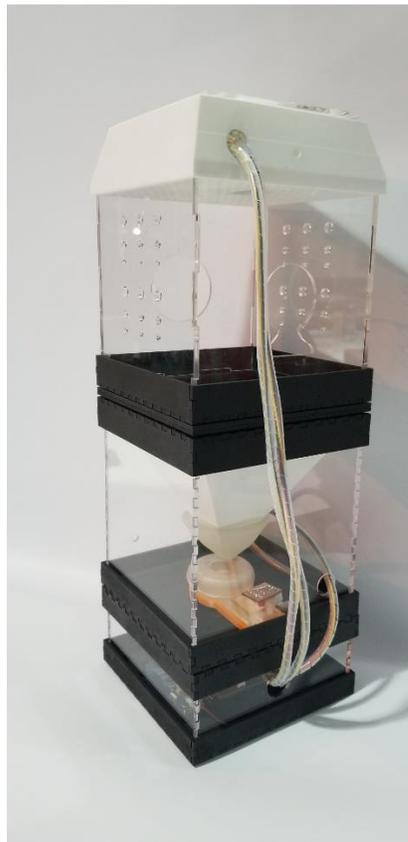


*Imagen 114 Filtro. Fuente propia.*

**9.13 Anexo C6. Resultado fabricación prototipo 2.**



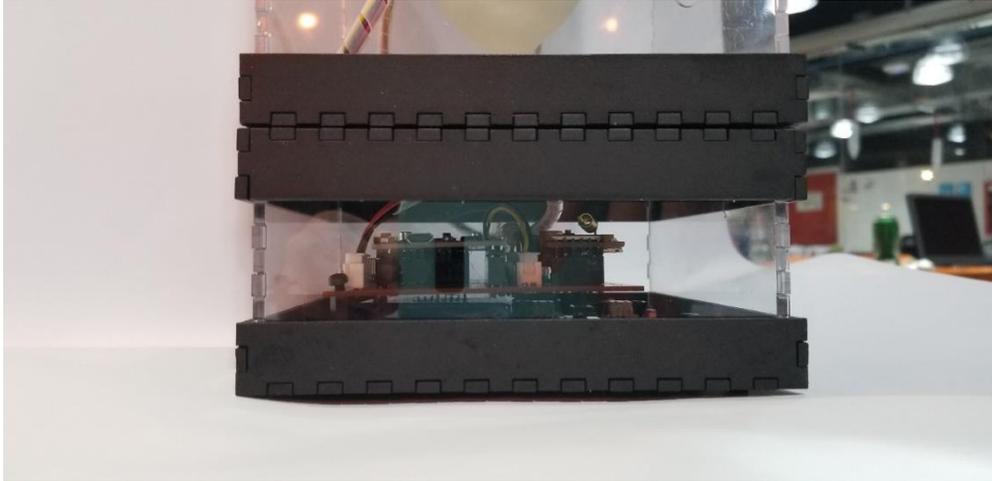
*Imagen 115 Vista de los tres niveles separados. Fuente propia.*



*Imagen 116 Unión de los tres niveles. Fuente propia.*



*Imagen 117 Vista lateral unión de los tres niveles. Fuente propia.*



*Imagen 118 Close-up tercer nivel: electrónica. Fuente propia.*



*Imagen 119 Close-up segundo nivel: Separación y colección de muestra. Fuente propia.*

9.14 Anexo C7. Archivo board y esquemático prototipo 2.

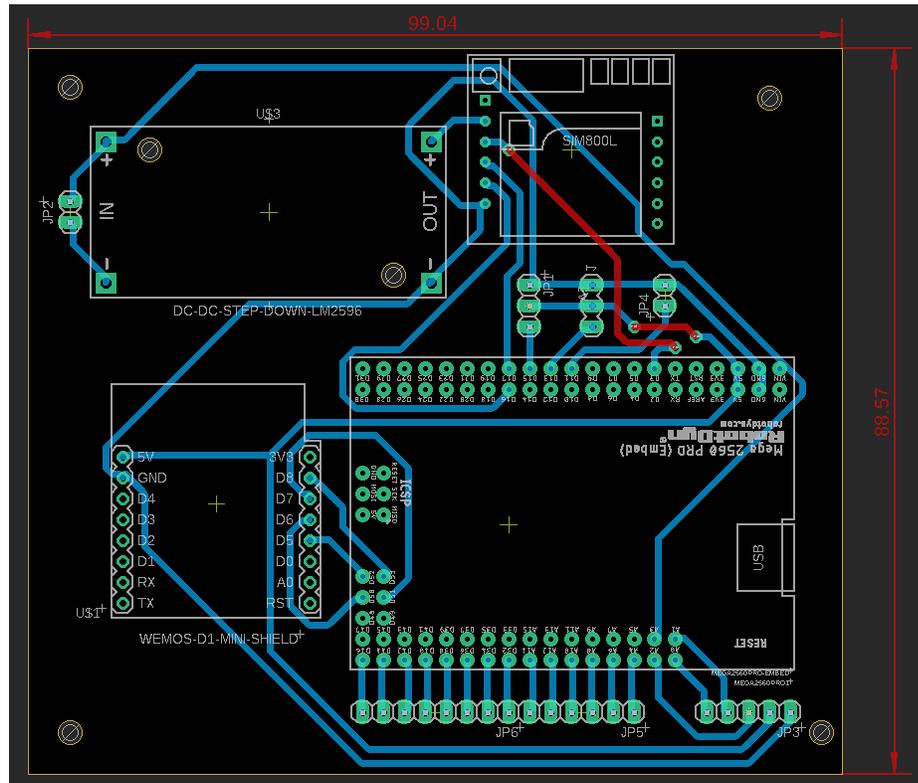


Imagen 120 Archivo board prototipo 2. Fuente propia.

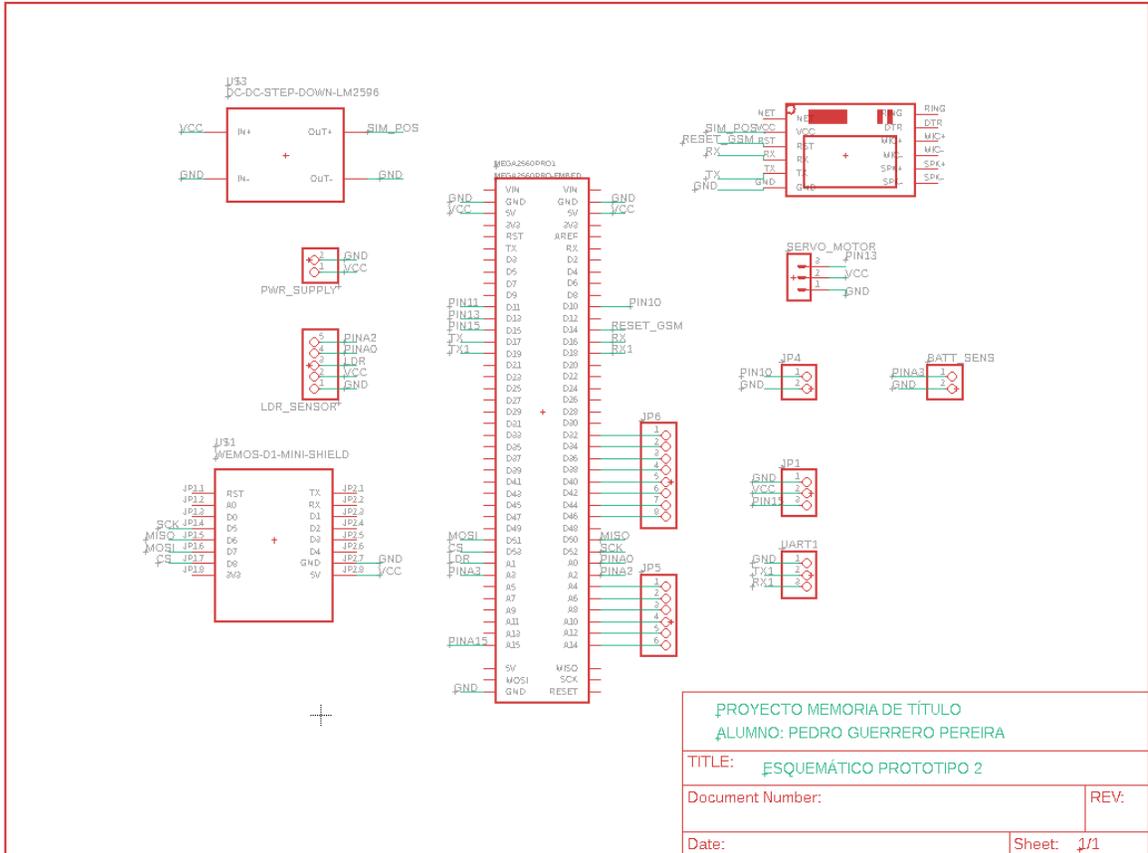


Imagen 121 Esquemático prototipo 2. Fuente propia.

**9.15 Anexo C8. Datos técnicos de los componentes electrónicos seleccionados**

Tabla 18 Datos técnicos de los microprocesadores utilizados en el prototipo 1 y en el prototipo 2.

| Componente         | Procesador  | Voltaje de operación y entrada | Velocidad de CPU    | Entradas y salidas análogas | Entradas digitales y PWM | Puerto USB |
|--------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|------------|
| Arduino Pro Mini   | ATmega 328P | Versión 1<br>3.3V/3.35-12V     | Versión 1<br>8 MHz  | 6/0                         | 14/6                     | -          |
| Mega 2560 Pro Mini | ATmega 2560 | Versión 2<br>5V/5-12V          | Versión 2<br>16 MHz | 16/0                        | 54/15                    | Micro      |

Fuente: [85].

Tabla 19 Datos técnicos de los componentes y sensores seleccionados para los prototipos 1 y 2.

| Componente                    | Output  | Rango Sensitivo/descripción                                | Alimentación de energía |
|-------------------------------|---|--|-------------------------|
| Sensor de Movimiento PIR      | Digital   | Máximo de 6 metros con un rango de detección de 110° x 70° | 5V - 12V                |
| Módulo de sensor TAOS TCS3200 | Onda cuadrada proporcional a la intensidad luminosa | 61% - 84% azul<br>22% - 43% verde<br>0% - 6% rojo          | 2.7V - 5.5 V            |
| Sensor DHT11                  | Digital   | 20% - 90% humedad relativa<br>0 - 50°C                     | 3V - 5.5V               |
| Sensor de nivel de agua       | Análogo   | Área de detección 40mm x 16mm                              | 5V                      |

|                               |   |                                     |   |
|-------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| Sensor ultrasónico<br>HC-SR04 | Digital con<br>utilización de una<br>conexión PWM       | Rango desde<br>2 – 400 cm           | 5V  |
| Datalogger Shield             | Digital   | Tarjetas SD tipo<br>FAT16 o FAT32   | 5V dependiendo del<br>modelo si tiene<br>regulador de voltaje<br>para la tarjeta SD |
| Módulo SIM-800L               | Comunicación<br>UART con RX y TX<br>del microprocesador | Tarjeta SIM, FM,<br>GPRS, SMS y GSM | 3.7V – 4.2V   |

Fuente: [85].

*Tabla 20 Datos técnicos de los servomotores seleccionados para los prototipos 1 y 2.*

| Componente       | Torque                               | Peso  | Voltaje   | Dirección de<br>giro                      |
|------------------|--------------------------------------|-------|-----------|---|
| Servo motor SG90 | 2.5 kg-cm                            | 14.7g | 4.8V – 6V | 180° de giro, 90°<br>en cada<br>dirección |
| JX PDI-6221MG    | 17.25kg-cm a 4.8V<br>20.32kg-cm a 6V | 62g   | 4.8V – 6V | 360° de giro                              |

Fuente: [85].

