

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS
**“DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN ANALIZADOR
COMPACTO DE IMPEDANCIAS PARA APLICACIONES
MÉDICAS Y BIOLÓGICAS”**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN FÍSICA MÉDICA

ELABORADA POR:

OSCAR ROLANDO BALTUANO ELÍAS

ASESOR:

Dr. JUAN MARTÍN RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

LIMA – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Ninoska, por el inmenso amor y cariño que se desprende al compartir nuestra vidas.

A nuestras pequeñas Natalia y Valeska por quienes y para quienes todo lo que hacemos adquiere un adorable sentido.

A la memoria de mis Padres, Hermilio y Eulalia, porque desde donde están aún mantienen viva mi motivación para seguir mejorando.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración desinteresada de muchos colegas que han contribuido con lo mejor de sus conocimientos y habilidades para el logro de estos resultados.

Por ello, quiero expresar mi mayor agradecimiento a:

- Dr. Juan Agapito Panta, responsable del Laboratorio de Biología Molecular del IPEN, por haberme brindado todas las facilidades y su valiosa experiencia para realizar el trabajo de laboratorio en microbiología.
- Todos quienes conforman el magnífico grupo multidisciplinario de desarrollo tecnológico de la Sub-Dirección de Desarrollo Tecnológico del IPEN y en el cual tengo el privilegio de compartir experiencias con: Ing. Renzo Chan Ríos, Mg. Javier Gago Campusano y Yuri Hernández Paravecino.
- A Mónica Vivanco, Ángel Montes y Leocadio Huamán de quienes siempre he recibido su mayor disposición.
- Al Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) por permitirme realizar mis actividades de investigación y desarrollo.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE FIGURAS, IMÁGENES E ILUSTRACIONES	vi
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
Fundamentos.....	1
Objetivos	3
Metodología.....	3
CAPITULO 1: IMPEDANCIA ELÉCTRICA	5
1.1 Definición.....	5
1.2 Medición de la impedancia.....	9
1.3 Espectroscopia de impedancia	10
1.4 Representación de espectros de impedancia.....	12
1.5 Diagramas de Bode	12
1.6 Diagrama de Nyquist o Cole-Cole.....	13
CAPITULO 2: MICROBIOLOGÍA DE IMPEDANCIA	16
2.1 Antecedentes.....	16
2.2 Técnicas de medición	19
2.3 Modelamiento con circuitos equivalentes.....	21
CAPITULO 3: DESARROLLO DEL EQUIPO DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA	23
3.1 Diagrama de bloques.....	23
3.2 Analog Discovery 2.....	24
3.3 Resistencia de shunt y multiplexor de electrodos.....	26
3.4 Orange Pi	28
3.5 Pantalla táctil	30
3.6 Electrodo.....	31
3.7 Sonda de medición	33

3.8 Integración y ensamblado	34
3.9 Calibración con circuitos patrón	36
CAPITULO 4: PRUEBAS DE LABORATORIO Y RESULTADOS	39
4.1 Medio de Cultivo	39
4.2 Arreglo experimental.....	40
4.3 Esterilización de electrodos	41
4.4 Determinación del rango de frecuencias	43
4.5 Espectros temporales de medio de cultivo limpio.....	47
4.6 Estudio de medio de cultivo con <i>E. Coli</i>	51
4.7 Estudio de medio de cultivo contaminado	55
CAPITULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
5.1 Conclusiones	57
5.2 Recomendaciones	58
BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXOS	64
ANEXO A: Script utilizado para la operación del equipo	64
ANEXO B: Diagrama de tarjeta para selección de resistencia shunt.....	67
ANEXO C: Diagrama de tarjeta de selección de electrodo	68

INDICE DE FIGURAS, IMÁGENES E ILUSTRACIONES

	Página
Figura 1: Representación de las magnitudes involucradas en el cálculo de una resistencia	5
Figura 2: Desfase entre la señal de voltaje y corriente que circula a través de un capacitor.	7
Figura 3: Desfase entre la señal de voltaje y corriente que circula a través de un inductor	8
Figura 4: Determinación de la impedancia a través de la medición de la corriente (I) sobre un dispositivo bajo análisis (DUT) para un voltaje de entrada conocido (VAC)	9
Figura 5: Configuración para medición de la impedancia (Z) de un elemento de interés (DUT) utilizando una resistencia <i>shunt</i> conocida	10
Figura 6: Ejemplo de un arreglo experimental para realizar espectroscopía de impedancia	11
Figura 7: Representación como diagrama de Bode de la impedancia resultante	13
Figura 8: Representación como diagrama de Nyquist de la impedancia resultante	14
Figura 9: Representación en la forma habitual en forma de diagrama de Nyquist de la impedancia	15
Figura 10: Representación de los principales mecanismos que contribuyen al cambio de la impedancia eléctrica del medio de cultivo	19
Figura 11: Correlación entre el crecimiento de microorganismos y la impedancia del medio del cultivo en función del tiempo	20
Figura 12: Espectro del módulo de la impedancia de un circuito equivalente con 2 condensadores y una resistencia en serie	21

Figura 13:	Diagrama de bloques simplificado del espectrómetro de impedancias multi-electrodo	24
Figura 14:	Módulo Analog Discovery 2	25
Figura 15:	Configuración utilizada para medición de impedancia utilizando una resistencia de <i>shunt</i> , un generador de funciones y las dos entradas de osciloscopio del módulo AD2	25
Figura 16:	Tarjeta selectora de resistencia de <i>shunt</i> fabricada para el espectrómetro y acoplada con módulo AD2	27
Figura 17:	Tarjeta selectora de electrodo y cuatro tarjetas apiladas para operar con igual número de electrodos	28
Figura 18:	Vista superior e inferior de una tarjeta Orange Pi PC Plus similar a la integrada en el espectrómetro de impedancia desarrollado.	30
Figura 19:	Pantalla TFT de 7 pulgadas con membrana táctil capacitiva utilizada para la interface con el usuario del equipo.	31
Figura 20:	Electrodo utilizado para las pruebas	32
Figura 21:	Imagen del electrodo montado sobre tarjeta adaptadora	33
Figura 22:	Sonda de medición	34
Figura 23:	Imagen de la parte frontal del equipo mostrando la pantalla TFT para interacción con el usuario	35
Figura 24:	Imagen de la parte interior del equipo con la descripción de cada componente	35
Figura 25:	Imagen de la parte posterior del equipo	36
Figura 26:	Circuito patrón utilizado para evaluar la respuesta del equipo	37
Figura 27:	Diagrama de Nyquist de la respuesta del equipo para el circuito patrón utilizado	37
Figura 28:	Arreglo experimental utilizado para medición de impedancia en medios de cultivo	40
Figura 29:	Microorganismos ambientales provenientes del electrodo	41

Figura 30:	Daños producidos en el electrodo y tarjeta adaptadora por bacilos esporulados ambientales	42
Figura 31:	Comparación del efecto entre procesos de esterilización	43
Figura 32:	Diagramas de Bode sucesivos de medio de cultivo limpio en el rango de 100 Hz a 1 MHz	45
Figura 33:	Diagramas de Bode sucesivos de medio de cultivo limpio en el rango de 10 Hz a 100 KHz	46
Figura 34:	Diagramas del módulo de la impedancia de 31 espectros de medio de cultivo limpio en intervalos de 45 minutos	47
Figura 35:	Variación del módulo de la impedancia en función del tiempo del medio de cultivo esterilizado	49
Figura 36:	Regiones identificadas durante el proceso de estabilización del medio de cultivo	50
Figura 37:	Variación del módulo de la impedancia en función del tiempo del medio de cultivo sobre el que ha insertado una muestra de <i>e. Coli</i>	52
Figura 38:	Regiones identificadas en la variación del módulo de la impedancia del medio de cultivo a 100 Hz	53
Figura 39:	Colonias de E. Coli del medio de cultivo	54
Figura 40:	Grafico mostrando los cambios en el módulo de impedancia del medio de cultivo durante las 52 horas	54
Figura 41:	Variación en el tiempo del módulo de la impedancia de medio de cultivo contaminado con bacilos esporulados y cocos ambientales	56

RESUMEN

La espectroscopia de impedancia eléctrica (EIS) es una herramienta poderosa de análisis cuyas aplicaciones son diversas. En el ámbito biomédico su utilidad ha sido demostrada a través de los últimos años con el incremento significativo del número de investigaciones y publicaciones realizadas. Sin embargo, a pesar de ello y del gran potencial para realizar investigación y desarrollo de la técnica, a nivel local, sus aplicaciones son prácticamente inexistentes. Posiblemente, la principal limitación para desarrollar esta línea de investigación es la falta de equipos adecuados, los mismos que tienden a ser muy costosos y complejos.

Este trabajo pretende aportar a la reducción de estas limitaciones mediante el desarrollo y puesta en operación de un espectrómetro de impedancias compacto, con capacidad multi-electrodo, altamente configurable y de costo considerablemente menor comparado con el de los equipos comerciales similares. Aunque un instrumento de estas características posee un rango muy amplio de posibilidades, para este trabajo se ha realizado la validación y determinación de las mejores condiciones para ser utilizado específicamente en microbiología de impedancias, es decir, la caracterización de microorganismos a través del estudio de las variaciones de la impedancia del medio de cultivo sobre el cual se desarrollan en condiciones controladas.

El instrumento que se ha desarrollado puede adecuarse a las condiciones específicas de diversas aplicaciones, además de permitir su actualización, mejora o modernización, su adaptación para la realización de otros experimentos o el añadido de nuevas funcionalidades. Todo esto sin necesidad realizar gastos significativos.

El equipo ha sido probado satisfactoriamente para estudiar primeramente el comportamiento temporal de la impedancia del medio de cultivo TSB (Tryptic Soy Broth) y el posterior efecto que se produce por la inserción de una cepa de E. Coli. Asimismo, también ha permitido evaluar las variaciones de la impedancia del mismo medio de cultivo contaminado con otros microorganismos como bacilos esporulados y cocos ambientales. Para ello, ha sido necesario establecer un arreglo experimental y un procedimiento adecuado para garantizar los mejores resultados. Los detalles sobre el procedimiento y arreglo experimental utilizado también son explicados.

ABSTRACT

Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) is a powerful analysis tool whose applications are diverse. In biomedical applications, its usefulness has been demonstrated in recent years by the significant increase in the number of investigations and publications carried out. However, despite this and the great potential to carry out research and development of the technique, at the local level, its applications are practically non-existent. Probably, the main limitation to develop this kind of research is the lack of adequate equipment, which usually to be very expensive and complex.

This work aims to contribute to the reduction of these limitations by developing and putting into operation a compact impedance spectrometer, with multi-electrode capacity, highly configurable and considerably lower cost compared to similar commercial equipment. Although an instrument of these characteristics has a very wide range of possibilities, for this work the validation and determination of the best conditions to be used specifically in impedance microbiology has been carried out, that is, the characterization of microorganisms through the study of variations in the impedance of the culture medium on which they develop under controlled conditions.

The instrument that has been developed can be adapted to the specific conditions of various applications, in addition to allowing its updating, improvement or modernization, its adaptation for the performance of other experiments or the addition of new functionalities. All this without the need to make significant expenses.

The equipment has been successfully tested to study first the temporal behavior of the impedance of TSB (Tryptic Soy Broth) medium and the subsequent effect that is produced after the insertion of an *E. Coli* sample. Likewise, it has also allowed to evaluate the variations in the impedance of the same medium but contaminated with other microorganisms such as sporulated bacilli and environmental coccus. For this, it has been necessary to establish an experimental arrangement and an adequate procedure to guarantee the best results. Details about the procedure and experimental arrangement used are also explained.

INTRODUCCIÓN

La impedancia eléctrica es una propiedad física de los materiales y/o tejidos biológicos que depende de múltiples variables físicas, químicas y en el caso de los materiales biológicos, también del tipo de tejido o metabolismo celular de éste. La forma más simple de impedancia es denominada resistencia y se refiere a la oposición que presenta un material al paso de una corriente eléctrica constante o continua. La propiedad inversa de la resistencia, referida a la facilidad con que un material permite el paso de una corriente eléctrica es denominada conductancia.

La interpretación anterior es menos evidente cuando intentamos explicar el mismo fenómeno de resistencia pero en el caso que la señal de corriente o voltaje aplicado a un material no es constante sino variable en forma de una onda sinusoidal de una determinada frecuencia. La resistencia en estas condiciones es denominada de forma más general como impedancia y su valor depende no sólo de las condiciones físicas, químicas o biológicas del material sino también de la frecuencia de la señal. La magnitud de esta impedancia, de acuerdo con la ley de Ohm, vendrá determinada por la relación entre la amplitud entre las señales de voltaje que se aplican a la muestra y la señal de corriente que se obtiene. No obstante otro parámetro importante que aparece cuando se aplican señales sinusoidales es retardo o adelanto de la señal de corriente con respecto a la señal de voltaje. Esta diferencia temporal es conocida como fase de la impedancia.

Bajo este análisis, la impedancia es una magnitud compleja que posee magnitud y fase y cuyos valores dependen de la frecuencia de la señal de excitación. Por extensión, esto da origen a la técnica de espectroscopía de impedancias que se encarga del estudio de las variaciones de la impedancia con la frecuencia en combinación con otras variables sobre una muestra en estudio.

Fundamentos y motivación

Esta técnica de análisis es muy poderosa y su ámbito de aplicación es muy amplio habiéndose extendido en las últimas décadas, a las aplicaciones médicas y biológicas. Sin embargo, la complejidad de la técnica de medición tiene como consecuencia que los instrumentos necesarios para realizar estos estudios sean muy costosos de adquirir. Por otro lado, como ya es conocido; cuando nos referimos a equipos comerciales, sobre todo

en el campo de la investigación científica y desarrollo tecnológico, los costos de adquisición de un equipo son sólo una parte, y generalmente la parte más pequeña, de los costos asociados al mismo; pues además de estos se deben tener en cuenta los costos de mantenimiento preventivo, correctivo y de actualización de estos equipos. En muchos casos estos últimos superan a los montos de adquisición iniciales y de no haberlos considerado permanentemente en el tiempo, llegará el momento en que inevitablemente dicho equipo quedará inoperativo. Esto es una norma en casi todos los laboratorios de investigación y desarrollo en nuestro país.

Contradictoriamente, en los últimos años, los avances tecnológicos en electrónica, sensores, microelectrónica, software y programación entre otros han permitido que formen parte de nuestro quehacer cotidiano, dispositivos e instrumentos de altísima tecnología pero que al ser de consumo masivo, sus costos de adquisición resultan siendo comparativamente muy bajos. Como un ejemplo muy simple, consideremos un sencillo LED o diodo emisor de luz de los que podemos encontrar en formas, tamaños, potencias y longitudes de onda de emisión muy diversas. Son dispositivos de muy alta tecnología al precio de algunos centavos de dólar que si consideramos su uso cotidiano, no podríamos ir más allá de considerarlos simples indicadores luminosos. Sin embargo, en la literatura se pueden encontrar infinidad de usos no convencionales de los LEDs que incluyen aplicaciones como instrumentos científicos de medición, tales como espectrofotómetros y colorímetros [1], [2], [3]; medidor de hidrocarburos en agua [4], medidores de absorbancia y transmitancia [5], [6], entre otros.

Es así que el presente Trabajo de Tesis titulado “Desarrollo y evaluación de un analizador compacto de impedancias para aplicaciones médicas y biológicas” pretende mostrar la factibilidad de aprovechar la ventana de oportunidades existente en el uso de dispositivos de alta tecnología de uso masivo, y por ello de bajo costo, para el desarrollo de instrumentos avanzados que puedan ser aplicados para la implementación de técnicas de análisis de laboratorio en los diversos campos de la investigación científica especialmente aquellas aplicaciones biológicas y/o médicas.

Como es evidente, para el desarrollo de este trabajo ha sido necesario que se produzca una confluencia de oportunidades evidenciadas en la experiencia del autor y del equipo de trabajo del que forma parte, en el desarrollo de lo que Francois Puizzi denomina “*sustainable costs technology*” [7]. A nivel local, la misma metodología es más conocida a través de la denominación utilizada por Eduardo Montoya y Aurelio Arbildo como “instrumentación científica alternativa” [8], [9], concepto que a lo largo de los últimos años

se ha venido aplicando con notable éxito en los laboratorios de la Dirección de Investigación y Desarrollo del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) [10], [11].

Igualmente, para el desarrollo de este trabajo ha sido fundamental el interés mostrado por el Dr. Juan Agapito Panta del Laboratorio de Biología Molecular del IPEN en la aplicación de la técnica de espectroscopía de impedancia para la caracterización e identificación de muestras microbiológicas en condiciones controladas de laboratorio como un paso previo para su implementación como técnica de campo.

Objetivos

En el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos.

Objetivo General:

- Desarrollar e implementar un espectrómetro de impedancias compacto y autónomo con capacidad para operar hasta con 8 electrodos, con elevado nivel de configuración y adaptado a los requerimientos para su uso en microbiología de impedancia.

Objetivos Específicos:

- Evaluar y determinar las condiciones de operación del instrumento que mejor se ajustan para realizar espectroscopía de impedancia con microorganismos en medios de cultivo en laboratorio.
- Caracterizar la respuesta del medio de cultivo estéril con el uso de electrodos interdigitados para determinar los tiempos de estabilización del sistema.
- Evaluar las variaciones temporales de la impedancia de medios de cultivo ante la presencia de microorganismos identificados en proceso de crecimiento.
- Establecer las bases preliminares de una metodología para desarrollar estudios de microbiología de impedancia en condiciones de laboratorio.

Metodología

Para el desarrollo del presente trabajo se ha utilizado una metodología teórico-experimental, la misma que ha sido segmentada en las siguientes etapas:

1. Revisión del estado del arte de la técnica, lo que incluyó el estudio de las características técnicas de los equipos disponibles en función a las aplicaciones en las que son utilizados y la identificación de posibles soluciones tecnológicas para ser implementadas en el desarrollo, entre las que se consideraron el módulo

AD5933 de Analog Devices y los módulos Analog Discovery en sus versiones 1 y 2 de Digilent.

2. Realización de pruebas de operación del módulo Analog Discovery 2 con una PC de escritorio para la evaluación de sus características con muestras líquidas y determinación de los requerimientos de hardware.
3. Búsqueda, identificación y pruebas de operación e integración con placas de computadoras de tamaño reducido (SBC) para su integración como dispositivo de control y comunicación y su operación con una interface para interacción con el usuario.
4. Diseño y desarrollo de la sonda de medición porta electrodo y su adaptación para su utilización con micro electrodos inter-digitados
5. Desarrollo e implementación del hardware requerido para la operación del equipo con hasta 8 electrodos y la capacidad de trabajo con múltiples resistencias *shunt* con la finalidad de permitir la selección del valor más adecuado en función de las frecuencias de análisis, la impedancia del medio en estudio y la relación señal/ruido deseada.
6. Proceso de integración y ensamblado de todos los componentes y sub-etapas. Esto se llevó a cabo dentro de un gabinete de aluminio dentro del cual se han instalado todas las etapas con excepción de las sondas porta-electrodo y los electrodos inter digitados.
7. Evaluación y validación de pruebas en banco utilizando circuitos patrón. Comparación con valores teóricos o de simulación.
8. Diseño del arreglo experimental para su aplicación en microbiología de impedancias, lo que incluyó la identificación de los tipos de recipientes a utilizar, las adaptación de los porta electrodo. La elección y preparación del medio de cultivo, la identificación y preparación de las muestras de microorganismos a ser estudiados.
9. Experimentos de medición y caracterización de las variaciones de impedancia de medios de cultivo estériles, durante periodos largos, para determinar los tiempos de estabilización del electrodo y del medio de cultivo.
10. Experimentos de medición de las variaciones de impedancia de medios de cultivo inoculados con bacterias para correlacionar estos valores, durante periodos largos de tiempo, con el crecimiento bacteriano dentro del medio.

CAPITULO 1: IMPEDANCIA ELÉCTRICA

1.1 Definición

La impedancia eléctrica es un concepto general asociado con la oposición que muestra un material o un medio al paso de la corriente eléctrica. La representación más simple de la impedancia se denomina “resistencia”, usualmente representada como “R” y está referida a la oposición al paso de una corriente generada por un voltaje constante (que no cambia en el tiempo). Por medio de la Ley de Ohm en su forma más simple, podemos calcular la resistencia como la relación entre el voltaje aplicado y la corriente que circula a través del material (Figura 1).

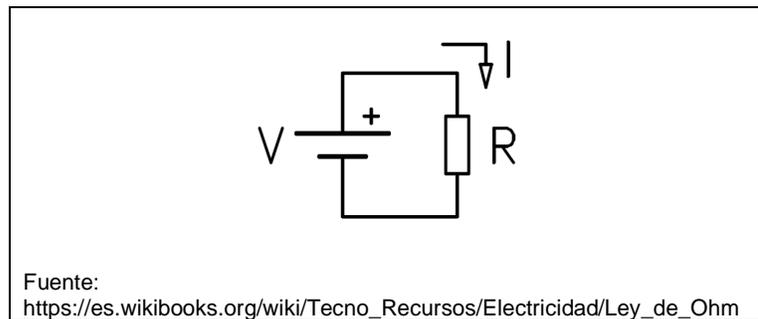


Figura 1. Representación de las magnitudes involucradas en el cálculo de una resistencia.

Donde:

$$R = \frac{V}{I} \quad (1)$$

Si el voltaje aplicado al material no es constante y varía en el tiempo, la corriente también variará en el tiempo. Si la relación entre estas dos magnitudes es constante, nos referimos a este valor como resistencia. Sin embargo, si este valor no se mantiene constante, no podemos referirnos a él, estrictamente como resistencia, sino que denominamos a esta relación como impedancia.

El cálculo de la impedancia puede ser algo complejo y además dependerá del voltaje aplicado y la corriente obtenida que no siempre se mantendrán constantes sino que serán función de la forma de la onda de voltaje de entrada.

Sería imposible realizar el análisis de impedancias para cada tipo de onda de voltaje aplicado a un medio pues las posibilidades serían infinitas. Por esta razón, se recurre frecuentemente al análisis en el dominio de frecuencias o análisis de Fourier.

El teorema de Fourier establece que cualquier forma de onda puede descomponerse en dos partes fundamentalmente, el valor medio de la onda, comúnmente denominado componente de continua, y las componentes de alterna que son representadas como una sumatoria de ondas sinusoidales en el caso de una onda periódica o como una integral de las mismas en el caso de una onda no periódica. En cualquier caso, una onda sinusoidal es considerada la unidad mínima de las componentes de alterna de una señal no periódica. De esta forma, es posible, en principio, analizar la respuesta de un sistema ante cualquier onda de excitación no periódica a partir del análisis de la respuesta para cada componente sinusoidal que contiene la señal (principio de superposición).

Es así entonces que podemos evaluar la “resistencia aparente” de un componente o un sistema, no en función a una señal de voltaje constante en cuyo caso llamaríamos simplemente “resistencia”, sino la respuesta ante una señal de voltaje sinusoidal “pura” de amplitud “A” y frecuencia angular “ ω ”.

Si la señal de corriente como respuesta a una señal de excitación de voltaje sinusoidal se encuentran en fase, no se produce desplazamiento de la onda, decimos que la respuesta del componente es puramente resistiva. Los componentes eléctricos comúnmente llamados resistores o resistencias muestran este tipo de comportamiento dentro de su rango de operación.

Por otro lado, desde el punto de vista eléctrico o físico existen dos componentes adicionales que conviene tener en cuenta: estos son los condensadores o capacitores y los inductores o bobinas.

En el caso de los capacitores, la relación entre el voltaje y la corriente en el dominio del tiempo, vienen determinada por:

$$v(t) = \frac{1}{C} \int i(t) dt \quad (2)$$

Donde C es la capacitancia del condensador. Para evaluar la “resistencia aparente” de este componente, asumimos que la corriente $i(t)$ es una onda sinusoidal de amplitud A y frecuencia angular ω .

$$i(t) = A \cos(\omega t) \quad (3)$$

En cuyo caso, la señal de voltaje quedará determinada por:

$$v(t) = \frac{A}{\omega C} \sin(\omega t) = \frac{A}{\omega C} \cos(\omega t - 90^\circ) \quad (4)$$

De acuerdo a la Ley de Ohm, la “resistencia aparente” vendría determinada por la relación entre el voltaje y la corriente:

$$\text{Resistencia aparente} = \frac{v(t)}{i(t)} = \frac{1}{\omega C} \frac{\cos(\omega t - 90^\circ)}{\cos(\omega t)} \quad (5)$$

En esta expresión, podemos observar claramente dos magnitudes importantes, una constante $1/\omega C$ y la relación entre las dos ondas sinusoidales que muestra una diferencia de fase de -90° . Independientemente del instante de tiempo, esta diferencia de fase se mantiene constante, por ello resulta conveniente abstraerse del dominio temporal y representar esta “resistencia aparente” únicamente en términos de la constante $1/\omega C$ y la diferencia de fase. Esto es lo que comúnmente se denomina “fasor” y es la representación estática de un vector que gira con una frecuencia angular constante, en este caso ω . Bajo esta representación, es claro que la “resistencia aparente” posee un módulo y un ángulo de fase, algo que la diferencia de una resistencia “convencional” que no posee ángulo de fase. Este tipo de resistencia aparente para un capacitor es denominada “reactancia capacitiva” o simplemente X_C (Figura 2).

$$X_C = \frac{1}{\omega C} \angle -90^\circ \quad (6)$$

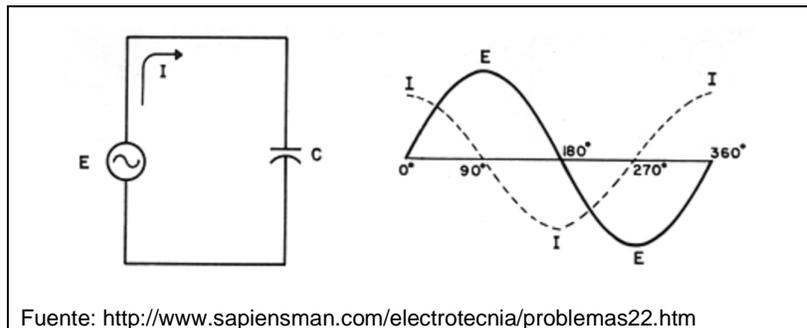


Figura 2. Desfase entre la señal de voltaje y corriente que circula a través de un capacitor.

Como puede verse, el valor de la reactancia capacitiva (resistencia aparente del condensador) depende únicamente de la capacitancia y el valor de la frecuencia angular de la señal aplicada al mismo.

Para un inductor o bobina, es posible realizar el mismo análisis anterior teniendo en cuenta que en un inductor se cumple que:

$$v(t) = L \frac{\partial i(t)}{\partial t} \quad (7)$$

Para una corriente sinusoidal, independientemente de la amplitud de la misma, se tendrá que:

$$X_L = \omega L \angle 90^\circ \quad (8)$$

Similar al caso anterior, a esta magnitud se denomina reactancia inductiva X_L y su magnitud sólo depende del valor de la inductancia L y la frecuencia angular de la señal aplicada (Figura 3).

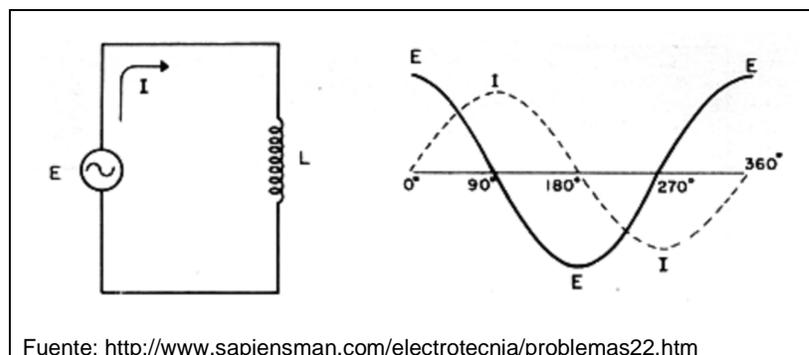


Figura 3. Desfase entre la señal de voltaje y corriente que circula a través de un inductor.

A diferencia de la resistencia que está constituida por un escalar, las reactancias capacitivas e inductivas poseen ángulos de fase de -90° y 90° con respecto a la resistencia. Debido a ello no es posible realizar la suma algebraica de ambas sino que debe realizarse en forma vectorial. La combinación de una resistencia y una reactancia produce una magnitud que posee parte real (escalar) y parte imaginaria en ángulo recto respecto del eje real. Esta magnitud es denominada "impedancia" y es un concepto general que abarca tanto el concepto de resistencia (como parte real de la impedancia) como el de reactancia (como parte imaginaria de la impedancia).

1.2 Medición de la impedancia.

Aunque existen diversas técnicas para realizar la medición de la impedancia, la forma más simple de realizarla es mediante la aplicación de un voltaje sinusoidal sobre el componente o medio bajo estudio (DUT "Device Under Test") y medir la corriente que circula a través de él (Figura 4). La corriente obtenida al ser también sinusoidal permitirá obtener la impedancia aplicando la Ley de Ohm y considerando que el módulo de la misma será el cociente entre las amplitudes de las señales de voltaje y corriente, en tanto el ángulo del fasor de impedancia se obtendrá de la medición del ángulo de desfase entre la señal de voltaje y de corriente.

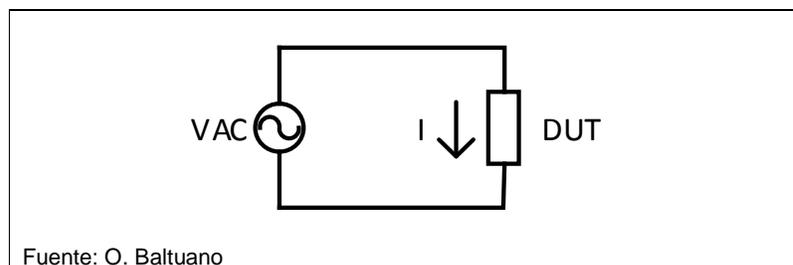


Figura 4. Determinación de la impedancia a través de la medición de la corriente (I) sobre un dispositivo bajo análisis (DUT) para un voltaje de entrada conocido (VAC)

En la práctica, la medición de la corriente en un sistema eléctrico se realiza de forma indirecta a través de una resistencia "*shunt*", por ello una forma diferente de medición de la impedancia puede hacerse mediante la configuración que se muestra en la Figura 5.

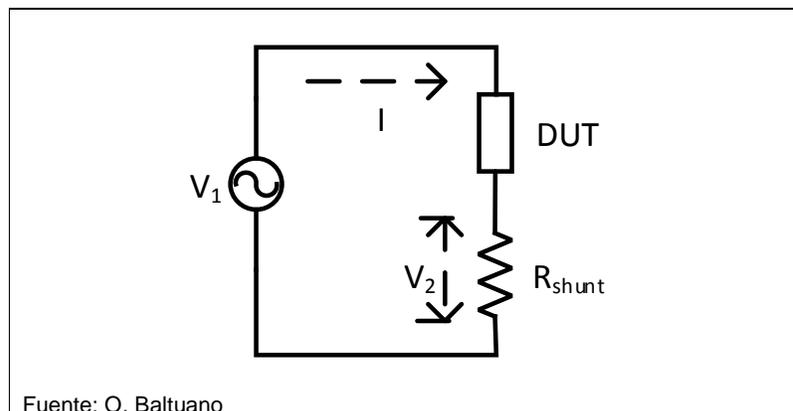


Figura 5. Configuración para medición de la impedancia (Z) de un elemento de interés (DUT) utilizando una resistencia *shunt* conocida.

Donde:

$$Z_{DUT} = \frac{V_1 - V_2}{I} \quad (9)$$

Aunque, en principio, la medición de impedancia parece ser algo trivial, hay factores que pueden reducir considerablemente la consistencia de los resultados. Estos pueden ser, las capacitancias parásitas de los cables utilizados, el ruido eléctrico de los equipos, las interferencias electromagnéticas y/o las corrientes parásitas a bajas frecuencias. La eliminación completa de estos efectos indeseados es imposible, por esta razón se busca mediante diferentes configuraciones una solución de compromiso entre las prestaciones del sistema de medición y la complejidad del mismo que suele ir emparejada con el costo de este último.

1.3 Espectroscopía de impedancia

Como ya ha sido mencionado, la impedancia es una magnitud que depende de la frecuencia que es aplicada al sistema en estudio. El análisis de la variación de la impedancia en función de la frecuencia aplicada se denomina espectroscopia de impedancia o espectroscopia dieléctrica. Se trata de una técnica muy potente y muy utilizada en aplicaciones muy diversas, desde la caracterización de materiales, circuitos electrónicos, celdas de combustibles, hasta cultivos celulares (Barsoukov and Macdonald, 2005). En los últimos años, su aplicación se ha extendido desde ensayos no invasivos, aplicaciones médicas, mediciones sobre cuerpo entero, identificación de ARN por hibridación, entre otras.

Los rangos de frecuencias para realizar un estudio dependen fundamentalmente de tipo de estudio y del tipo de muestra. Aunque los rangos posibles van desde algunos μHz hasta decenas de MHz, lo usual es que para un cierto estudio, este rango esté limitado dentro de un intervalo más pequeño.

Respecto de la amplitud de la señal de excitación que se aplica a la muestra, existen dos tipos de mediciones que pueden realizarse: la espectroscopia de impedancia farádica y no farádica, esto dependiendo del tipo de proceso electroquímico que se puede producir durante el estudio. Fundamentalmente, tratándose de muestras líquidas, si en la interface entre el electrodo y el electrolito se producen reacciones de oxidación reducción debido al paso de los electrones, se denomina Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS: *Electrochemical Impedance Spectroscopy*). Por otro lado, si estos efectos no se producen, se denomina de forma general Espectroscopía de Impedancia (IS: *Impedance*

Spectroscopy) o Espectroscopía de Impedancia Dieléctrica (Varshney and Li, 2009, Macdonald, 1992).

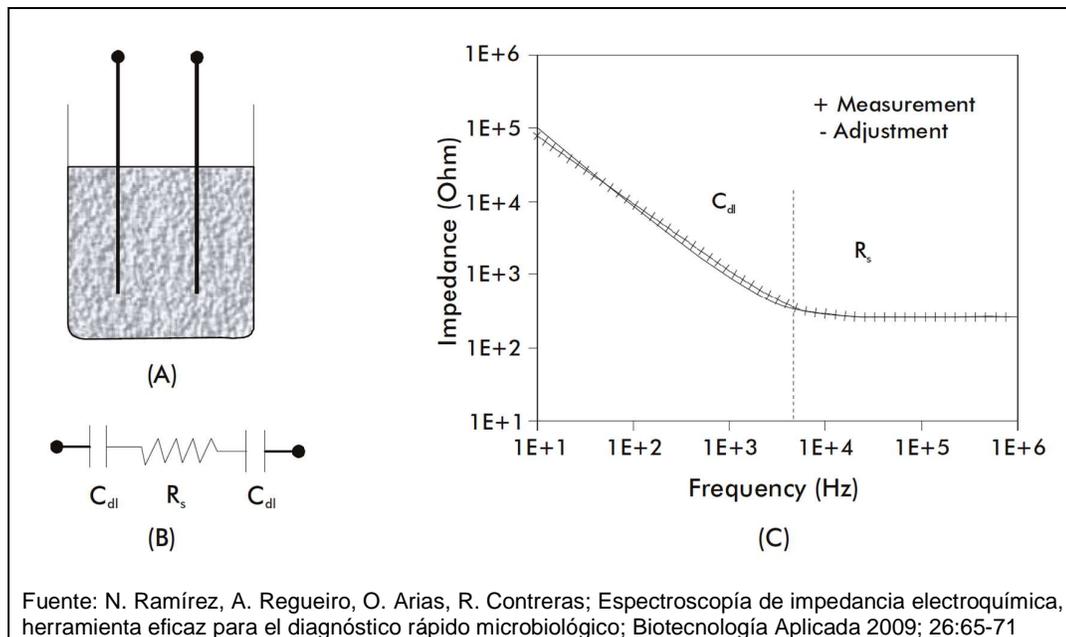


Figura 6. Ejemplo de un arreglo experimental para realizar espectroscopía de impedancia (A) electrodos y medio líquido a medir, (B) representación mediante componentes eléctricos o circuito equivalente, (C) representación de la variación del módulo de la impedancia con la frecuencia.

De acuerdo a lo anterior, la amplitud del voltaje de la onda de excitación determinará el tipo o los tipos de fenómenos que se producirán y por tanto el tipo de estudio a realizar. Por ejemplo en estudios de corrosión es importante reproducir los procesos de oxidación y reducción que se producen entre los metales y el medio circundante, por esta razón es usual que los voltajes de excitación aplicados en el orden de algunos voltios hasta decenas de voltios. Por otra parte, en estudios biológicos, las amplitudes de voltajes utilizados están en el orden de milivoltios con la finalidad de no producir fenómenos de oxidación reducción así como evitar que las corrientes generadas produzcan alteraciones en el comportamiento o metabolismo del tejido biológico que se encuentra dentro del medio.

En la Figura 6A puede observarse un caso típico de arreglo experimental para estudio por espectroscopía de impedancia de un medio líquido dentro del cual se han insertado dos electrodos tipo alambre. Para este arreglo se demuestra experimentalmente, que el módulo de la impedancia varía en función de la frecuencia según la curva mostrada en la Figura 6C.

1.4 Representación de espectros de impedancia

La impedancia es una magnitud compleja que está conformada por una parte real, denominada resistencia, y otra parte imaginaria, denominada reactancia. En un estudio real, alguno de estos valores o ambos pueden ser dependientes de la frecuencia angular.

$$Z(\omega) = R(\omega) + j \cdot X(\omega) \quad (10)$$

Donde el operador imaginario j presenta la perpendicularidad (ángulo de 90°) del valor de $X(\omega)$ con respecto a $R(\omega)$. Esta representación cartesiana de $Z(\omega)$ también se puede expresar en la forma polar como:

$$Z(\omega) = |M(\omega)| \angle \theta(\omega) \quad (11)$$

Donde $|M(\omega)|$ expresa el módulo de la impedancia y $\theta(\omega)$ el ángulo de fase de la misma. La relación entre la forma de expresión cartesiana y la polar viene dada por:

$$|M(\omega)| = \sqrt{R(\omega)^2 + X(\omega)^2} \quad (12)$$

$$\theta(\omega) = \tan^{-1} \left\{ \frac{X(\omega)}{R(\omega)} \right\} \quad (13)$$

Ambas formas de expresar el valor de la impedancia en función de la frecuencia angular determinan que existan diversas alternativas para representar gráficamente estas variaciones con la frecuencia. Dos son las formas más ampliamente utilizadas: diagramas de Bode y el diagrama de Nyquist, también denominado diagrama de Cole-Cole.

1.5 Diagramas de Bode

Los diagramas de Bode son ampliamente utilizados para representar los cambios en el módulo de la ganancia y el ángulo de fase de una función de transferencia. Debido a la similitud de estos parámetros con los de la impedancia, dichos diagramas también son útiles para el estudio de espectroscopia de impedancia. Estos diagramas constan de dos dibujos para representar el módulo y el ángulo de fase de la impedancia con respecto a la frecuencia sobre el eje de las abscisas (Figura 7). El eje de frecuencias se representa en forma logarítmica, en tanto el eje del módulo y el ángulo de fase se representan en forma

lineal. Cuando son utilizados para representar el módulo de la función de transferencia, el gráfico está normalizado para expresar el módulo en decibeles según la expresión:

$$dB = 20 \cdot \log(\text{Módulo}) \quad (14)$$

Sin embargo para mediciones de impedancia esto no necesariamente es tan estricto debido a que la unidad decibeles representa específicamente una relación entre dos magnitudes (ganancia) en tanto la impedancia es una sola magnitud en sí misma. Por ello, sólo en el caso de espectroscopía de impedancia, el diagrama de magnitud se representa el módulo en una escala logarítmica.

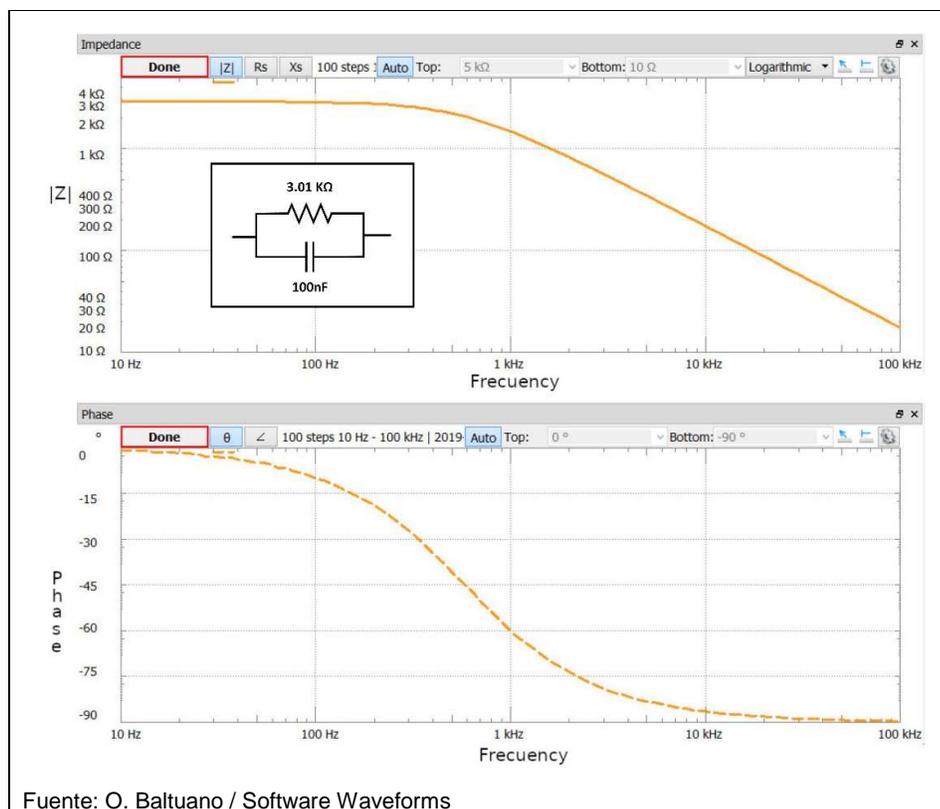


Figura 7. Representación como diagrama de Bode de la impedancia resultante del circuito de la figura. En la parte superior el diagrama de magnitud o módulo, en la parte inferior, diagrama de fase, ambos en función de la frecuencia.

1.6 Diagrama de Nyquist o Cole-Cole

A diferencia de un diagrama de Bode, en el diagrama de Nyquist o Cole-Cole se representa la relación entre la componente imaginaria de la impedancia versus la componente real de la misma como se aprecia en la Figura 8. Aunque la información del módulo y de la fase se puede visualizar rápidamente sobre este diagrama, la información

de la frecuencia no se encuentra presente y por ello no es posible identificar directamente cual es la frecuencia que corresponde a cada punto en el diagrama. A pesar de ello, este tipo de representación es la más ampliamente utilizada en espectroscopía de impedancia debido a que permite visualizar rápidamente el comportamiento del sistema en un solo gráfico.

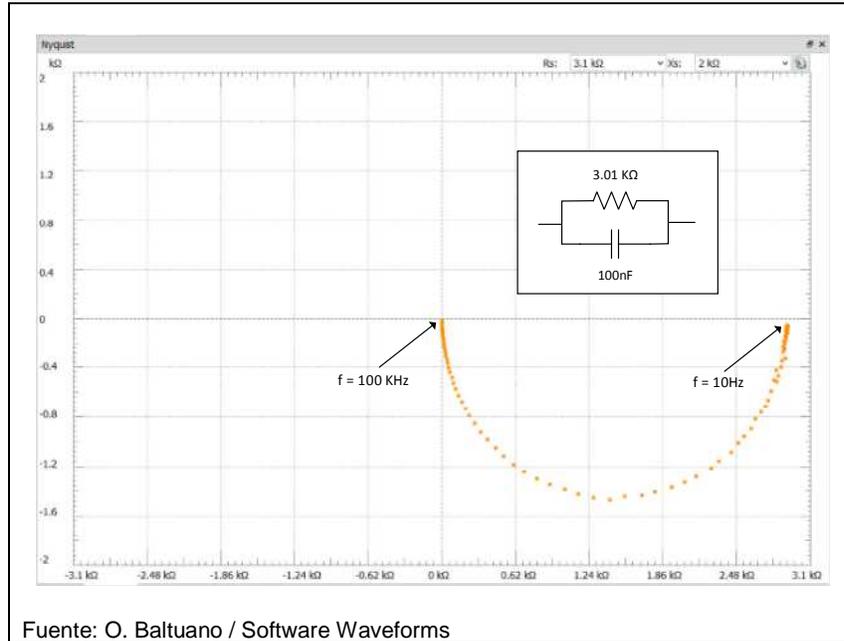


Figura 8. Representación como diagrama de Nyquist de la impedancia resultante del circuito mostrado en la figura.

En espectroscopía de impedancias de sistemas reales, los efectos encontrados son básicamente capacitivos, por ello, en un diagrama de Cole-Cole la parte imaginaria de la impedancia se dibuja con signo cambiado con la finalidad que el gráfico se posicione en la parte superior del mismo. En este mismo sentido, no se grafica la parte negativa de la parte real de impedancia por no tener un significado físico (Figura 9).

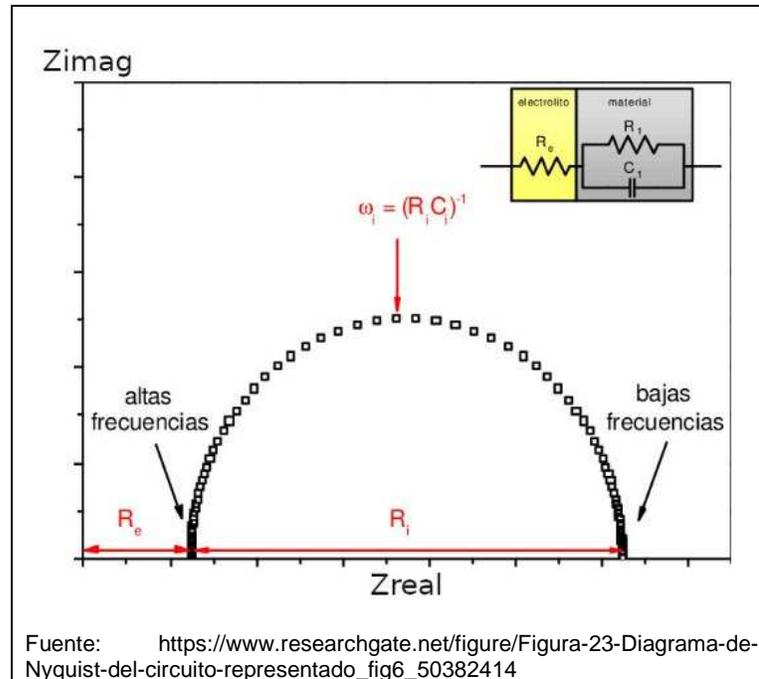


Figura 9. Representación en la forma habitual de diagrama de Nyquist de la impedancia del circuito mostrado en la figura.

CAPITULO 2: MICROBIOLOGÍA DE IMPEDANCIA

La microbiología de impedancia (MI) consiste en la medición de las variaciones de la impedancia de un medio de cultivo sobre el cual se han sembrado microorganismos. Las variaciones de la impedancia en el tiempo se deben fundamentalmente a los cambios que se producen en la conductividad eléctrica del medio como consecuencia de la metabolización que realizan los microorganismos de los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo. Los microorganismos convierten el oxígeno y los carbohidratos del medio en dióxido de carbono y ácidos lácticos. Aunque la membrana celular de los microorganismos, también contribuye a la conductividad eléctrica debido a que permite el transporte de cargas a través de los canales iónicos, usualmente la contribución de este efecto sobre el cambio total de la impedancia por el aumento de microorganismos es menor que el producido por la liberación de iones durante el metabolismo celular.

2.1 Antecedentes

La espectroscopia de impedancia eléctrica o EIS (Electrical Impedance Spectroscopy) es muy antigua pues los primeros estudios se remontan a año 1894 cuando W. Nerst realizó la medición de la constante dieléctrica de electrolitos en suspensión y otros fluidos orgánicos. Sin embargo, no es sino hasta mediados de los años 80 cuando se produce un incremento sustancial del interés por esta técnica como técnica de análisis en una variedad muy amplia de aplicaciones, como por ejemplo, análisis microbiológico, tamizaje de productos alimenticios, estudios de corrosión, control de calidad de recubrimientos, caracterización de electrolitos, estudios del cuerpo humano, detección de algunas enfermedades, entre otras. Esto gracias al desarrollo de los instrumentos controlados por computadora que facilitan la automatización del proceso de la técnica y que también permiten el procesamiento y análisis de datos en el dominio complejo (Fourier). De acuerdo con Orazem y Tribollet [12] el número de artículos científicos sobre aplicaciones de la EIS se duplica cada 4 o 5 años y ya en el 2006 el número de publicaciones bordeaba los 1200 artículos. Por otro lado, como muestra del gran interés de esta técnica, en el año 1989 se inició en Bombannes (Francia) una conferencia internacional especialmente dedicada a la técnica EIS la que se realiza cada 3 años. Este año 2019 se realizará el 11^{vo} Simposio Internacional sobre EIS en la ciudad de Lège-Cap-Ferret (Francia)

Es así que la microbiología de impedancia o IM (Impedance Microbiology) empieza a expandirse a partir de la década del 70 gracias al número creciente de publicaciones que le dieron un gran impulso y difusión internacional [13]. Desde 1975 hasta 1999 aparecieron nuevos trabajos y los aportes significativos de Felice y Valentinuzzi [14] aunque para esa época las aplicaciones estaban orientadas al control de calidad principalmente en la industria de alimentos y productos lácteos. Cady y col. [15] y Gnan-Luedecke [16], fueron de los primeros en proponer emplear la medición de impedancia como método alternativo de cuentas en placa.

La IM también ha sido aplicada con éxito en el estudio y registro de la carga microbiana en una amplia gama de productos alimenticios: vegetales, cereales, dulces, carnes, entre otros. También ha sido empleada para identificar coliformes en carne [17], gram negativos en leche pasteurizada [18], salmonella [19-20] así como para evaluar rendimiento de antibióticos. Las aplicaciones de detección y cuantificación de microorganismos han incluido también cerveza [21], vino [22], pescados [23], productos farmacéuticos y cosméticos [24] así como jugo de frutas [25]. También hubo aplicaciones en efluentes cloacales para detectar bacterias coliformes [26] y para detectar infecciones urinarias [27] o en sangre humana [28]. Las técnicas de IM también pueden ser utilizadas para supervisar la forma de crecimiento de las bacterias. En 1998, Fehlhaber y Kruger encontraron que diferentes especies de bacterias, bajo condiciones diferentes, presentaban curvas de crecimiento de impedancia específicas [29]. En años recientes, Grossi y Ricco [30] hacen una revisión de estado de la técnica de espectroscopía de impedancias para el análisis biológico y caracterización de alimentos.

Como es evidente, estos avances e investigaciones requieren el uso de equipos altamente especializados para realizar los barridos y análisis de frecuencias que son necesarios para obtener el espectro de impedancias de la muestra en estudio. Para ello, diversos instrumentos analíticos comerciales están disponibles, basados en el principio de la IM clásica, por ejemplo: Malthus System (Malthus Instruments, Crawley, West Sussex, UK), Bactometer (bioMerieux, Hazelwood, MO, USA), técnica rápida automatizada para la medición de la impedancia bacteriana (RABIT) (Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, UK) y BacTrac (Sy-Lab, Purkersdorf, Austria) [31-34], respectivamente.

Sin embargo, al tratarse de equipos comerciales, los costos de adquisición y mantenimiento son bastante elevados, lo cual restringe el desarrollo y la investigación de

las aplicaciones de la IM a aquellos laboratorios o instituciones que tienen los recursos suficientes para solventar dichos costos.

Por ello, desde la aparición de los micro-controladores de bajo costo, la reducción de costos de los dispositivos FPGA (Field-Programmable Gate Array) y posteriormente la puesta en el mercado de los dispositivos PSoC (Programmable System on Chip) se han realizado diversas investigaciones y desarrollos destinados a proveer equipos para estudios de EIS de bajo costo y adaptados para cubrir un determinado tipo de aplicación. Además de lo anterior, los estos desarrollos también tienen en cuenta la autonomía, portabilidad y bajo consumo de energía como una condición para la implementación de equipos de medición compactos y totalmente portátiles que pueden fácilmente integrarse con por ejemplo dispositivos móviles, equipos remotos de medición totalmente automáticos o integrados como nodos IoT.

En años recientes, la aparición en el mercado del CI AD5933 de Analog Devices [35], un analizador de impedancias SoC (System on Chip) de bajo costo ha permitido ampliar de manera significativa el desarrollo de equipos para estudios de EIS en frecuencias de hasta 100KHz y con rangos de medición de 100Ω hasta $10M\Omega$. Como ejemplo, Alonso-Arce et al. (2013) [36] presentaron un nodo sensor in-body portátil para realizar bio-monitoreo; Margo et al. (2013) [37] extendió el uso del AD5933 para mediciones usando 4 electrodos; Grinsven et al. (2010) [38] propone el uso de este dispositivo para identificación de DNA y proteínas; Chuang et al. (2016) [39] sugiere un sensor para detección de cáncer de vejiga en forma no invasiva; en forma similar, Kamat et al. (2014) [40] propone un sensor no invasivo para análisis de glucosa en sangre; Ferreira et al. (2010) [41] propusieron un medidor para análisis de composición corporal cuerpo humano y el análisis de distribución de fluidos.

Aunque la mayor parte de las investigaciones y desarrollos anteriores están basados en el uso del CI AD5933 o equipos comerciales, otras alternativas también son posibles. Tal es el caso del Analog Discovery 2 de Digilent [42]. Un sistema integrado de bajo costo concebido como un laboratorio todo en uno para facilitar diversos tipos de mediciones eléctricas. En operación como medidor de impedancia puede realizar barridos de frecuencia desde $100\ \mu\text{Hz}$ hasta 25MHz y es altamente configurable. Aunque está diseñado para operar como dispositivo esclavo junto con una PC a través de una conexión USB, en conjunto con alguna plataforma SBC (Single Board Computer) tal como Raspberry [43], Beaglebone [44], Orange PI [45] o similar, y adicionando algunos otros componentes para su interacción con un usuario (pantalla TFT táctil y dispositivos de comunicación

inalámbrica), podría integrarse para operar como equipo portátil y autónomo para estudios de EIS con mejores prestaciones que los anteriormente descritos.

2.2 Técnicas de medición

Aunque existen diferentes métodos para realizar el estudio del metabolismo de microorganismos mediante espectroscopía de impedancia, todos ellos se pueden clasificar en dos grandes grupos, técnicas directas y técnicas indirectas (Silley and Forsythe, 1996)

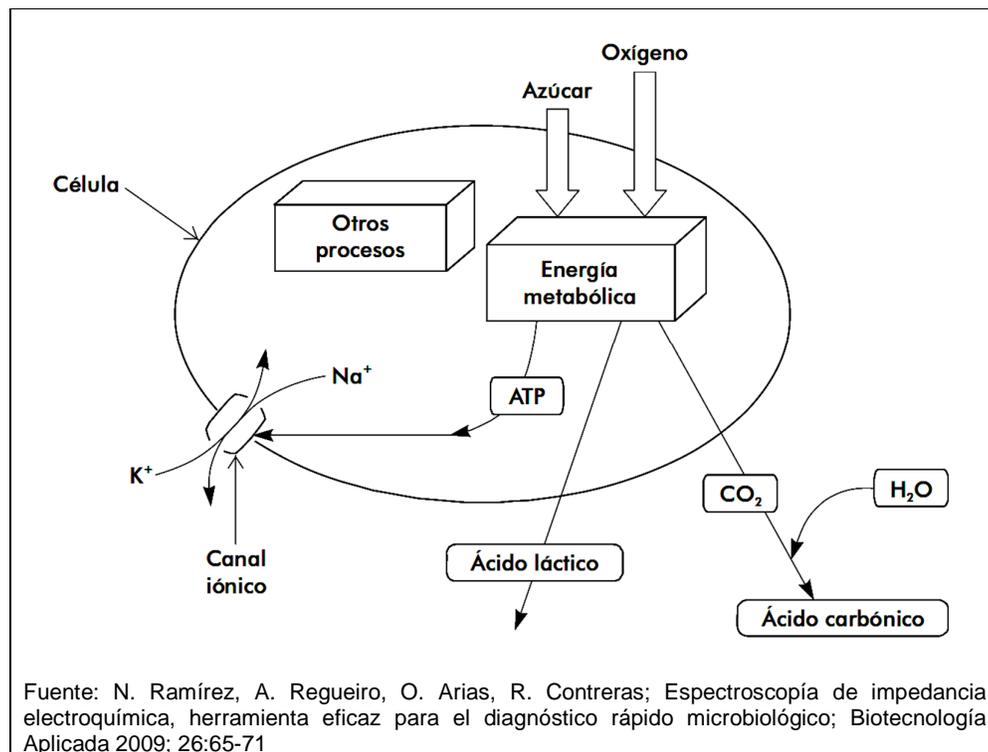


Figura 10. Representación de los principales mecanismos que contribuyen al cambio de la impedancia eléctrica del medio de cultivo.

En la técnica directa, el método más sencillo es introducir dos electrodos en el medio de cultivo líquido (electrolito) donde se ha sembrado la bacteria y realizar mediciones de impedancia a diferentes frecuencias a intervalos de tiempo regulares [46]. Los cambios en la impedancia son producidos principalmente por la liberación de moléculas, debido al metabolismo energético de la celular, con mayor capacidad de transporte de cargas lo que produce cambios en las interfaces entre los electrodos y el electrolito. Por ejemplo los iones lactatos producidos por la metabolización de la glucosa que una gran parte de microorganismos realizan, son moléculas que tienen mayor movilidad para el transporte de

carga. Igualmente el ácido láctico al ser convertido en ácido carbónico, éste último también contribuye al incremento de la conductividad. Por otro lado, el intercambio de iones a través de la membrana celular también contribuye al incremento de la conductividad y consecuentemente al cambio de la impedancia. Independientemente de cual sea el proceso, estos cambios son proporcionales a la concentración y tipo de microorganismos en el medio de cultivo. La Figura 10 muestra de forma gráfica los diferentes procesos que aportan al aumento de la conductividad.

En el caso de las técnicas indirectas, no se mide la impedancia del medio de crecimiento bacteriano sino que los gases producidos por el metabolismo son transportados a un medio diferente, usualmente una solución de hidróxido de potasio, sobre el cual el CO₂ contenido en el gas proveniente del primer medio reacciona con el hidróxido de potasio produciendo una disminución de la impedancia. En esta técnica los electrodos son introducidos en este segundo medio. Una de las ventajas de la técnica indirecta es que se evita la contaminación de los electrodos y los soportes del mismo con las bacterias en estudio, pudiéndose hacer el cambio de forma más rápida del todo el primer medio de cultivo.

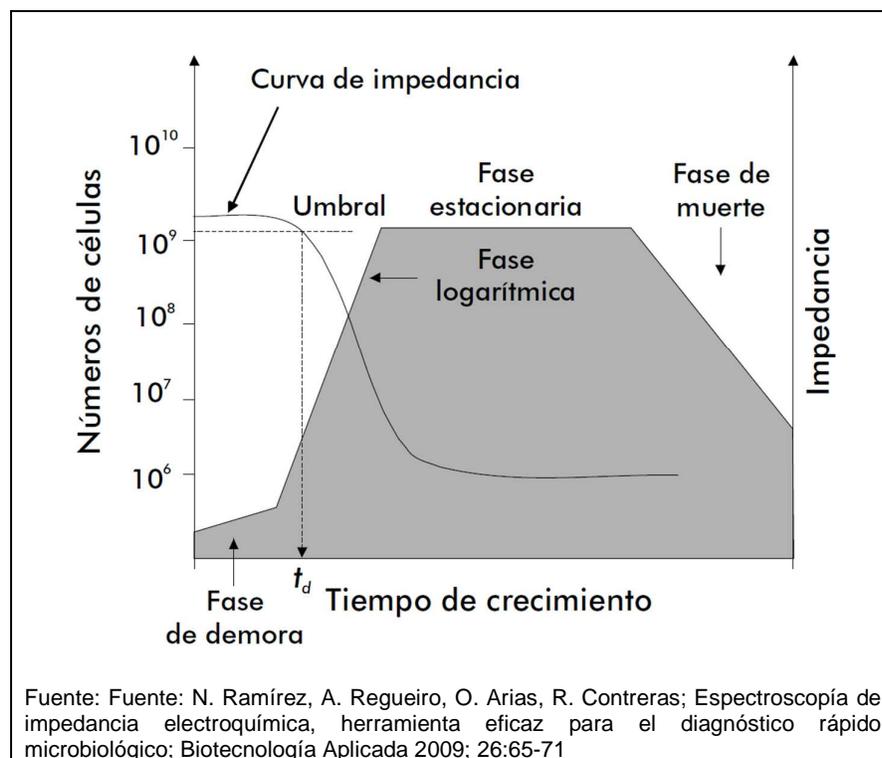


Figura 11. Correlación entre el crecimiento de microorganismos y la impedancia del medio del cultivo en función del tiempo.

La detección, identificación y/o cuantificación de la población bacteriana se realiza a través del monitoreo o registro a intervalos de tiempo regulares de los cambios absolutos o relativos de la conductancia o impedancia. En algunos casos también se realiza analizando los cambios en la capacitancia del medio aunque ello requiera alguna técnica de ajuste al comportamiento de un circuito equivalente. Si se mantienen controladas el resto de variables como la temperatura y la humedad, los cambios en la impedancia serán determinados únicamente por el crecimiento bacteriano (Figura 11).

2.3 Modelamiento con circuitos equivalentes

El estudio del comportamiento de sistemas reales por espectroscopía de impedancias puede llegar a ser un proceso muy complejo debido a todos los fenómenos físicos, químicos o biológicos que pueden ocurrir simultáneamente. En estos casos se recurre al modelamiento del sistema, es decir, utilizar sistemas más simples que bajo ciertas condiciones o dentro de determinados márgenes permiten explicar una parte del comportamiento del sistema real. Es así que, en algunos casos, el comportamiento de la impedancia en función de la frecuencia de un determinado sistema puede modelarse utilizando algunos de los dispositivos eléctricos sencillos descritos anteriormente: resistencias, condensadores e inductores. Tomando como ejemplo el caso mostrado en la Figura 6A en la cual se muestra un electrolito o medio líquido en el cual se han insertado dos electrodos. Experimentalmente, de la medición del espectro de impedancia se obtiene el gráfico mostrado en la Figura 6C. Este comportamiento en su forma más simple podría modelarse como un circuito que incluya dos condensadores que representarían cada uno las dos capacitancias que se forman en la interface entre cada electrodo con el electrolito y una resistencia que representaría la resistencia eléctrica de la solución (Figura 6B).

Si consideramos por ejemplo, una resistencia de 1.02 K Ω para representar la resistencia de la solución y dos condensadores de 95 nF para representar la capacitancia entre los electrodos y el electrolito, obtendríamos un gráfico como el que se muestra en la Figura 12. Este gráfico no ha sido generado por simulación sino que se ha obtenido al montar el circuito mostrado utilizando componentes con tolerancias de 1% (resistencia de película metálica y condensadores de mylar) y someterlo a un barrido de frecuencias entre 10 Hz y 1 MHz con el equipo que ha sido desarrollado en el presente trabajo. Como puede observarse claramente, la forma de la curva obtenida es muy similar a la curva mostrada en la Figura 6C obtenida de forma experimental utilizando dos electrodos y una solución, lo que demuestra que el circuito equivalente usado explica perfectamente el resultado experimental.

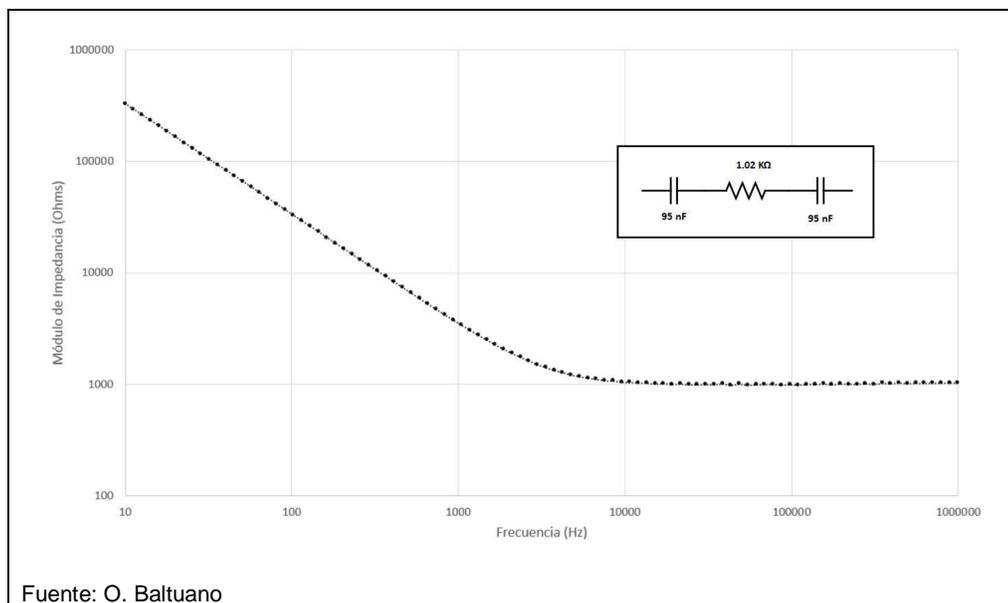


Figura 12. Espectro del módulo de la impedancia de un circuito equivalente con 2 condensadores y una resistencia en serie.

Aunque utilizar circuitos equivalentes con componentes eléctricos (resistencias, condensadores e inductores) pudiera parecer algo sencillo, en muchos casos, sobre todo en procesos electroquímicos más complejos, el comportamiento de los mismos no se puede modelar con estos componentes sencillos. Por esta razón se recurre a elementos más complejos que, aunque no poseen un equivalente físico real, a partir del modelamiento matemático si cumplen con aproximarse al comportamiento del sistema electroquímico en estudio. Algunos ejemplos de estos elementos son: los de fase constante (O), Warburg semi infinito (W), Warburg de bordes porosos (O) o Warburg finito (T), los mismos que son ampliamente utilizados para modelar por impedancia electroquímica los fenómenos de corrosión o de caracterización de materiales.

Tabla 1: Elementos más complejos usados en impedancia electroquímica

Elemento equivalente	Impedancia
Elemento de fase constante Q	$1/Y(j\omega)^p$
Warburg semi infinito W	$1/Y(j\omega)^{1/2}$
Warburg de bordes porosos O	$1/Y(j\omega)^{1/2} \text{Cotgh} \{B / (j\omega)^{1/2}\}$
Warburg finito T	$1/Y(j\omega)^{1/2} \text{Tanh} \{B / (j\omega)^{1/2}\}$

Tomado de U. Morales, A. Camargo, J. Olaya, Impedancia electroquímica - Interpretación de diagramas típicos con circuitos equivalentes. Dyna, Año 77, Nro. 164, pp. 6975. Medellín, Diciembre de 2010. ISSN 00127353

CAPITULO 3: DESARROLLO DEL EQUIPO DE MEDICIÓN DE IMPEDANCIA

Aunque existen diversas alternativas de equipos comerciales para realizar estudios de espectroscopía de impedancias, sin embargo, la totalidad de ellos proporcionan soluciones “llave en mano”, es decir una alternativa tecnológica cerrada sobre la cual no es posible realizar escalamientos o adaptaciones sin el costo adicional que ello implica. En otros casos, los equipos tienen especificaciones técnicas sobredimensionadas para las aplicaciones en las cuales se utilizan y esto también involucra un costo excesivo que muchas veces se convierte en prohibitivo.

Por esta razón, como parte de este trabajo se desarrolló un equipo para medición de impedancias multielectrodo en líquidos utilizando electrodos inter-digitados. El equipo es totalmente autónomo y automático y no requiere estar conectado a una PC para su operación que usualmente es de varios días, aunque internamente se incluya una computadora reducida. Es compacto en el sentido que está integrado como una sola unidad y se componen de componentes que son de fácil acceso y de comparativamente mejor asequibilidad. Posee además la característica que puede operar hasta con 8 electrodos simultáneamente, compartiendo los tiempos de espera entre cada medición, lo cual permite planificar experimentos hasta con 8 muestras diferentes con el mismo equipo. Está diseñado para operar en rangos de frecuencias de algunos Hertz y hasta los 100 KHz que se ha demostrado es el rango de frecuencias de mayor utilidad en aplicaciones de microbiología de impedancias.

3.1 Diagrama de bloques

En la Figura 13 se muestra el diagrama de bloques del equipo que ha sido desarrollado específicamente para mediciones de impedancia en medios líquidos. El núcleo del mismo está constituido por una tarjeta Analog Discovery 2 controlada por una computadora de placa reducida, en nuestro caso una Orange Pi PC Plus. La interface con el usuario u operador se realiza a través de una pantalla TFT táctil. Se fabricó una tarjeta conteniendo algunas resistencias de shunt con valores típicos, las mismas que pueden ser seleccionadas mediante las líneas de I/O genéricas que posee la Analog Discovery 2. Igualmente a través de estas líneas es posible seleccionar hasta 4 electrodos de trabajo diferentes. La resistencia de shunt junto con el medio líquido a estudiar determina el rango de frecuencias que es factible analizar con una adecuada relación señal a ruido. Dos

sondas de medición, cada una con un electrodo inter-digitado removible se han construido para facilitar la medición sobre medios de cultivo colocadores en matraces de laboratorio. A continuación se describen cada una de estas etapas.

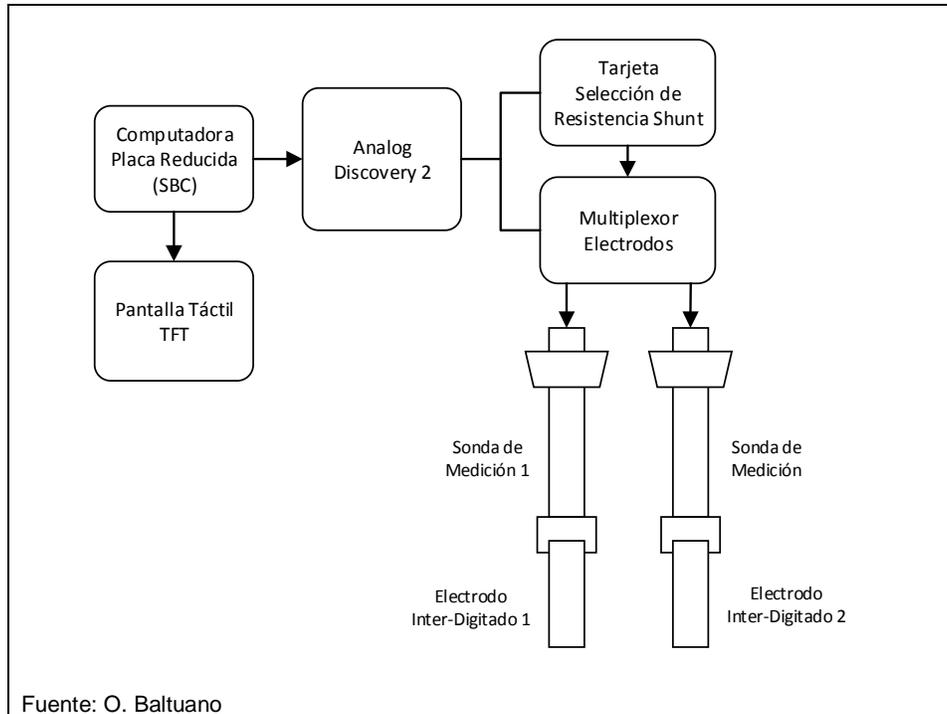


Figura 13. Diagrama de bloques simplificado del espectrómetro de impedancias multielectrodo.

3.2 Analog Discovery 2

La segunda versión de Analog Discovery, denominada Analog Discovery 2, es un instrumento multifunción de bajo costo fabricado con la compañía Digilent en alianza con Analog Devices (Figura 14), reconocido fabricante de componentes electrónicos de gama alta. Este instrumento posee la funcionalidad de diversos instrumentos de laboratorio, tales como dos osciloscopios de 30 MHz de ancho de banda, dos generadores de funciones de hasta 12 MHz, analizador lógico y generador de patrones digitales de 16 canales, voltímetro de 2 canales y una fuente de alimentación dual programable.

Este equipo permite medir la impedancia que muestra una carga mediante el uso de uno de los generadores de funciones como generador de ondas sinusoidales con frecuencia ajustable y las dos entradas de ambos osciloscopios en una configuración como la que se muestra en la Figura 15.



Figura 14. Módulo Analog Discovery 2.

El osciloscopio 1 o canal 1 monitorea la señal de entrada a la carga que está proporcionando el generador de funciones y gracias a ello permite corregir la mayor parte de errores debidos a las posibles variaciones por efecto de carga del DUT (*Load*)

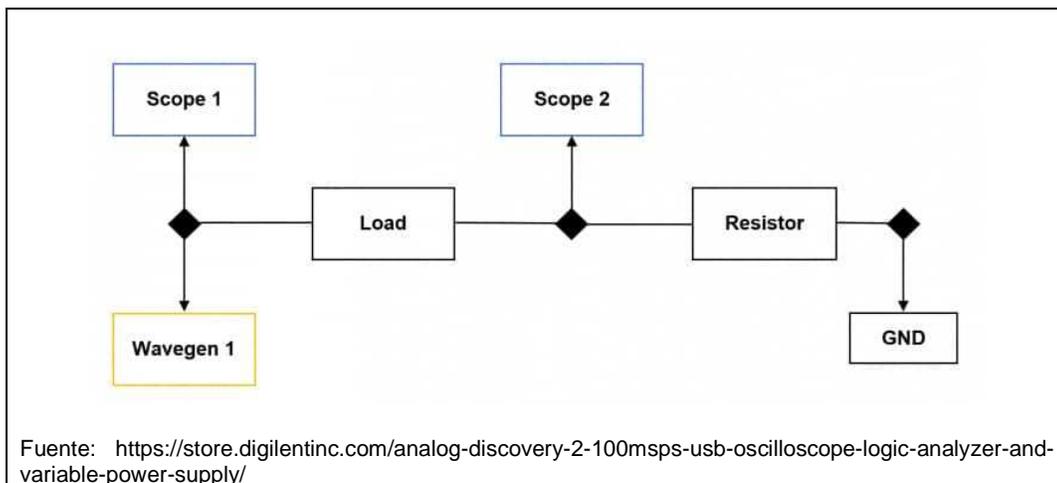


Figura 15. Configuración utilizada para medición de impedancia utilizando una resistencia de *shunt*, un generador de funciones y las dos entradas de osciloscopio del módulo AD2

El osciloscopio 2 o canal 2 mide el voltaje que cae sobre la resistencia de referencia conocida, también denominada resistencia *shunt*, conectada a tierra y por tanto permite determinar el vector de corriente que circula a través del circuito según:

$$I = \frac{V_{scope\ 2}}{R} \quad (15)$$

Finalmente es posible calcular el valor de la impedancia de la carga “Load” según la expresión:

$$Z_{Load} = \frac{V_{scope\ 1} - V_{scope\ 2}}{I} \quad (16)$$

Este valor depende de la frecuencia sinusoidal aplicada y por lo tanto para determinar el espectro de impedancia es necesario realizar un barrido de frecuencias entre los valores de frecuencia de interés (ancho de banda)

Además de la frecuencia, también es posible ajustar la amplitud de voltaje de la onda, realizar muestreos múltiples sobre una misma frecuencia con la finalidad de mejorar la relación señal a ruido, realizar la compensación de capacitancia y resistencia de las puntas de prueba, aplicar un nivel de continua sobre la carga, especificar el número de puntos de muestreo dentro del ancho de banda de análisis, etc. En términos generales, permite realizar una configuración muy amplia de parámetros lo que le da amplia versatilidad para adaptarse a casi cualquier aplicación.

Este instrumento es un equipo de tipo esclavo que para operar requiere estar conectado a una computadora a través de un puerto USB. El fabricante proporciona una aplicación específica para su control, denominada WaveForms y de la cual se encuentran versiones para Windows, Macx, Linux y plataformas ARM. Esta aplicación es altamente configurable y soporta el uso de scripts para automatizar tareas. Digilent también proporciona una librería que le permite a las aplicaciones de control escritas en C++, C# o Python, comunicarse directamente con el hardware del instrumento.

3.3 Resistencia de shunt y multiplexor de electrodos

Las resistencias de referencia, o resistencias *shunt*, han sido montadas en una tarjeta adaptadora con conector IDC hembra para insertarse directamente sobre la tarjeta Analog Discovery 2 construida específicamente para este trabajo, la cual puede observarse en la Figura 16. Se han instalado resistencias de película metálica con valores nominales de 10Ω, 100Ω, 1KΩ y 10KΩ, todas ellas con una tolerancia de 1%. La resistencia que desea utilizarse es seleccionada mediante un conjunto de relays, que son controlados a través de las líneas de I/O genéricas del módulo AD2.



Fuente: O. Baltuano
 Figura 16. Tarjeta selectora de resistencia de *shunt* fabricada para el espectrómetro y acoplada con módulo AD2

Las mediciones de espectroscopía de impedancias no se realizan permanentemente el tiempo, es decir, en un estudio real se realiza el barrido de frecuencias que toma un tiempo que depende del rango de frecuencias, del número de frecuencias que se analizan y del número de muestras que se toman para cada una de dichas frecuencias. Luego que el barrido de frecuencias es realizado, el equipo entra en modo de espera durante un tiempo que es determinado por el usuario en función a las características del estudio. Durante este tiempo de espera todo el hardware del equipo, en especial de la AD2 queda subutilizado.

Debido a lo anterior y considerando que durante estos tiempos de espera es posible utilizar el hardware para realizar una medición en un medio o una muestra diferente, se ha realizado el diseño y ensamblaje de una tarjeta de selección de electrodo de trabajo (Figura 17A). Esta tarjeta, de las cuales se pueden conectar hasta 8 apilándolas una sobre otra (Figura 17B), permite seleccionar un electrodo conectado a cualquiera de ellas. La selección se realiza direccionando la tarjeta correspondiente con las líneas de I/O genéricas que posee la AD2.

Todo esto permite optimizar significativamente el uso del hardware ampliando la capacidad del equipo para realizar mediante multiplexación de tiempo hasta 8 muestras diferentes. Las prestaciones de esta configuración serán dependientes de las condiciones de medida de cada muestra y el tiempo que se requiere para realizar un barrido en cada una de ellas. A manera de ejemplo, en los estudios realizados en este trabajo, todas las mediciones se normalizaron para ejecutar barridos entre 10 Hz y 100 KHz, considerando

500 puntos de frecuencias dentro de este intervalo y tomando en cada punto 2 muestras para mejorar la relación señal/ruido. En estas condiciones, típicamente un barrido completo tomó un tiempo de 4 minutos. Si se tiene en cuenta que usualmente las mediciones se realizan cada 30 minutos, los tiempos muertos son considerablemente mayores que los tiempos de utilización del equipo. En ello radica la ventaja de multiplexar varios electrodos con el mismo equipo.

Durante los tiempos en los cuales un electrodo no es utilizado, ambos terminales del electrodo son conectados entre sí en corto circuito con la finalidad de mantenerlos al mismo potencial y evitar que se generen potenciales positivos o negativos que pudieran dañar el electrodo durante periodos muy largos de medición.

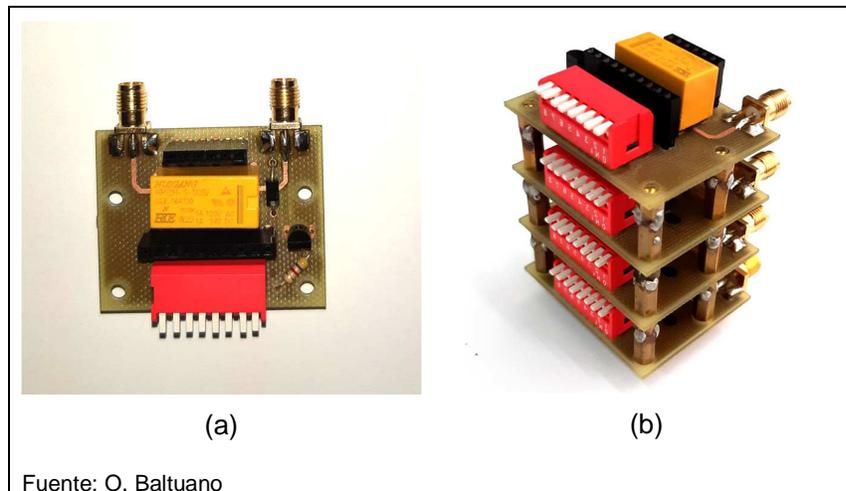


Figura 17. (a) Tarjeta selectora de electrodo y (b) cuatro tarjetas apiladas para operar con igual número de electrodos.

Para el presente trabajo, por limitaciones de insumos, cepas de microorganismos y tiempos de preparación de muestras únicamente se han realizado mediciones simultáneas hasta en 2 muestras en cada experimento.

3.4 Orange Pi

Orange Pi es un fabricante asiático de computadoras de placa reducida o SBC (*Single Board Computer*). Algunos de sus productos son los principales competidores en el amplio mercado ganado por la plataforma Raspberry Pi. Aunque ambas plataformas utilizan hardware totalmente diferente, debido a que ambas pueden ejecutar los mismos sistemas operativos basados en Linux, tales como Raspbian Debian, Ubuntu o incluso Android, desde el punto de vista del usuario, el hardware se hace transparente en su mayor

parte y las aplicaciones, salvo excepciones, corren indistintamente en cualquier plataforma. Gracias al modelo de desarrollo *OpenSource* de estas placas, existen múltiples marcas y variantes perfectamente compatibles entre ellas: Banana Pi, CubieBoard, BeagleBone, por mencionar algunas.

Para el presente trabajo, la primera opción evaluada fue la plataforma Raspberry. Para ello se configuraron las tarjetas Raspberry Pi versión, Raspberry Pi 2 y Raspberry Pi 3. En el primer caso, la potencia del hardware no fue suficiente para ejecutar WaveForms, mientras que en las versiones Pi 2 y Pi 3, la conectividad con la tarjeta Analog Discovery 2 fallaba de forma aleatoria. Esta falla, aparentemente se debe a un error en el driver del puente convertidor USB a serial utilizado en ambas SBC's. En el momento de escribir estas líneas, ha sido lanzada al mercado la versión cuatro, denominada Raspberry Pi 4, con un hardware diferente en el cual el puente convertidor USB a serial ha sido reemplazado, sin embargo debido a la poca disponibilidad de estas tarjetas, no se han podido realizar pruebas de integración. También se evaluó el rendimiento de una placa BeagleBone Black, pero al igual que en el caso de Raspberry Pi versión B, el hardware limitado no permitió ejecutar el programa WaveForms.

Por otro lado, se evaluaron las dos siguientes tarjetas pertenecientes al mismo fabricante: Orange Pi PC Plus y Orange Pi 3. Aunque el hardware de la Orange Pi 3 es de mejores prestaciones que la Orange Pi PC Plus, no fue posible compilar adecuadamente las librerías proporcionadas por Digilent para la operación de WaveForms sobre esta tarjeta. Finalmente, una placa Orange Pi PC Plus logró pasar todas etapas de compilación y pruebas de compatibilidad con el software Waveforms quedando como única alternativa para integrarse dentro del instrumento desarrollado.

La placa Orange Pi PC Plus (Figura 18) posee un procesador Allwinner H3 basado en un ARM Cortex A7 de cuatro núcleos operando a una frecuencia de 1.6GHz. Dentro del hardware de soporte podemos mencionar: 3 puertos USB 2.0, un puerto USB OTG, 8GB de memoria Flash no volátil, 512 de memoria RAM, slot para tarjeta micro SD, un puerto HDMI, módulo y antena Wi-Fi, puerto Ethernet 100 Mbps, conector de 40 pines con líneas de I/O genéricas, entre otras.

Aunque no todo el hardware disponible es utilizado para la operación del equipo como medidor de impedancia, los periféricos que la placa Orange Pi posee posibilitan aumentar las funcionalidades y operatividad del equipo.

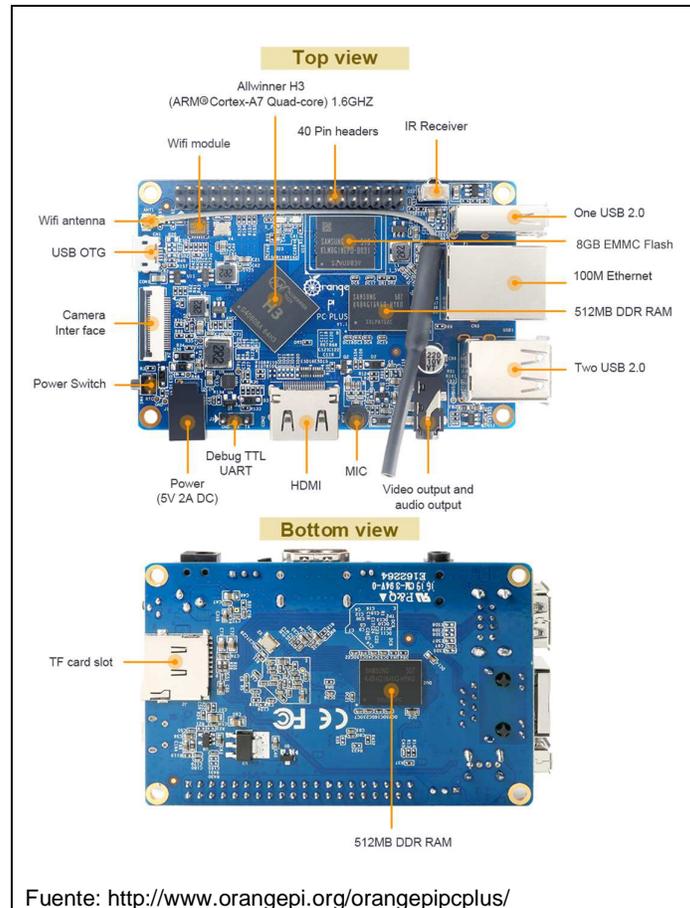


Figura 18. Vista superior e inferior de una tarjeta Orange Pi PC Plus similar a la integrada en el espectrómetro de impedancia desarrollado

3.5 Pantalla táctil

Con la finalidad de mantener el tamaño compacto y la portabilidad del equipo se utilizó como dispositivo de interface con el usuario, una pantalla TFT a color de 7 pulgadas (Figura 19), con membrana táctil capacitiva. La resolución nominal de este dispositivo es de 800 x 480 pixeles. Posee una entrada de video HDMI y un conector micro USB utilizado para la comunicación de la membrana táctil y proporcionar el voltaje de alimentación para la operación de la pantalla. Este dispositivo tiene una alta versatilidad y cuando es integrado dentro de instrumentos compactos o portátiles, evita la necesidad de utilizar un teclado y/o un mouse por parte del usuario. Existe una amplia y muy bien establecida comunidad de desarrolladores que suministran drivers de operación para diferentes plataformas. El escalamiento es un proceso sencillo debido a que usualmente son compatibles entre sí con versiones de hardware anteriores o de menor resolución.



Fuente: <https://www.aliexpress.com/item/32682184439.html>
Figura 19. Pantalla TFT de 7 pulgadas con membrana táctil capacitiva utilizada para la interface con el usuario del equipo.

3.6 Electrodo

Los electrodos proporcionan el contacto eléctrico entre el medio que se desea medir y el sistema electrónico. Si el medio es líquido como en nuestro caso, es necesario utilizar un material que proporcione una baja resistencia eléctrica y que sea resistente a los efectos del medio que pueden dañar el electrodo. El oro es el material más ampliamente utilizado. El electrodo más simple consiste en un simple alambre de oro sumergido dentro del medio, sin embargo la superficie de contacto con el medio puede ser bastante pequeña. Al aumentar la superficie de contacto la resistencia de la interface se reduce y para un mismo potencial aplicado entre dos electrodos la corriente será mayor. Una corriente mayor permite incrementar la relación señal/ruido y por lo tanto mejorar la sensibilidad y límites de detección. Aunque es posible obtener corrientes mayores aumentando el potencial de excitación, esto último no es conveniente, debido a que un potencial elevado producirá reacciones de oxidación-reducción en la interface electrodo-electrolito enmascarando la medida de la impedancia del medio. Además de ello, los potenciales elevados, por encima de algunas decenas de mili-voltios pueden producir cambios en el medio y muerte de los microorganismos cuyo efecto sobre la impedancia se desea estudiar. Debido a todo ello, los electrodos interdigitados han revolucionado la técnica de espectroscopía de impedancia como resultado de las grandes ventajas que ofrecen sobre los electrodos convencionales de alambre o de disco, gracias a su baja resistencia, alta relación señal a ruido, tiempos más cortos para su estabilización y la posibilidad de utilizar volúmenes muy pequeños de solución.

Para el presente trabajo se han utilizado electrodos inter-digitados (Figura 20) con recubrimiento de oro de 3 nm sobre conductores de cobre depositados en una oblea de óxido de aluminio o alúmina de 40 mm x 15 mm. El electrodo posee en total 23 pares de dedos con un ancho nominal de 100 micras con una separación nominal de 80 micras. El área efectiva de trabajo o de medición es de 20 mm x 10 mm. Estos electrodos han sido adquiridos desde el proveedor global Aliexpress (<https://www.aliexpress.com/item/32870780708.html>)

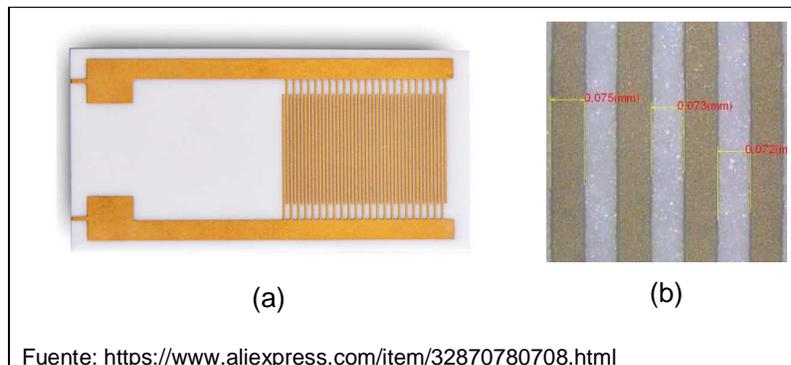


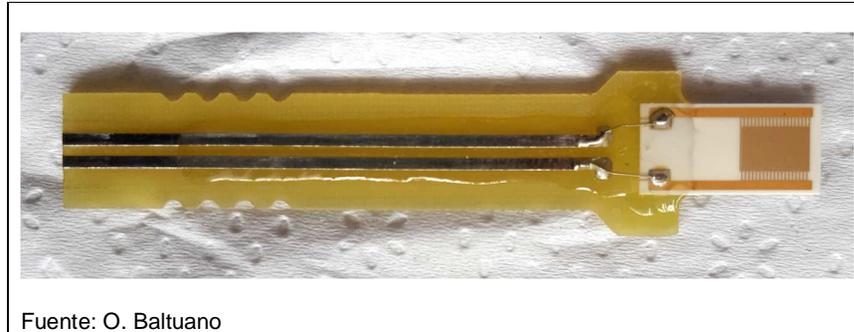
Figura 20. Electrodo utilizado para las pruebas (a) imagen completa del electrodo, (b) microfotografía mostrando el detalle de los dedos inter-digitados.

La oblea de alúmina que soporta los dedos del electrodo inter-digitado tiene un espesor de 0.7 mm, lo cual hace que no pueda insertarse directamente en algún conector para tarjetas por inserción (Card Edge Plug) o similar. Además de ello, debido al tamaño pequeño del electrodo y que éste debe sumergirse dentro del líquido del cual se pretende hacer la medición de la impedancia, existe un alto riesgo que el líquido pueda producir alguna reacción sobre los extremos de contacto del electrodo y/o contaminarse alguno de estos puntos con los microorganismos dentro del medio que se está estudiando.

Debido a lo anterior, se fabricó un soporte intermedio para fijar el electrodo. Este soporte ha sido fabricado en una tarjeta de circuito impreso PCB de material FR4. El soporte intermedio tiene un espesor de 1.6 mm el cual es un estándar para los conectores tipo inserción que permiten retirar de forma sencilla el electrodo.

El electrodo ha sido fijado utilizando resina epóxica transparente endurecida con luz ultravioleta. Este tipo de resina es totalmente inerte y posee buena resistencia mecánica y química además de buena adhesión. Se ha realizado la unión de los puntos de contacto del electrodo con los puntos de contacto de los conductores del soporte intermedio. Las pistas de cobre fueron estañadas y posteriormente recubiertas con resina epóxica al igual

que todos los puntos donde hubiera contactos metálicos exceptuando los dedos interdigitados del electrodo en un extremo y los pads de contacto con el conector en el otro extremo (Figura 21).



Fuente: O. Baltuano
Figura 21. Imagen del electrodo montado sobre tarjeta adaptadora. Se observa el recubrimiento de resina epóxica de proyección.

La configuración anterior permite insertar o retirar fácilmente el electrodo de la sonda de medición (ver 3.7) además de mantener a cierta distancia dicha sonda de medición que incluye el conector y cables del medio de cultivo para evitar una posible contaminación cruzada.

3.7 Sonda de medición

Para realizar los estudios, el medio de cultivo es introducido dentro de un matraz de laboratorio. Con la finalidad de optimizar la cantidad de material e insumos utilizados, sólo se usaron 250 ml de medio de cultivo. Esta cantidad hace que se tenga que introducir el electrodo y el correspondiente soporte a través del cuello del matraz hasta la parte inferior del mismo. Para ello ha sido necesario preparar una sonda de medición consistente en un soporte cilíndrico de acrílico en el cual se ha acoplado un cabezal del mismo material que aloja el conector de tipo inserción para la tarjeta de soporte intermedio del electrodo. El cilindro de acrílico es hueco en la parte interior para alojar los cables de conexión entre el electrodo y el sistema electrónico de medición. Un tope cónico cuya posición puede ajustarse en el cuerpo del cilindro central se usa como tope para fijar la profundidad a la cual se coloca el electrodo de medición.

Para las conexiones eléctricas se ha utilizado cable coaxial RG316 de 2.5 mm de diámetro y 50 ohmios de impedancia nominal. Se instaló un cable para cada uno de los terminales del electrodo. La pantalla externa del cable coaxial es puesta a tierra con el objetivo de blindar las señales contra interferencias electromagnéticas. Este tipo de cable tiene una razonable flexibilidad mecánica lo cual permite realizar fácilmente el arreglo

experimental requerido. Aunque es un cable que puede operar a muy altas frecuencias, para los efectos de este trabajo dicha característica no es importante debido a los rangos de frecuencias comparativamente bajos que se utilizaron (10 Hz – 100 KHz). Ambos cables está terminados en conectores SMA macho. Todo el arreglo se muestra en la Figura 22.

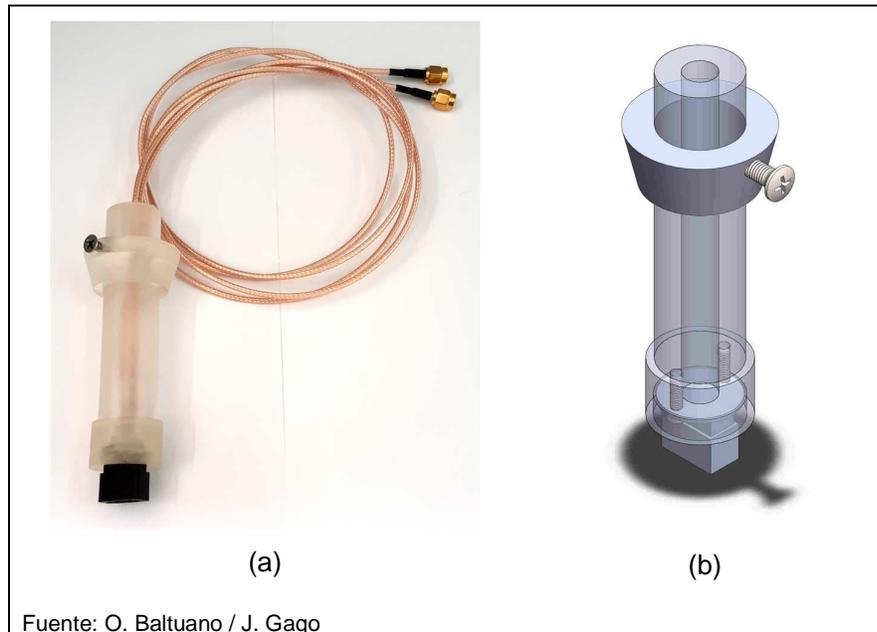


Figura 22. Sonda de medición (a) ensamblaje con cables y conectores SMA y (b) esquema de diseño CAD.

3.8 Integración y ensamblado

Todo el equipo, con excepción de las sondas de medición y los electrodos, ha sido montado en un gabinete de aluminio de 24 cm de ancho, 18 cm de profundidad y 16 cm de altura (Figura 23). Esto proporciona una excelente jaula de Faraday que evita las interferencias electromagnéticas (EMI's). La parte superior del gabinete tiene una parte inclinada a 30° sobre la cual se ha montado la pantalla TFT, lo que facilita la visualización y operación por parte del usuario.

El equipo se alimenta de una toma convencional de 220VAC gracias a una fuente de poder que proporciona múltiples salidas de 5V en 4 conectores USB tipo A. No es necesario ningún otro tipo de conector o valor de voltaje debido a que todos los componentes internos funcionan únicamente con 5V. Esto simplifica considerablemente la integración de cada sub etapa (Figura 24).



Figura 23. Imagen de la parte frontal del equipo mostrando la pantalla TFT para interacción con el usuario y el software Waveforms cargado para entorno Armbian.

El diseño de las tarjetas multiplexoras de los electrodos permite conectar un máximo de 8 electrodos al mismo equipo, sin embargo por consideraciones de espacio y teniendo en cuenta la aplicación inmediata el equipo, únicamente se ha instalado el hardware para soportar 4 sondas de medición con sus respectivos electrodos. Esto brinda gran versatilidad de trabajo para la casi totalidad de aplicaciones posibles del equipo.

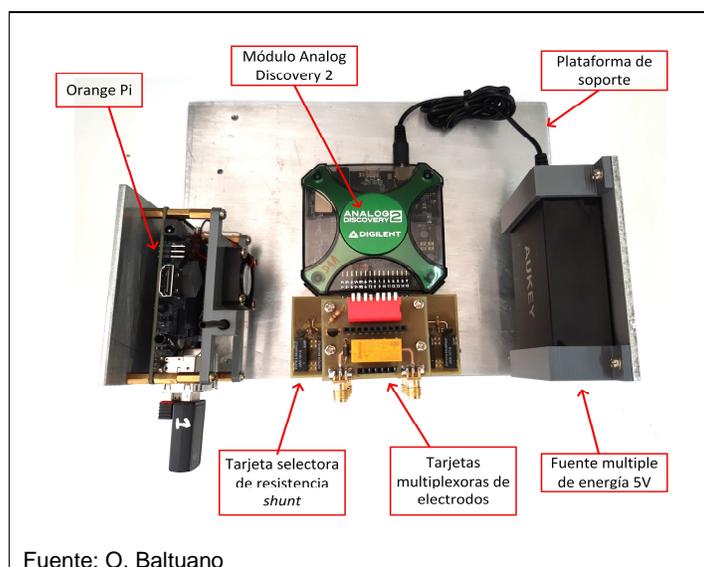


Figura 24. Imagen de la parte interior del equipo con la descripción de cada componente (aún no se muestran las conexiones entre ellos)

Las conexiones de los electrodos se realizan a través de conectores SMA hembras en la parte posterior del equipo (Figura 25). 8 conectores SMA, permiten el trabajo con hasta 4 electrodos simultáneamente (2 conectores por cada electrodo). Los electrodos y las sondas de medición son conectadas al equipo a través de cable coaxial RG316, del cual, la malla externa se encuentra puesta a tierra con la finalidad de proporcionar un buen blindaje contra interferencias electromagnéticas.

Tal como ya ha sido descrito previamente, aunque se encuentran conectados físicamente 4 electrodos simultáneamente al mismo equipo (Figura 28), su utilización se hace mediante multiplexación en el tiempo, es decir, no es posible utilizar más de un electrodo en un mismo instante de tiempo. Aun así, esto no representa problema debido a los tiempos muertos en los cuales el equipo no es utilizado durante un experimento convencional.



Fuente: O. Baltuano

Figura 25. Imagen de la parte posterior del equipo descubierta sin tapa. En primer plano se muestran los conectores SMA para los 4 electrodos.

3.9 Calibración con circuitos patrón

Con la finalidad de evaluar la respuesta del equipo previo a su utilización con medios de cultivo, se ha obtenido el espectro de impedancia de un circuito patrón implementado con componentes de precisión en la configuración mostrada en la Figura 26 y utilizando una resistencia de *shunt* de $1K\Omega$

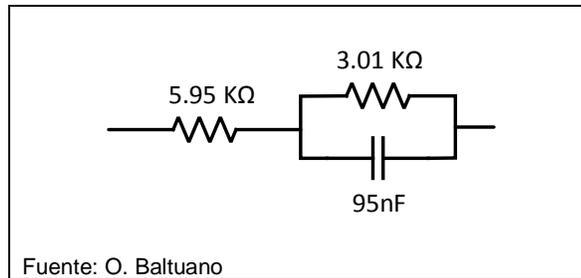


Figura 26. Circuito patrón utilizado para evaluar la respuesta del equipo.

En la Figura 27 se observa la respuesta del equipo a través del diagrama de Nyquist de la impedancia del circuito anterior. Los puntos representan los valores medidos en el intervalo entre 10 Hz y 100 KHz y la línea en naranja la curva teórica obtenida para los mismos valores.

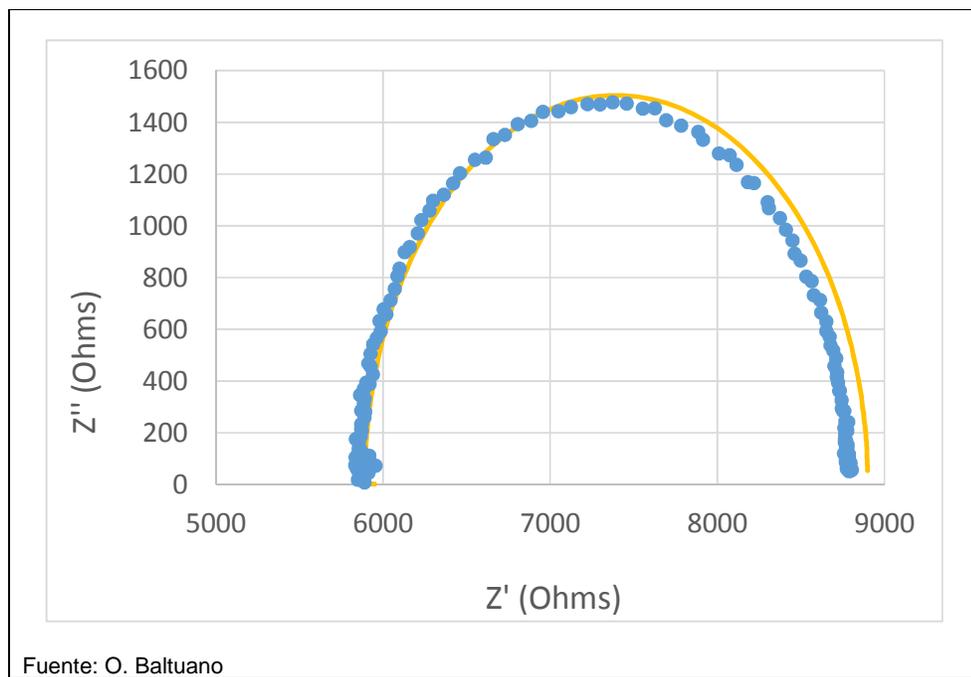


Figura 27. Diagrama de Nyquist de la respuesta del equipo para el circuito patrón utilizado con un barrido de frecuencias desde 10 Hz hasta 100 KHz

Las diferencias entre la curva teórica y la curva obtenida con los datos experimentales es debida a un conjunto de factores relacionados con las características de entrada del ADC y salida del DAC de la tarjeta AD2; los errores debidos a las capacitancias y resistencias adicionales de los cables y las tolerancias de los componentes utilizados. En relación a las características de la tarjeta AD2, se debe tener en cuenta que, de acuerdo a las especificaciones del fabricante, el ADC utilizado tiene una resolución de 14 bits y un

rango de entrada entre -2,65 y +2,65 voltios cuando se utiliza la configuración de alta ganancia. Esto da como resultado una resolución de 320 μV para las dos entradas de osciloscopio.

$$\text{Resolución ADC} = \frac{+2,65\text{V} - (-2,65\text{V})}{2^{14}} = \frac{5,3\text{V}}{16384} = 0.32 \text{ mV} \quad (17)$$

Respecto del DAC, el mismo posee una resolución nominal de 14 bits y un rango de salida de tensión entre -1,36 y +1,36 voltios cuando se utiliza la configuración de baja ganancia. Con estos valores se obtiene una resolución de 166 μV para las dos salidas del generador de funciones programable.

$$\text{Resolución DAC} = \frac{+1,36\text{V} - (-1,36\text{V})}{2^{14}} = \frac{2,72\text{V}}{16384} = 0.166 \text{ mV} \quad (18)$$

CAPITULO 4: PRUEBAS DE LABORATORIO Y RESULTADOS

4.1 Medio de Cultivo

Para las pruebas microbiológicas se ha utilizado Tripteína Soya Caldo (Tryptic Soy Broth ó TSB) que es un medio líquido para enriquecimiento y cultivo de microorganismos aerobios no exigentes. Este medio favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos especialmente bacterias anaerobias facultativas, aerobias comunes y algunos hongos. La tripteína y la peptona de soya aportan los nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya proporciona carbohidratos que estimulan el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. El cloruro de sodio proporciona el balance osmótico de la pared celular y el fosfato dipotásico proporciona la capacidad de buffer. La glucosa es el principal componente que es metabolizado para proporcionar energía. Algunos microorganismos que muestran buen crecimiento en este medio de cultivo son; *escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *enterobacter aerogenes*, *candida aerogenes*, *streptococcus pyogenes*, *psudomonas aureginosa*, *salmonella typhimurium* entre otros.

El producto que ha sido utilizado es distribuido con presentación en polvo deshidratado, homogéneo, de libre desplazamiento y color beige. La preparación se realiza disolviendo 30 gr de polvo en un litro de agua purificada. El color del preparado es ámbar claro transparente.

Tabla 2: Fórmula de TSB por litro de agua

Hidrolizado pancreático de caseína (Tripteína)	17.0 g
Hidrolizado pancreático de harina de soya (Peptona de soya)	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Glucosa	2.5 g

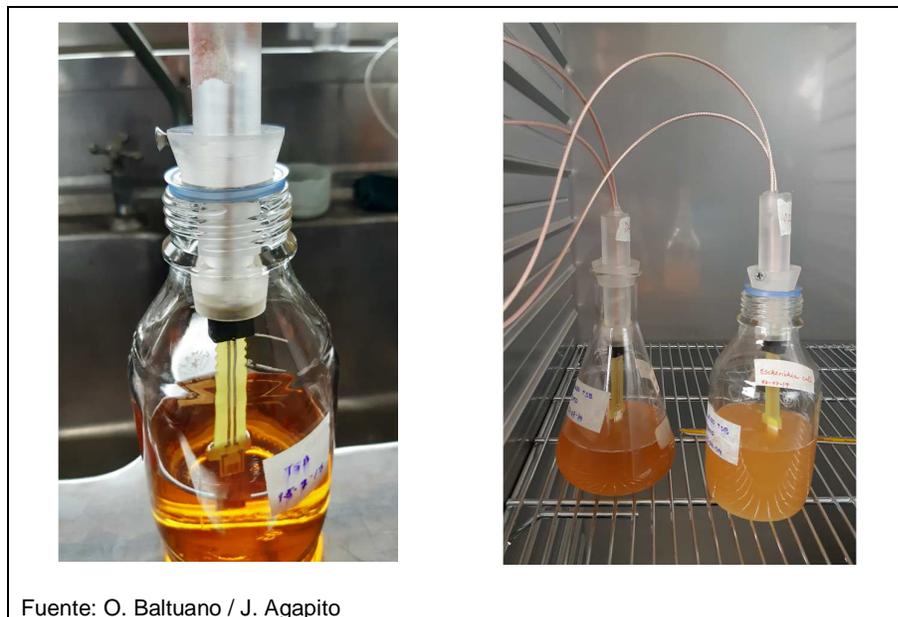
El pH total final obtenido es de 7.3 ± 0.2

En todos los casos, el medio de cultivo y el matraz utilizado fueron sometidos a esterilización en autoclave a 125°C durante un periodo de una hora.

4.2 Arreglo experimental

Todas las mediciones experimentales se han realizado utilizando como elementos sensores, los micro-electrodos inter-digitados instalados sobre sus correspondientes tarjetas adaptadoras según se han descrito en 3.6. Estos electrodos a su vez han sido insertados en las sondas de medición que se han construido de acuerdo a lo detallado en 3.7. En todos los casos se ha utilizado entre 250 y 300 ml de medio de cultivo TSB previamente esterilizado dentro de matraces o botellas de cultivo. El cuerpo de cada electrodo inter-digitado fue sumergido en la parte superior del medio de cultivo, regulando la altura del mismo mediante el anillo de ajuste de la sonda de medición.

El conjunto de sensores y medios de cultivo han sido colocados dentro de una estufa a una temperatura de 37°C con la finalidad de otorgar las condiciones de temperatura óptimas para la reproducción de los microorganismos (Figura 28). La conexión entre los electrodos y el equipo de medición se ha realizado mediante cables coaxiales RG316 y sus correspondientes conectores SMA. Gracias a la capacidad multielectrodo del equipo de medición que se ha construido, ha sido posible realizar mediciones simultáneas de 2 medios de cultivo.



Fuente: O. Baltuano / J. Agapito

Figura 28. Arreglo experimental utilizado para medición de impedancia en medios de cultivo. (a) Electrodo y sonda de medición colocada dentro de matraz de cultivo esteril, (b) dos matraces con sus respectivas sondas de medición dentro de estufa a 37°C, el cambio en la tonalidad del medio de cultivo es debido al crecimiento de bacterias.

4.3 Esterilización de electrodos

La esterilización del medio de cultivo se realizó usando un autoclave a 125°C durante una hora es parte del protocolo microbiológico de preparación de muestras. Además de éste procedimiento, se ha verificado la necesidad de esterilizar previamente tanto los electrodos que serán sumergidos dentro del medio de cultivo así como la tarjeta adaptadora entre estos y el porta electrodo. Además de eliminar la contaminación producida por un uso previo de los electrodos, se ha encontrado experimentalmente que los microorganismos ambientales crecen muy fácilmente en el medio TSB y debido a que antes de introducir las bacterias sujetas a estudio dentro del medio se procede a esperar un tiempo de estabilización del medio. Este tiempo de estabilización permitía que se contaminara el medio de cultivo con microorganismos ambientales antes de incluso haber introducido las bacterias a estudiar, enmascarando los datos obtenidos de las lecturas de impedancia en el tiempo. Diferentes especies de cocos ambientales y sobretodo una especie de bacilo esporulado gram positivo (*Bacillus sp*) han sido encontrados y producido que diversas pruebas hayan dado resultados contradictorios (Figura 29).

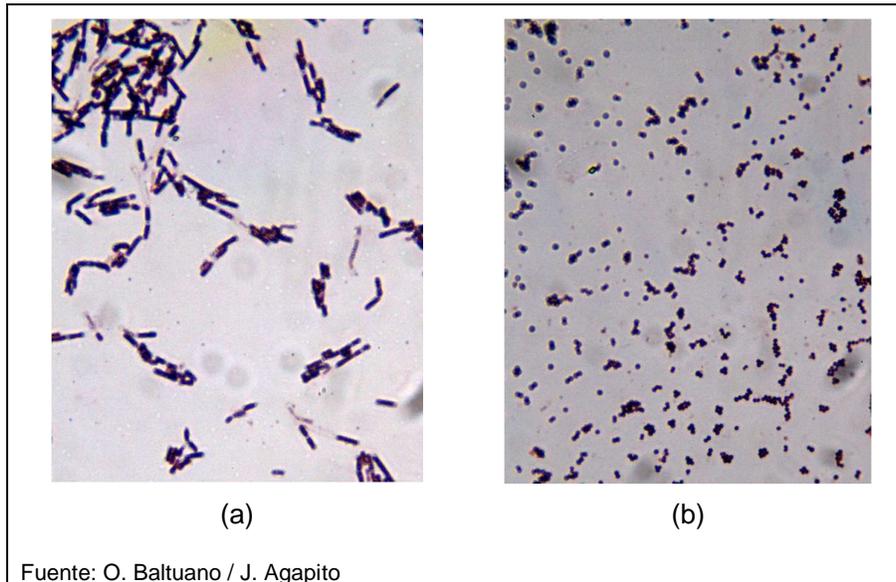
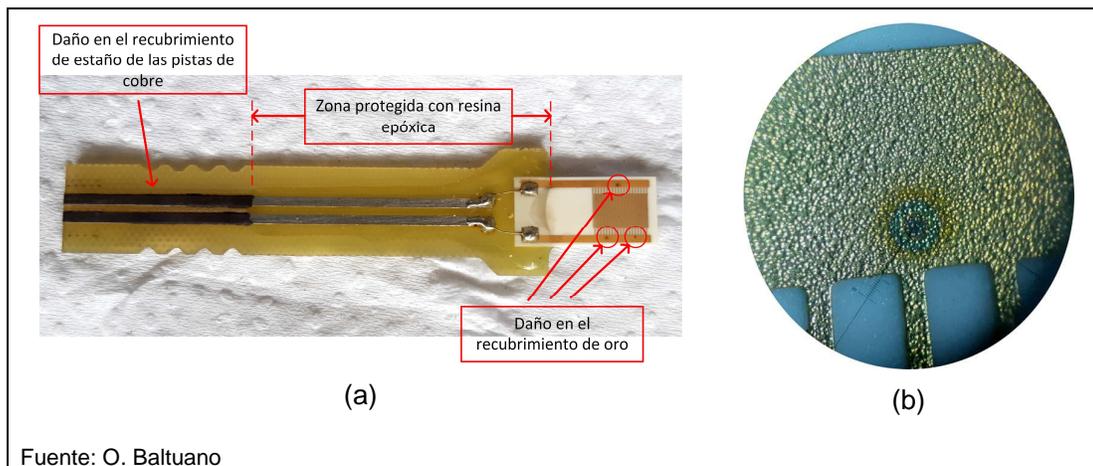


Figura 29. Microorganismos ambientales provenientes del electrodo sin esterilizar encontrados en el medio de cultivo. (a) bacilos esporulados, (b) cocos ambientales. Ambos microorganismos son grampositivos.

Los bacilos esporulados son altamente resistentes a la temperatura, a ciertos tipos de desinfectantes, son parcialmente resistentes a la radiación UV, a los medios ácidos y son extremadamente agresivos con algunos metales y otros materiales en los que otros tipos de microorganismos ambientales son inocuos. Durante los experimentos realizados

se ha evidenciado que estos microorganismos producen daño sobre el recubrimiento de estaño que cubre las pistas de cobre de la tarjeta adaptadora del electrodo y que evita su oxidación por humedad. Del mismo modo, se ha encontrado que ataca parcialmente el recubrimiento de oro de la superficie de los electrodos inter-digitados lo cual puede producir una degradación en las prestaciones del mismo (Figura 30). Los vapores emanados por el metabolismo de los bacilos esporulados también han producido un depósito de material sobre el acrílico del portaelectrodo impidiendo que el anillo de soporte pueda ser ajustado adecuadamente sobre la boca del matraz para regular la altura del electrodo.



Fuente: O. Baltuano

Figura 30. Daños producidos en el electrodo y tarjeta adaptadora por bacilos esporulados ambientales. (a) recubrimiento de estaño y recubrimiento de oro dañados, (b) amplificación de uno de ataques producidos sobre el electrodo.

Se ensayaron diferentes métodos para realizar la esterilización y limpieza de los electrodos y tarjetas adaptadoras. En primer lugar se utilizó alcohol etílico al 70° y alcohol isopropílico o isopropanol. En ningún caso se logró eliminar las cepas de bacilos esporulados. Posteriormente se ensayó la esterilización con radiación UV durante una hora, sin embargo esto tampoco logró eliminar completamente los microorganismos posiblemente debido a las irregularidades del dispositivo o la porosidad propia de la fibra de vidrio que compone el núcleo del material FR4 con el que se fabricaron las tarjetas adaptadoras de los electrodos y que impide que la luz UV pueda penetrar lo suficiente como para eliminar todos los microorganismos. En ambos casos anteriores, los electrodos sometidos a estos procesos producían igualmente la contaminación del medio de cultivo durante el tiempo de estabilización del mismo.

Como tercera opción se procedió a la esterilización por temperatura, sometiendo los electrodos y sus correspondientes tarjetas adaptadoras a un proceso de autoclavado a 125°C durante 1 hora. Este método logró eliminar completamente los microorganismos y

no produjo ningún daño o degradación de los materiales. La resina epóxica utilizada no perdió rigidez mecánica ni adherencia durante el proceso.

Finalmente, como cuarta opción, los elementos anteriores fueron sometidos a irradiación gamma de 1.71 MeV y 1.33 MeV utilizando un irradiador de Co-60. La dosis total absorbida fue de 25 KGy. En este último caso, si bien se logró eliminar cualquier microorganismo, el efecto de la irradiación produjo un cambio de color significativo tanto del material de fibra de vidrio del adaptador de electrodos así como de la alúmina que sirve de soporte para el electrodo inter-digitado (Figura 31). En ambos materiales se produjo un efecto de “quemado” de los mismos que aunque no produjo cambios en la rigidez mecánica de estos materiales, el continuo proceso de irradiación gamma podría degradar irreparablemente estos dispositivos. Debido a lo expuesto anteriormente se optó por incorporar el proceso de autoclavado de los electrodos y adaptadores a 125°C como método de esterilización más adecuado.

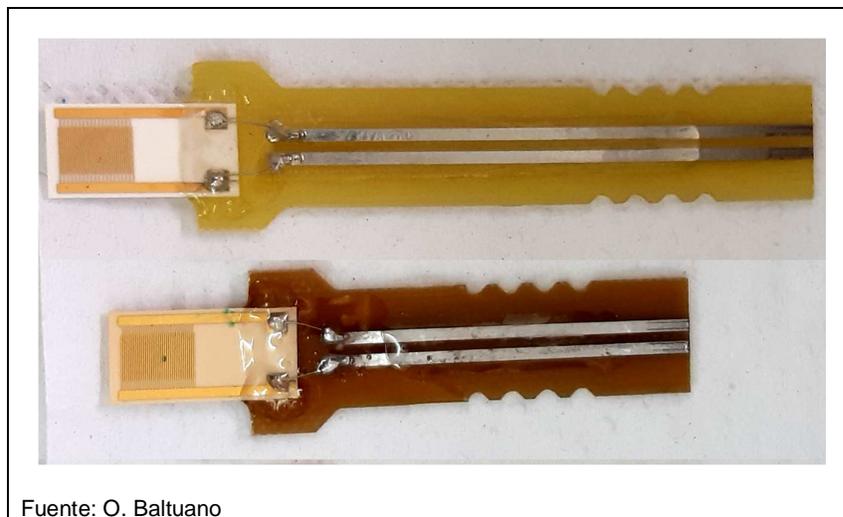


Figura 31. Comparación del efecto entre procesos de esterilización. Arriba, electrodo sometido a autoclavado de 125°C durante 1 hora. Abajo, electrodo sometido a irradiación gamma de 25 KGy. Se observa el cambio de color de la fibra de vidrio y la alúmina de soporte del microelectrodo en el caso de irradiación gamma.

4.4 Determinación del rango de frecuencias

La elección del rango de frecuencias o ancho de banda a aplicar depende fundamentalmente de dos factores: el valor de la resistencia de *shunt* y los valores de la impedancia del medio para el rango de frecuencias elegido. Una adecuada selección de la resistencia de *shunt* determina una mejor relación señal/ruido y con ello mayor sensibilidad.

Es importante tener en cuenta que si el valor de la resistencia de shunt es muy bajo con respecto al valor de la impedancia del medio, entonces la señal de voltaje medida sobre la resistencia VScope 2 (ver figura 15) será muy pequeña con respecto a VScope 1 y entonces se obtendrá demasiada incertidumbre en la medida de la impedancia y como consecuencia un nivel de ruido elevado. En el caso contrario, que la resistencia de shunt sea muy alta con respecto a la impedancia del medio, entonces los valores de Vscope 2 y Vscope 1 serán muy cercanos y la determinación exacta de la caída de tensión entre ambos tendrá mayor incertidumbre y ruido.

En principio, no es posible conocer teóricamente la impedancia del medio de cultivo utilizado, por ello ha sido necesario realizar pruebas de ensayo y error utilizando como muestra el medio de cultivo con las características previamente detalladas y antes de introducir dentro de él las muestras microbiológicas a estudiar.

Como ya es conocido, la impedancia tiende a disminuir luego de sembrar los microorganismos debido a la liberación de los radicales que se producen por el metabolismo de estos y que facilitan el transporte de cargas eléctricas.

Una primera prueba se realizó utilizando el electrodo inter-digitado descrito dentro de 250 mililitros de un medio de cultivo TSB en un matraz a 37°C durante 24 horas con lecturas cada 30 minutos. Se utilizó una resistencia *shunt* de 100 ohms y se determinó que el rango de frecuencias con mejor relación señal/ruido fue de 100 Hz hasta 1 MHz (Figura 31). La amplitud del voltaje aplicado se fijó en 50 mV para evitar reacciones de oxidación/reducción en la interface entre el electrodo y el medio.

Se observa una buena relación lineal entre el logaritmo del módulo de la impedancia y la frecuencia hasta los 100 KHz. Para frecuencias más altas no hay variaciones significativas de la impedancia, lo cual concuerda con lo descrito por Yang y col en el 2003 [47] y que se observa en la Figura 6C. Del diagrama de fase respecto de la frecuencia se verifica que para frecuencias bajas, la principal componente de la impedancia está formada por la reactancia capacitiva del medio y conforme la frecuencia se incrementa el valor de la reactancia capacitiva disminuye. Para frecuencias por encima de unos 200 KHz el comportamiento de la impedancia es puramente resistivo. A partir del gráfico, podemos afirmar que por encima de 100 KHz no tendremos diferencias significativas en los cambios de la impedancia y por lo tanto no son de utilidad para el medio de cultivo utilizado. Para frecuencias por debajo de 100 Hz, con la resistencia shunt de 100 ohms la relación

señal/ruido se degrada considerablemente al ser esta de un valor muy pequeño comparado con el de la impedancia del medio.

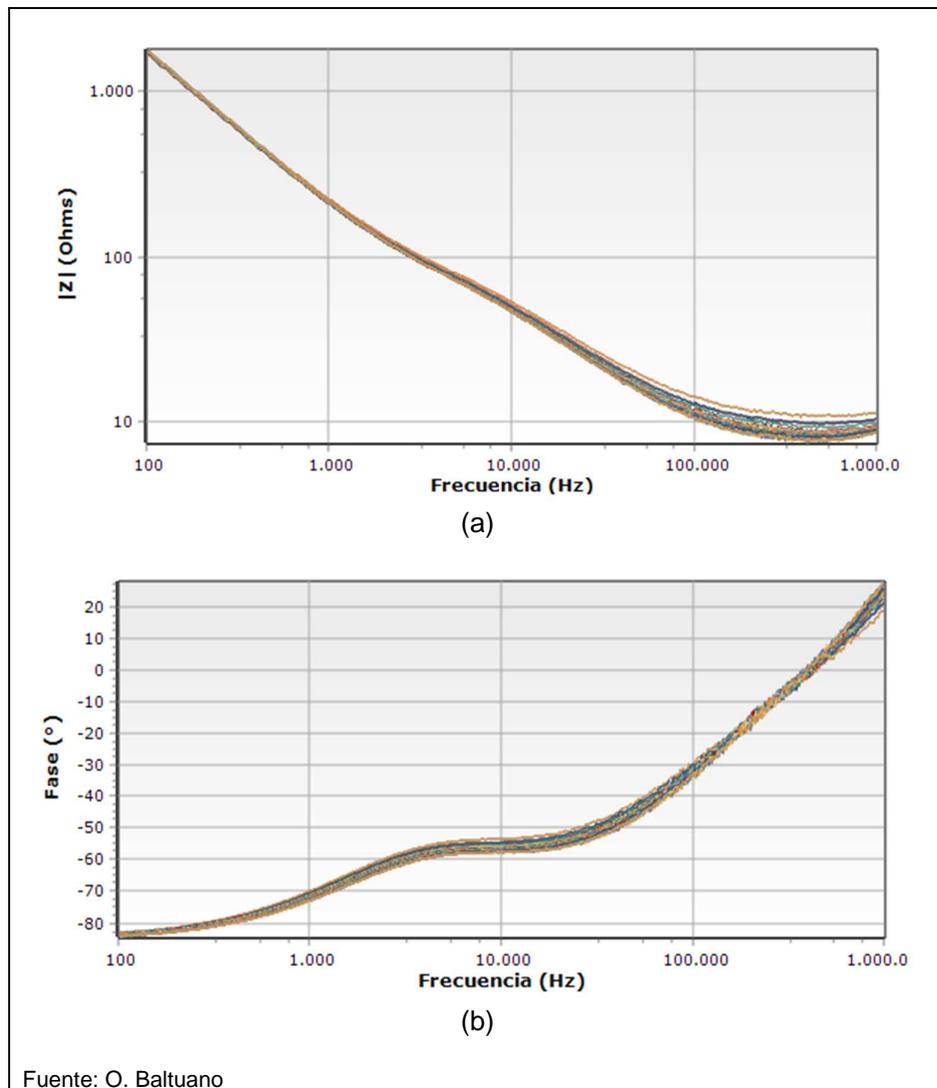


Figura 32. Diagramas de Bode sucesivos de medio de cultivo limpio en el rango de 100 Hz a 1 MHz. (a) Diagrama del módulo de la impedancia versus frecuencia, (b) diagrama de fase versus frecuencia (30/05/2019)

En las mismas condiciones anteriores, se cambió la resistencia de shunt por una de 1 K Ω y se reajustó el rango de frecuencias en el rango de 10 Hz a 100 KHz. Los resultados de estas pruebas se observan en la Figura 32.

Se observa nuevamente una muy buena correlación lineal entre el logaritmo de la impedancia y la frecuencia a lo largo de todo el intervalo. Sin embargo para frecuencias por encima de 10 KHz el valor de la impedancia se hace significativamente más pequeño

que la resistencia de *shunt* y se degrada la relación señal/ruido, lo que se manifiesta en una línea ruidosa en ambos trazos.

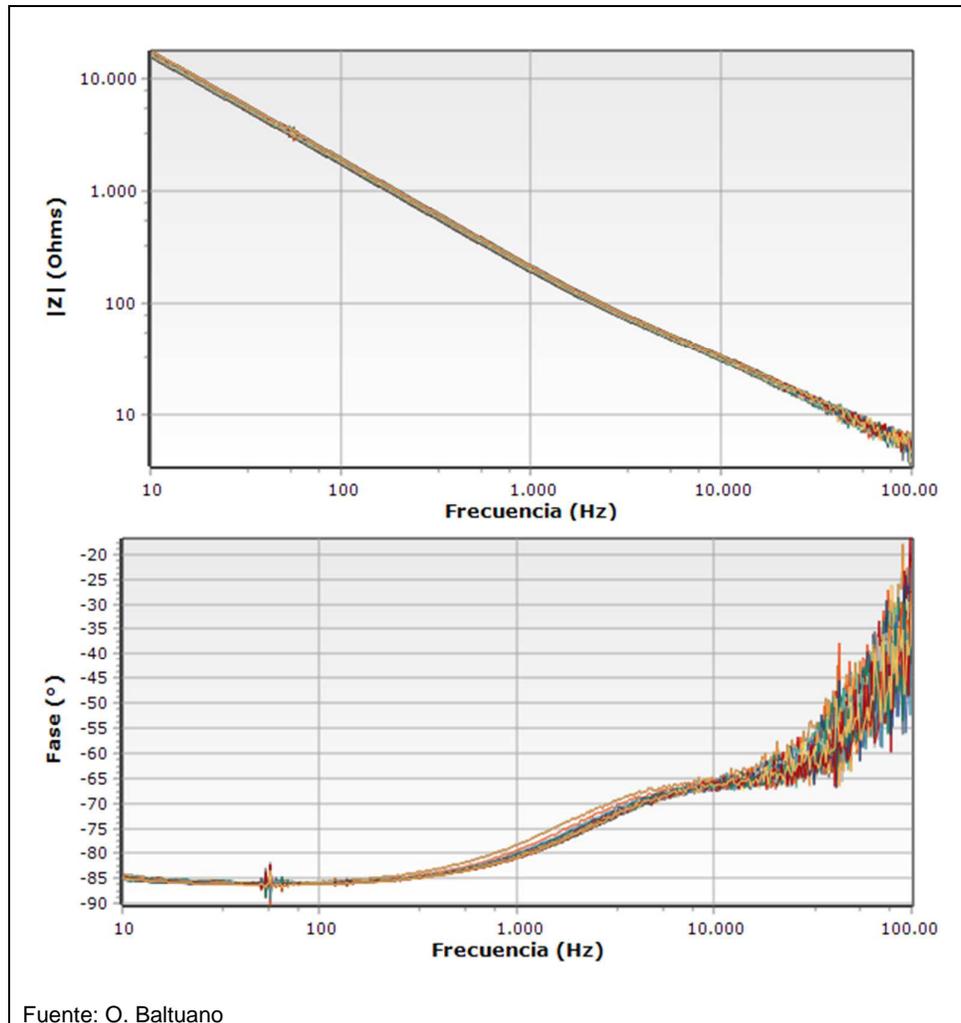


Figura 33. Diagramas de Bode sucesivos de medio de cultivo limpio en el rango de 10 Hz a 100 KHz. Arriba, diagrama del módulo de la impedancia versus frecuencia. Abajo, diagrama de fase versus frecuencia (11/06/2019)

Un fenómeno indeseado se obtuvo debido al ruido generado por la componente de 60 Hz de las líneas de alimentación y sus armónicos asociados. Puede notarse claramente este ruido alrededor de 60 Hz en el diagrama de fase. Aunque es menos claro, también se observa en el gráfico de la magnitud de la impedancia. A pesar de ello, es no es problema debido a que el análisis se realiza sobre todo el espectro de frecuencias y es posible eliminar aquellas frecuencias que contienen armónicos de 60 Hz.

Con lo observado anteriormente, se estableció que el mejor rango de frecuencias para el análisis del medio de cultivo se encontraba entre 10 Hz y 10 KHz, teniendo en cuenta evitar los armónicos de 60 Hz.

4.5 Espectros temporales de medio de cultivo limpio

Con la finalidad de estudiar el comportamiento de la impedancia y poder evaluar el tiempo de estabilización del electrodo dentro del medio de cultivo limpio (esterilizado) se ha realizado el barrido de frecuencias entre 10 Hz y 100 KHz con una amplitud de 50 mV con mediciones en intervalos de 45 minutos en 250 ml de medio de cultivo esterilizado TSB. Se obtuvieron en total 31 espectros de impedancia durante un tiempo total aproximado de 23 horas. El matraz conteniendo el medio de cultivo fue introducido dentro de una estufa a 37°C para estudiar el comportamiento en las mismas condiciones utilizadas para el cultivo de bacterias. El diagrama de Bode del módulo de los 31 espectros superpuestos se muestra en la Figura 34.

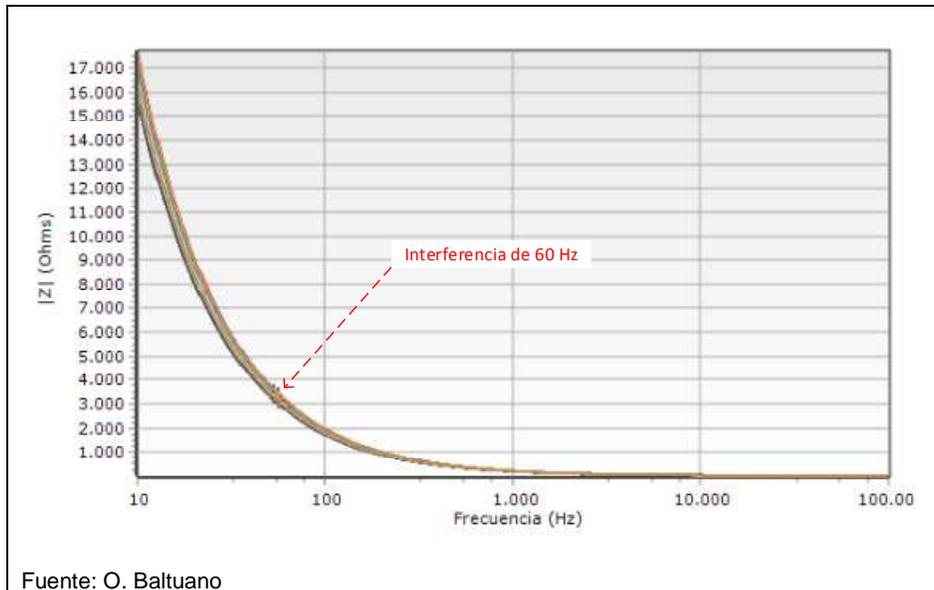
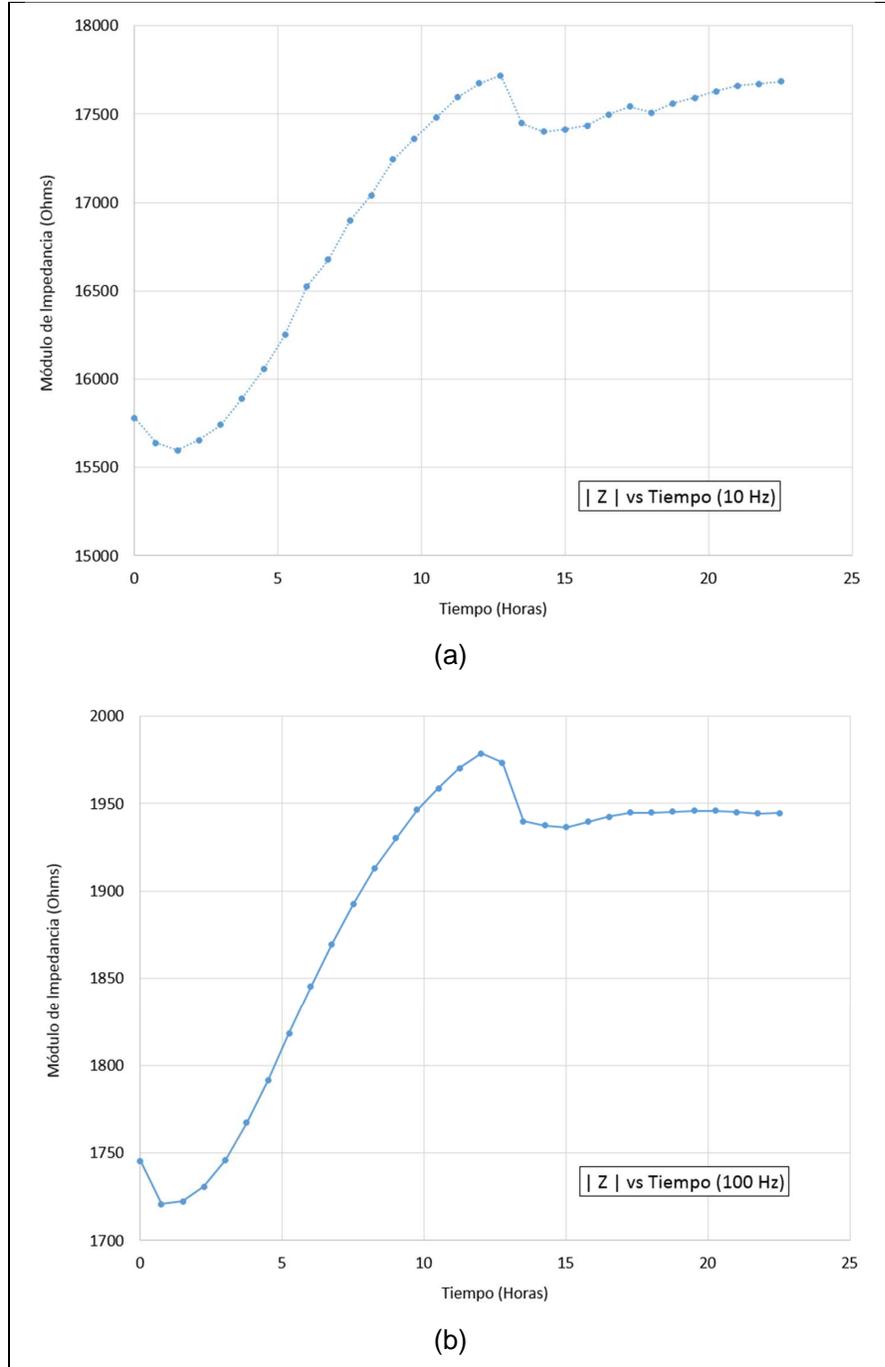


Figura 34. Diagramas del módulo de la impedancia de 31 espectros de medio de cultivo limpio en intervalos de 45 minutos. Se muestra la interferencia más significativa a 60 Hz. Los armónicos de 60 Hz no se visualizan con claridad.

En la Figura 34 se puede observar que conforme la frecuencia aumenta, los cambios de impedancia en el tiempo son menos significativos. Por ello, se ha evaluado la variación de la impedancia para 4 frecuencias diferentes: 10 Hz, 100 Hz, 1 KHz y 10 KHz. La evolución del módulo de la impedancia del medio de cultivo limpio para estas 4 frecuencias se muestra en la Figura 35. Como puede observarse, la evolución de la impedancia tiene

la misma tendencia para las 4 frecuencias, sin embargo la amplitud de la variación es mayor para frecuencias más bajas. Para una frecuencia de 10 KHz el ruido montado sobre la señal de interés es muy significativo debido a las pequeñas variaciones de la impedancia.



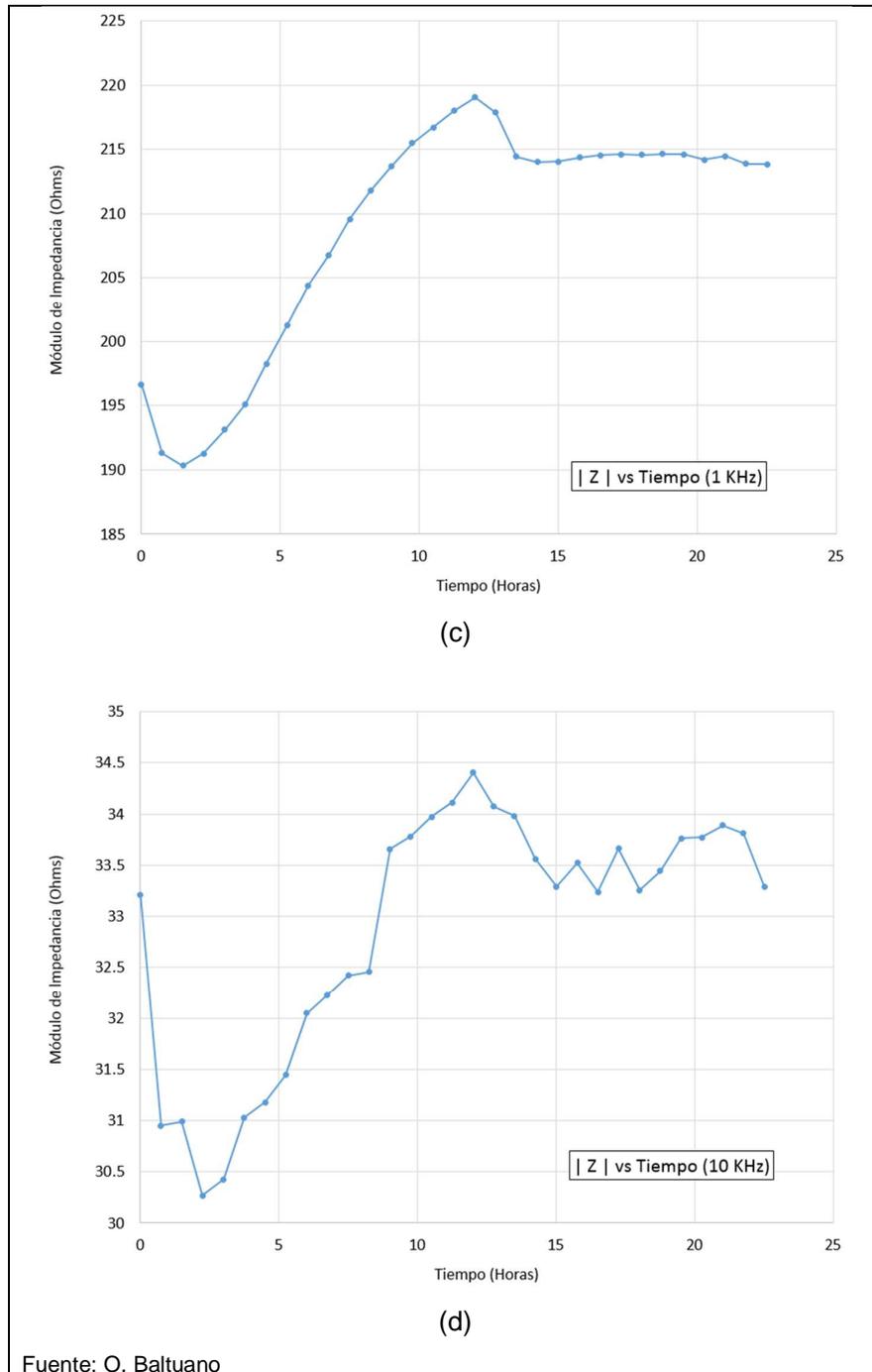


Figura 35. Variación del módulo de la impedancia en función del tiempo del medio de cultivo esterilizado para 4 frecuencias diferentes (a) 10 Hz, (b) 100 Hz, (c) 1 KHz y (d) 10 KHz).

Debido a la similitud en la forma como varía el módulo de la impedancia para todas estas frecuencias podemos establecer 3 regiones de interés en el comportamiento de la misma. Desde el momento que se inserta el electrodo inter-digitado en el medio de cultivo

TSB se produce una ligera disminución de la impedancia durante un tiempo aproximado de 2 horas. Esto podría formar parte del proceso de estabilización de la interface electrodo-electrolito y al incremento de la temperatura del medio de cultivo desde la temperatura ambiente en la que se inserta el electrodo hasta que alcanza la temperatura de 37°C dentro de la estufa de cultivo. Una segunda región se diferencia claramente durante un periodo aproximado de 10 a 11 horas en las cuales la impedancia tiende a aumentar significativamente. Esto puede ser debido a que al encontrarse el medio de cultivo de forma estanca o sin movimiento, las moléculas que conforman este medio de cultivo tendrían a asentarse sobre el fondo del matraz. Puesto que estas moléculas son las que proporcionan los portadores de carga para el transporte de la corriente eléctrica y estando el electrodo en la parte superior del medio de cultivo (Figura 28), la impedancia tendría tendencia a aumentar producto de la disminución de portadores de carga en las inmediaciones del electrodo. Independientemente de los procesos involucrados en estas dos primeras etapas, se observa que finalmente se produce la estabilización en el tiempo de las lecturas de impedancia, región 3 (Figura 36). Alcanzada esta región de estabilización se procedió a insertar los microorganismos de interés para evaluar el comportamiento de la impedancia del medio respecto del crecimiento bacteriano.

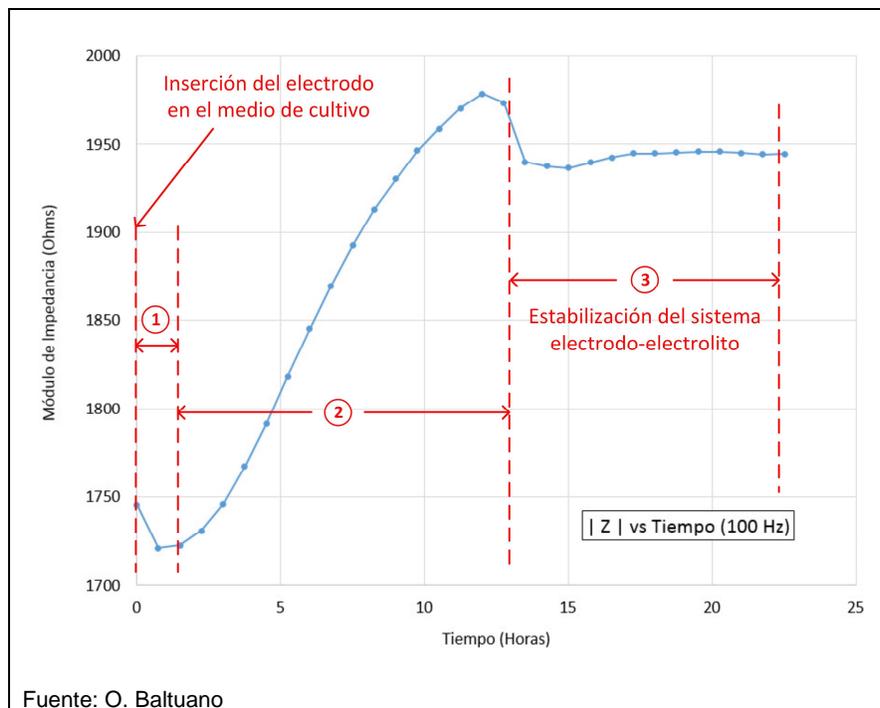
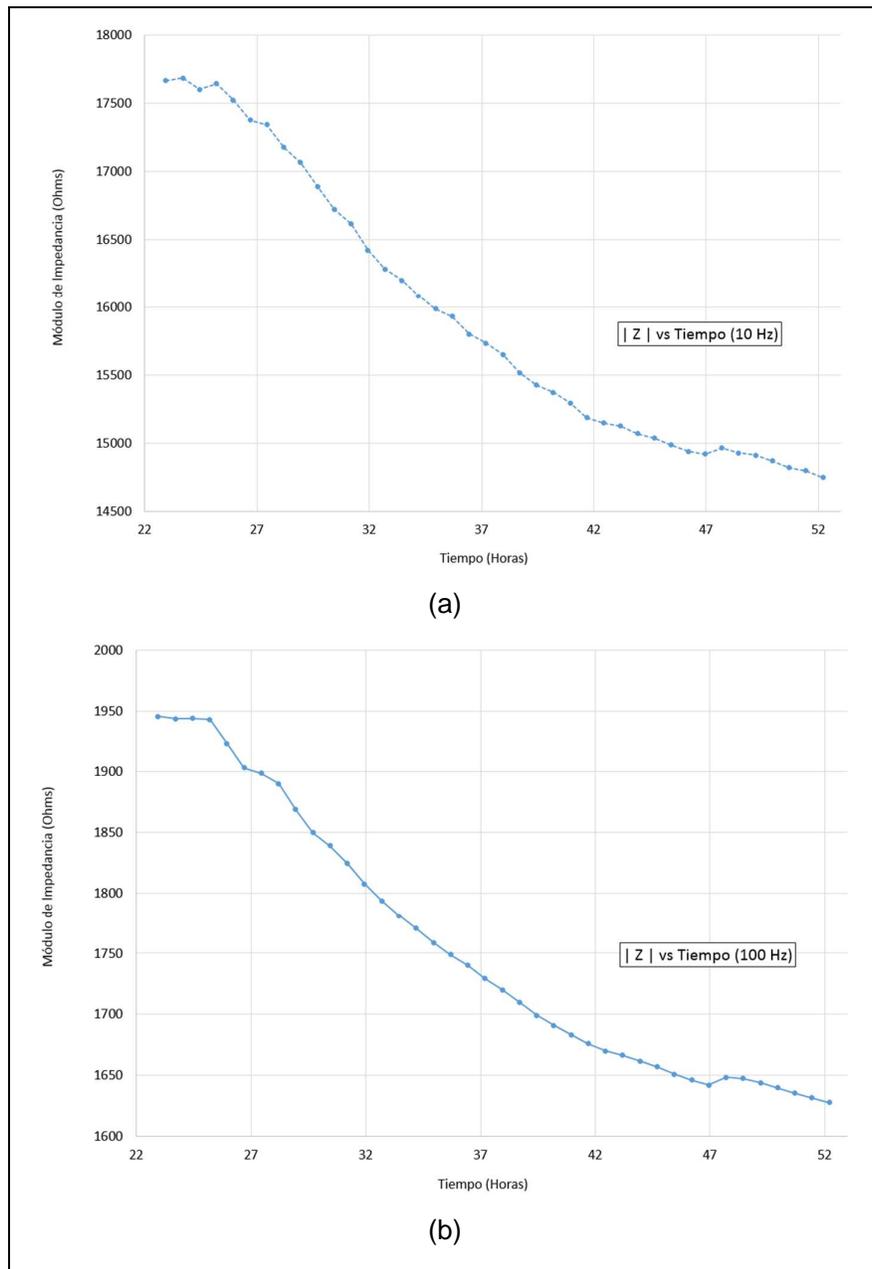


Figura 36. Regiones identificadas durante el proceso de estabilización del medio de cultivo luego de la inserción del electrodo y previo a la inoculación de los microorganismos.

4.6 Estudio de medio de cultivo con *E. Coli*

Escherichia Coli es un microorganismo que es parte de la familia denominada enterobacterias. Es un bacilo gramnegativo, no exigente y anaerobio facultativo cuya temperatura de crecimiento preferente es 37°C. Es la bacteria más abundante de la microbiota del tracto gastrointestinal y es necesaria para el correcto funcionamiento de éste. Debido a su abundancia, su velocidad de crecimiento y sus pocos requerimientos nutricionales es considerada una bacteria modelo que es utilizada muy frecuentemente en estudios de laboratorio.



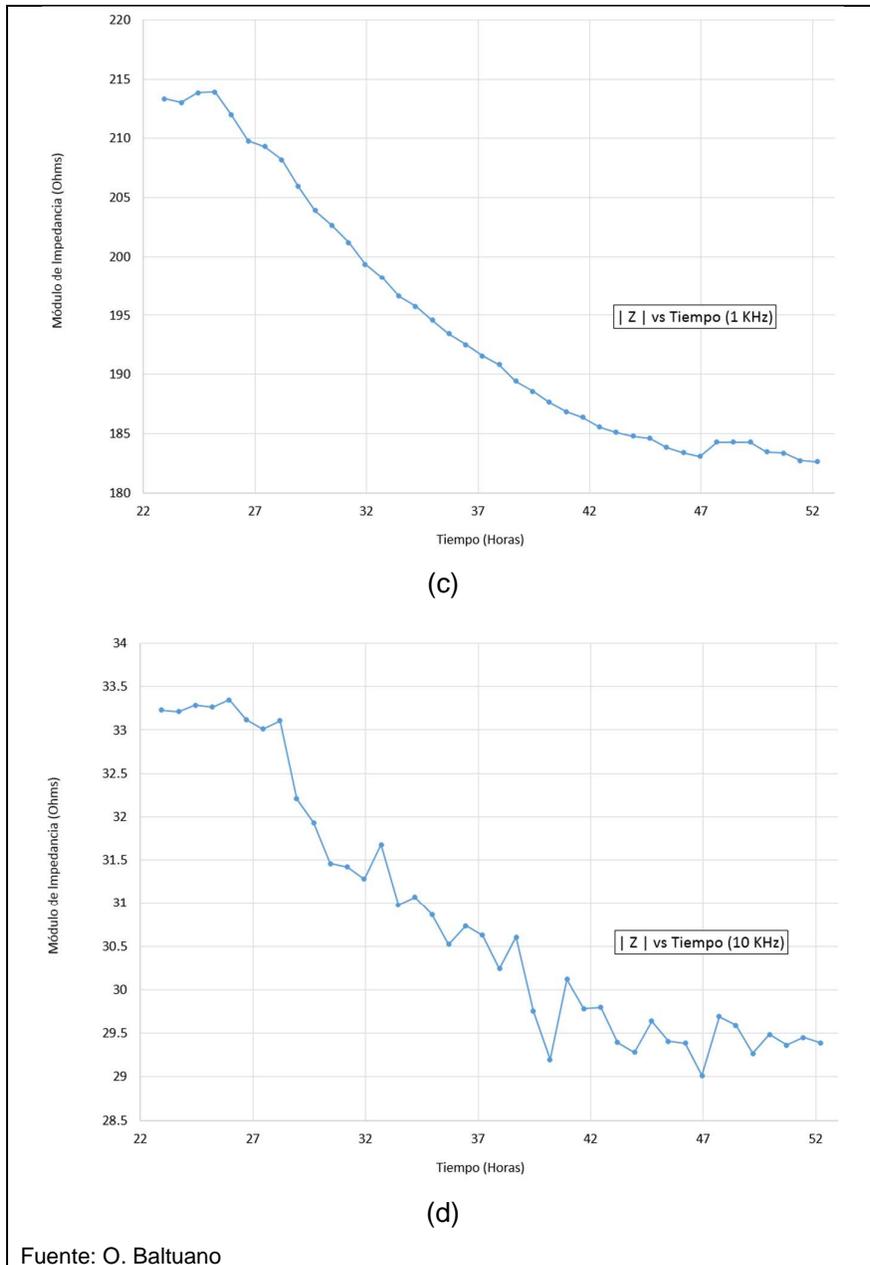


Figura 37. Variación del módulo de la impedancia en función del tiempo del medio de cultivo sobre el que ha insertado una muestra de *e. Coli* para mismas 4 frecuencias analizadas anteriormente (a) 10 Hz, (b) 100 Hz, (c) 1 KHz y (d) 10 KHz.

Para este trabajo, una vez alcanzada la estabilización del medio de cultivo con el electrodo, después de 22 horas, se procedió a agregar a éste una solución de 1 mL de agua destilada conteniendo una muestra de *e. Coli* certificada y se continuó con el registro de la impedancia de dicho medio en las mismas condiciones descritas en 4.5 durante un periodo aproximado de 30 horas, tomando espectros cada 45 minutos.

El registro del módulo del valor de impedancia en función del tiempo para las mismas 4 frecuencias mostradas en 4.5 se observan en la Figura 37. Nuevamente se evidencian las mismas características comunes: tendencia similar en todas las frecuencias, reducción del módulo de la impedancia con la frecuencia y una relación señal/ruido muy baja para la frecuencia de 1 KHz. Tomando como referencia los valores obtenidos para la frecuencia de 100 Hz, observamos claramente dos regiones bastante diferenciadas (Figura 38); que son una continuación de las regiones observadas en la Figura 36; la región 4 denominada fase de demora en la cual no se produce aún un crecimiento celular suficiente como para afectar significativamente el valor de la impedancia, esta región determina el tiempo de detección del microorganismo; y la región 5, denominada fase exponencial en la cual se hace notorio el decrecimiento no lineal de la impedancia debido al crecimiento exponencial de los microorganismos en el medio de cultivo.

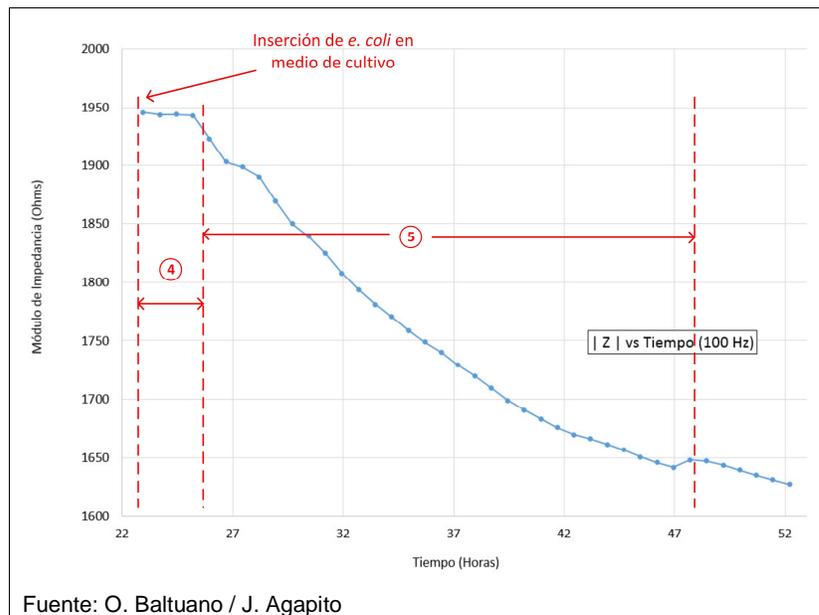


Figura 38. Regiones identificadas en la variación del módulo de la impedancia del medio de cultivo a 100 Hz luego de la inserción de una muestra de *E. Coli*.

La fase exponencial es característica del microorganismo y de las condiciones del medio de cultivo. Si para dos microorganismos diferentes se mantienen las mismas condiciones, a partir del análisis de la fase exponencial es posible determinar el tipo de microorganismo presente. La Figura 39 muestra una imagen de microscopio de las colonias de *E. Coli* que se han reproducido en el medio de cultivo en estudio.

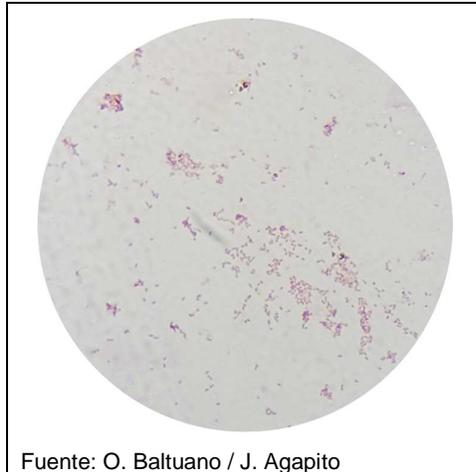


Figura 39. Colonias de *E. Coli* del medio de cultivo. El color rojizo es característico de bacterias gramnegativas.

La fase exponencial es característica del microorganismo y de las condiciones del medio de cultivo. Si para dos microorganismos diferentes se mantienen las mismas condiciones, a partir del análisis de la fase exponencial es posible determinar el tipo de microorganismo presente. La Figura 39 muestra una imagen de microscopio de las colonias de *E. Coli* que se han reproducido en el medio de cultivo en estudio.

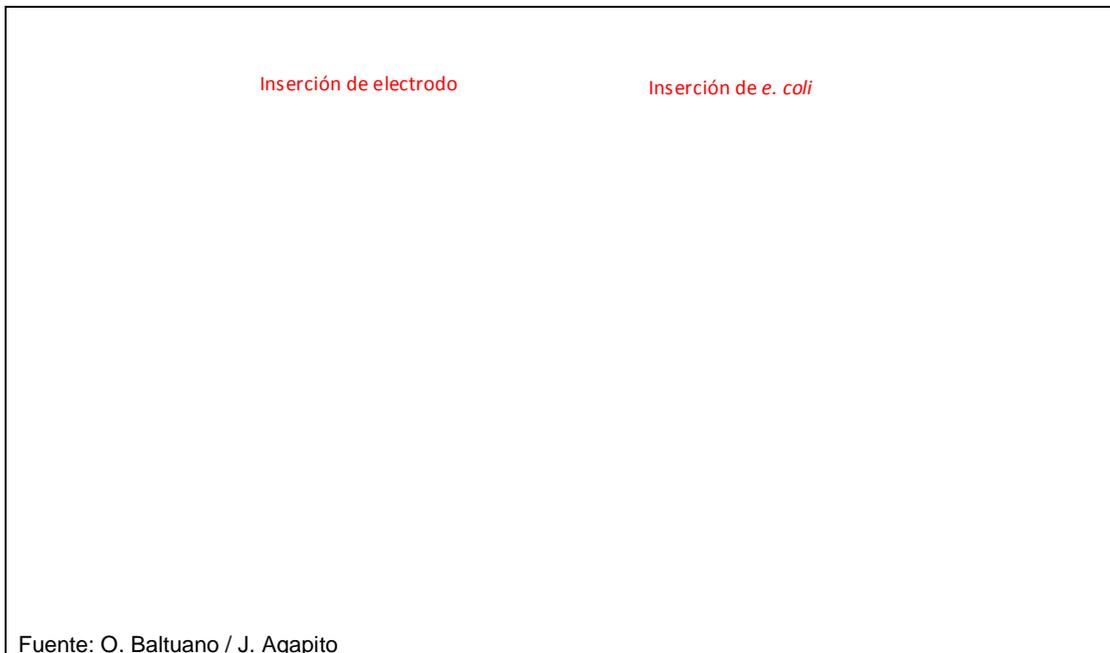


Figura 40. Grafico mostrando los cambios en el módulo de impedancia del medio de cultivo durante las 52 horas de duración total del experimento a una frecuencia de 100 Hz.

Con la finalidad de observar cualitativamente los cambios del módulo de la impedancia durante todo el experimento, en la Figura 40 se observa un gráfico integrado, a una frecuencia de 100 Hz, en los cuales por claridad se han marcado los instantes en los cuales se han insertado dentro del medio de cultivo, tanto el electrodo inter-digitado como la muestra conteniendo *E. Coli*.

4.7 Estudio de medio de cultivo contaminado

De lo observado anteriormente se hace evidente la necesidad de someter el medio de cultivo a un proceso de estabilización con el electrodo durante un periodo aproximado de al menos 12 horas (Figura 40). Cuando este requisito no se cumple, la reducción en el valor de la impedancia por el crecimiento de bacterias se verá enmascarado por el incremento de la impedancia debido al proceso de estabilización del sistema. En estas condiciones no es posible correlacionar correctamente el crecimiento de bacterias con las variaciones de la impedancia.

Como y ha sido mencionado en 4.3, existen diversos tipos de bacterias ambientales que se encuentran de forma natural en cualquier objeto, incluyendo los micro-electrodos que fueron utilizados. Cabe mencionar que durante las primeras pruebas con medios de cultivo limpios (estériles) a pesar de someter los electrodos a un proceso de esterilización con alcohol y luz ultravioleta, aun así los medios de cultivo se veían frecuentemente contaminados sin necesidad de haber introducido ninguna bacteria. Posteriormente se logró determinar que los microorganismos que se encontraban presentes eran bacilos esporulados y cocos ambientales resistentes a los procesos de esterilización utilizados. Aunque este problema fue luego solucionado realizando el enclavado de los electrodos a 125°C durante una hora, conviene revisar el resultado obtenido de las variaciones del módulo de la impedancia de uno de los medios de cultivo que se encontraban contaminados desde el instante que se introdujo en él, el electrodo de medición debido a los microorganismos ya mencionados.

En la Figura 41 se muestra el registro del módulo de la impedancia durante un periodo aproximado de 25 horas con un medio de cultivo en las condiciones descritas previamente. Es posible observar, que el valor de inicio de la impedancia es el mismo que en la Figura 40, alrededor de 1.75 K Ω y que luego durante aproximadamente 3 horas tiende a disminuir de forma similar a lo observado en la Figura 40. Sin embargo, aunque posteriormente la tendencia es creciente, dicha tendencia debería mantenerse hasta unas 10 horas después, llegando a valores cercanos a 1.95 K Ω . Contrariamente a esto, observamos que el valor

de la impedancia crece muy poco y que luego de mantenerse estable alrededor de 1.74 K Ω empieza a decrecer rápidamente a partir de la hora 11 de medición. Este comportamiento tampoco es constante ni consistente con lo observado en la Figura 40, por ello, es evidente que los valores de impedancia se encuentran afectados no sólo por el crecimiento bacteriano sino también por el proceso de estabilización del medio de cultivo, no siendo posible diferenciar y menos cuantificar la contribución de cada uno de estos fenómenos al valor de la impedancia.

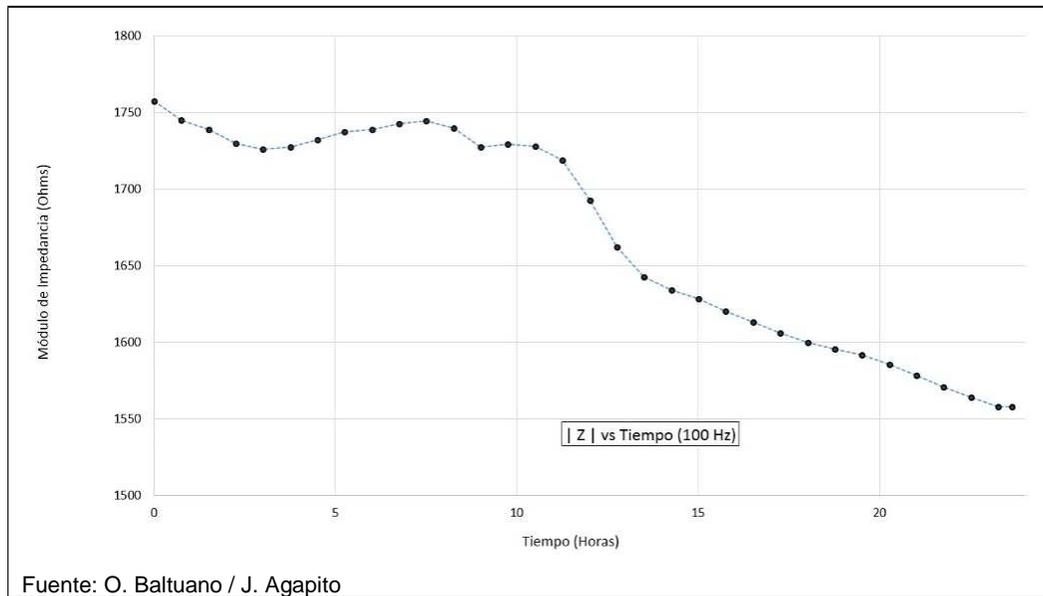


Figura 41. Variación en el tiempo del módulo de la impedancia de medio de cultivo contaminado con bacilos esporulados y cocos ambientales, sin haber alcanzado la estabilización estéril del medio de cultivo.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los objetivos planteados inicialmente para este trabajo, podemos concluir:

5.1 Conclusiones

- 5.1.1 Se ha logrado desarrollar y poner en operación un equipo medidor de impedancia eléctrica compacto y autónomo con capacidad para hasta 8 electrodos bipolares (de dos terminales), el mismo que es altamente configurable a las necesidades de diversas aplicaciones.
- 5.1.2 Se ha demostrado la utilidad del equipo desarrollado para ser utilizado en investigación y aplicaciones microbiológicas, específicamente en la caracterización de *Escherichia coli* mediante el estudio de la correlación temporal entre el módulo de la impedancia del medio con la tasa de crecimiento celular de este microorganismo.
- 5.1.3 Dentro de los parámetros más significativos que pueden ser controlados en el equipo son: el rango de frecuencias de barrido, la amplitud de la señal de excitación sinusoidal, la selección de la resistencia de *shunt* para la medición de la corriente, el número de puntos de frecuencias a muestrear y el número de muestras que se pueden promediar para cada punto de medición.
- 5.1.4 El equipo no requiere el uso de una PC o computadora dedicada para su operación pero al incluir una SBC (single board computer) dentro de él, mantiene todas las ventajas funcionales de utilizar una computadora convencional, por ejemplo: conexión inalámbrica, capacidad para operar con tecnología IoT, conexión de periféricos, capacidad para el desarrollo de interfaces con el usuario, entre otras.
- 5.1.5 El rango de frecuencias que son de utilidad para el estudio del proceso de crecimiento de microorganismos se encuentra comprendido entre los 10 Hz y 10 KHz y con amplitudes de voltaje de excitación no mayores a 100 mV para evitar reacciones de oxidación reducción en la interface electrodo-electrolito.

- 5.1.6 En las condiciones que se han realizado las mediciones, una vez introducido el electrodo dentro del medio de cultivo, se requiere esperar un tiempo aproximado de 12 horas para lograr la estabilización del sistema electrodo-electrolito, antes de introducir los microorganismos a estudiar. De no mantener este tiempo previo de estabilización, la reducción de la impedancia como consecuencia del incremento de iones conductores en el medio de cultivo se vería interferida por el proceso de estabilización que produce que la impedancia se incremente, con lo cual las lecturas medidas no pueden atribuirse de manera inequívoca únicamente a la multiplicación celular.
- 5.1.7 El desarrollo local de instrumentación científica en su variante de *instrumentación alternativa*, que generalmente es de un costo mucho menor que la instrumentación propietaria, contribuye a brindarnos sostenibilidad tecnológica puesto que los requerimientos de diseño, re-diseño, actualizaciones, mantenimientos preventivos, mantenimiento correctivos y modernizaciones pueden hacerse de forma local. Todo ello facilita considerablemente el proceso de adaptación de los equipos a los requerimientos de diversas aplicaciones.
- 5.1.8 Se ha contribuido a sentar las bases para realizar localmente investigación y desarrollo en microbiología de impedancia eléctrica, una técnica que los últimos años ha tenido un crecimiento exponencial de sus aplicaciones pero que contradictoriamente dicho crecimiento no se ha visto reflejado en el medio local probablemente por la complejidad y costo de los equipos necesarios, tendencia que con el desarrollo de este trabajo se busca revertir en parte.

5.2 Recomendaciones

Al ser éste, un trabajo de base en el desarrollo de instrumentación para estudios de microbiología de impedancias, hay innumerables mejoras que son susceptibles de ser implementadas. Las más relevantes e inmediatas podrían ser:

- 5.2.1 Incluir un agitador magnético y su correspondiente pastilla dentro de cada matraz conteniendo el medio de cultivo. Esto podría permitir reducir significativamente el tiempo de estabilización del sistema antes de la inserción de los microorganismos a estudiar. Mantener en movimiento el medio de cultivo permitiría su permanente homogenización.

- 5.2.2 Adicionar al equipo, los componentes necesarios para incluir un circuito potencioestático a la salida del generador de funciones con la finalidad de poder utilizar electrodos de 3 o 4 terminales que incluyan un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar. Esto permitiría reducir los errores debidos a las capacitancias parásitas de los cables y terminales.
- 5.2.3 Utilizar microelectrodos inter-digitados con mayor superficie de medición, lo cual se logra con “dedos” comparativamente más pequeños y menor separación inter-digital. Esto permite obtener corrientes mayores con menor amplitud de voltaje de excitación lo que mejora la sensibilidad del instrumento.
- 5.2.4 Desarrollar una interface de usuario específica para cada aplicación con la finalidad de evitar utilizar el software WaveForms de Digilent que aunque proporciona control sobre todas las variables del módulo Analog Discovery 2, puede ser algo confuso de utilizar por un usuario no familiarizado con él.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kokka, A. Poikonen, T. et al, Development of White LED iluminants for colorimetry and recommendation of hite LED reference spectrum for photometry. *Metrologia* 55 (2018) 526-534. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1681-7575/aacae7>
- 2 A. Estrada-Hernández, L.P. González-Galván, E. Rosas. New paradigms in LED photometry and colorimetry. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 2009. doi: 10.1117/12.848783
- 3 <https://www.instructables.com/id/An-Inexpensive-Photometer-and-Colorimeter/>
- 4 Kassio Michell Gomes de Lima, A portable photometer based on LED for the determination of aromatic hydrocarbons in water. *Microchemical Journal* 103 (2012) 62-67. doi:10.1016/j.microc.2012.01.003
- 5 Dong-Yong sin, In-Yong Eom. A Pair of Light Emitting Diodes for Absorbance Measurement. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2013, Vol. 34, No. 10. <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.10.3150>
- 6 <https://www.semanticscholar.org/paper/A-Low-Cost-LED-Based-Spectrometer-Yeh-Tseng/79ecd3574e48943e689b968099f49bb6a4a50640>
- 7 <https://www.afriscitech.com/en/scientists/young-scientists/870-doing-experimental-science-in-africa-how-to-11-francois-piuzzi-make-scientific-instruments-with-a-sustainable-cost>
- 8 Arbildo López, A., Buendía Platas, E. y Montoya Rossi, E. (2013). Uso de la instrumentación alternativa para el control de calidad industrial en línea usando las entradas y salidas de audio de un computador.
- 9 Arbildo López, A. y Montoya Rossi, E. (2015). Aplicación de la instrumentación alternativa para clasificación de productos por huella espectrométrica. En Instituto de Investigación Científica de la Universidad de Lima (Ed.), *Anuario de Investigaciones 2015* (pp. 124-125). Universidad de Lima.
- 10 Montoya Rossi, E., Baltuano Elías, Ó., Arbildo López, A. (2013). Espectrómetro para radiación visible hecho en casa, de bajo costo y altas prestaciones. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(1), 80-91.
- 11 Baltuano, O., Hernández, Y., Mendoza, P., Montoya, E. (2010). Desarrollo de un espectrómetro de partículas alfa de bajo costo. *Informe Científico Tecnológico. IPEN.* 2010; 10:167-170. <http://dspace.ipen.gob.pe/handle/ipen/652>

- 12 Orazem, M. E. and Tribollet, B.: *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley and Sons, 2008.
- 13 Kaspar, C. W. and Tartera, C.: *Methods in Microbiology*, edited by: Grigorova, R. and Norris, J. R., London, Academic press, 497–531, 1990.
- 14 Felice CL, Valentinuzzi ME. Medium and interface components in impedance microbiology. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1999;46:483-7.
- 15 Cady P, Hardy D, Martins S, Dufour SW, Kraeger SJ. Automated impedance measurements for rapid screening of milk microbial content. *J Food Prot* 1978;41(4): 277-83.
- 16 Gnan S, Luedecke LO. Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count. *J Food Prot* 1982;45(1):4-7.
- 17 Martins SB, Selby MJ. Evaluation of a rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures. *Appl Environ Microbiol* 1980;39:518-24.
- 18 Nieuwenhof FFJ, Hoolwerf JD. Detection of post-pasteurization contamination of pasteurized milk with the Bioscreen, Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, NIZO-EDE Report. 1205. Nov 1986:10.
- 19 Easter MC, Gibson DM. Rapid and automated detection of Salmonella by electrical measurement. *J Hyg* 1985;94: 245-62.
- 20 Gibson MD. Some modification to the media for rapid automated detection of Salmonellas by conductance measurement. *J Appl Bacteriol.* 1987;63:299-304. [10] Ogden ID. A conductance médium to distinguish between Salmonella and Citrobacter spp. *Int. J Food Microbiol* 1988;7:287-97.
- 21 Evans HAV. A note on two uses for impedimetry in brewing microbiology. *J Appl Bacteriol* 1982;53:423-6.
- 22 Henschke PA, Thomas DS. Detection of wine yeast by electronic methods. *J Appl Bacteriol* 1988;64:123-33.
- 23 Van Spreekens KJA, Stekelenburg FK. Rapid estimation of the bacteriological quality of fresh fish by impedance measurements. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986; 24:95-6.
- 24 Connolly P, Bloomfield SF, Denyer SP. The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetic products. *J Appl Bacteriol* 1994;76: 68-74.
- 25 Deak T, Beuchat LR. Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeasts in fruit juices. *J Appl Bacteriol* 1993;75:546–50.
- 26 Silverman MP, Munoz EF. Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:521-6.

- 27 Cady P, Dufour SW, Lawless P, Nunke B, Kraeger SJ. Impedimetric screening for bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1978;7:273-8.
- 28 Buckland A, Kessock-Philip S, Bascomb S. Early detection of bacterial growth in blood culture by impedance monitoring with a Bactometer model 32. *J Clin Pathol* 1983;36: 823-8.
- 29 Fehlhaber K, Kruger G. The study of Salmonella enteritidis growth kinetics using rapid automated bacterial impedance technique. *J Appl Microbiol* 1998;84:945-9.
- 30 Marco Grossi, Bruno Riccò. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: a review. *Journal of Sensors and Sensor Systems*, 2017, 6, pp.303 - 325. [ff10.1016/j.corsci.2008.08.049](https://doi.org/10.1016/j.corsci.2008.08.049)[ff](https://doi.org/10.1016/j.corsci.2008.08.049). [ffhal-01579247f](https://doi.org/10.1016/j.corsci.2008.08.049)
- 31 Gould IM, Jason AC, Milne K. Use of the Malthus Microbial Growth Analyser to study the post antibiotic effect of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1989;24(4): 523-31.
- 32 Bactometer. [<http://industry.biomerieux-usa.com/industry/food/bactometer/index.htm> 24 oct 2008].
- 33 Don Whitley Scientific. 2008. [<http://www.dwscientific.co.uk/>, 24 oct 2008].
- 34 BacTrac.2008. [<http://www.sylab.com/bactrac.htm>, 24 oct 2008].
- 35 Analog Devices [<https://www.analog.com/en/products/ad5933.html>]
- 36 Alonso-Arce, M., Legarda, J., Sedano, B., and Bustamante, P.: Ultra Low-Power Smart Medical Sensor Node for In-Body Biomonitoring, *IEEE 15th International Conference on e-Health Networking, Applications and Services (Healthcom)*, 491–496, 2013.
- 37 Margo, C., Katrib, J., Nadi, M., and Rouane, A.: A four-electrode low frequency impedance spectroscopy measurement system using the AD5933 measurement chip, *Physiol. Meas.*, 34, 391–405, 2013.
- 38 Van Grinsven, B., Vandenryt, T., Duchateau, S., Gaulke, A., Grieten, L., Thoelen, R., Ingebrandt, S., De Ceuninck, W., and Wagner, P.: Customized impedance spectroscopy device as possible sensor platform for biosensor applications, *Phys. Status Solidi A*, 4, 919–923, 2010.
- 39 Chuang, C.-H., Du, Y.-C., Wu, T.-F., Chen, C.-H., Lee, D.-H., Chen, S.-M., Huang, T.-C., Wu, H.-P., and Shaikh, M. O.: Immunosensor for the ultrasensitive and quantitative detection of bladder cancer in point of care testing, *Biosens. Bioelectron.*, 84, 126–132, 2016.
- 40 Kamat, D. K., Bagul, D., and Patil, P. M.: Blood Glucose Measurement Using Bioimpedance Technique, *Adv. Electron.*, 2014, 1–5, 2014.
- 41 Ferreira, J., Seoane, F., Ansele, A., and Bragos, R.: AD5933-based Spectrometer for Electrical Bioimpedance Applications, *International Conference on Electrical*

- Bioimpedance, J. Phys. Conf. Ser., 224, 012011, <https://doi.org/10.1088/1742-6596/224/1/012011>, 2010.
- 42 Digilent Homepage [<https://store.digilentinc.com/analog-discovery-2-100msps-usb-oscilloscope-logic-analyzer-and-variable-power-supply/>]
 - 43 Raspberry Homepage [<https://www.raspberrypi.org/>]
 - 44 BeagleBoard.org Homepage [<https://beagleboard.org/bone>]
 - 45 Orange Pi Homepage [<http://http://www.orangepi.org/>]
 - 46 Nardo Ramírez, Angel Regueiro, Olimpia Arias, Rolando Contreras: Espectroscopía de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico. *Bioteología Aplicada* 2009; 26:65-71
 - 47 Yang L, Ruan C, Li Y. Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosens Bioelec-tron* 2003;19:495-502

ANEXOS

ANEXO A: Script utilizado para la operación del equipo

```
//-- SCRIPT PARA CONTROL DE EQUIPO MEDIDOR DE IMPEDANCIA MULTIELECTRODO
//-- O. Baltuano
//-- v1.0 - 2019

//-- Configura todas las líneas digitales como salidas tipo interruptor
//-- para el control de los relays de selección de resistencia de shunt
//-- y selección de electrodo de trabajo
function ConfigIOstatic(){
StaticIO.Channel0.DIO0.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channel0.DIO1.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channel0.DIO2.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channel0.DIO3.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channel0.DIO4.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channel0.DIO5.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channel0.DIO6.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channel0.DIO7.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channell.DIO8.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channell.DIO9.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channell.DIO10.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channell.DIO11.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channell.DIO12.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channell.DIO13.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channell.DIO14.Mode.text = "Switch";
StaticIO.Channell.DIO15.Mode.text = "Switch";
}

// -- Selección de resistencia shunt
// -----
function SelectResistorShunt1(){
StaticIO.Channel0.DIO0.value = 1;
StaticIO.Channel0.DIO1.value = 0;
StaticIO.Channel0.DIO2.value = 0;
StaticIO.Channel0.DIO3.value = 0;
}

function SelectResistorShunt2(){
StaticIO.Channel0.DIO0.value = 0;
StaticIO.Channel0.DIO1.value = 1;
StaticIO.Channel0.DIO2.value = 0;
StaticIO.Channel0.DIO3.value = 0;
Impedance1.Resistor.value = 1E3;
}

function SelectResistorShunt3(){
StaticIO.Channel0.DIO0.value = 0;
StaticIO.Channel0.DIO1.value = 0;
StaticIO.Channel0.DIO2.value = 1;
StaticIO.Channel0.DIO3.value = 0;
Impedance1.Resistor.value = 1E4;
}

function SelectResistorShunt4(){
StaticIO.Channel0.DIO0.value = 0;
StaticIO.Channel0.DIO1.value = 0;
StaticIO.Channel0.DIO2.value = 0;
}
```

```

StaticIO.Channel0.DIO3.value = 1;
Impedancel.Resistor.value = 1E5;
}

// -- Selección de electrodo de trabajo
// -----
function SelectElectrodeChannel1(){
StaticIO.Channel1.DIO8.value = 1;
StaticIO.Channel1.DIO9.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO10.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO11.value = 0;
}

function SelectElectrodeChannel2(){
StaticIO.Channel1.DIO8.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO9.value = 1;
StaticIO.Channel1.DIO10.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO11.value = 0;
}

function SelectElectrodeChannel3(){
StaticIO.Channel1.DIO8.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO9.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO10.value = 1;
StaticIO.Channel1.DIO11.value = 0;
}

function SelectElectrodeChannel4(){
StaticIO.Channel1.DIO8.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO9.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO10.value = 0;
StaticIO.Channel1.DIO11.value = 1;
}

//-- Habilitación de fuentes +5V
//-----
function EnablePowerSupply(){
Supplies.Output.PositiveSupply.Voltage.value = 5.0;
Supplies.Output.PositiveSupply.enable = true;
Supplies.MasterEnable.checked = true;
}

//-- Configuración de parámetros de barrido
//-- de impedancia
//-----
function doImpedance() {
Impedancel.Frequency.Start.value = 1E2;
Impedancel.Frequency.Stop.value = 1E5;
Impedancel.Frequency.Samples.value = 2;
Impedancel.single();
Impedancel.wait();
}

//--PUNTO DE ENTRADA DEL SCRIPT--
if(!('StaticIO' in this)) {
throw("No se encuentra abierto el control digital IO");
}
if(!('Impedancel' in this)) {
throw("No se encuentra abierto el analizador de impedancia");
}
if(!('Supplies' in this)) {
throw("No se encuentra abierta la fuente de alimentación");
}

//----LAZO PRINCIPAL-----
print(Supplies.Input.USBMonitor.Current.value)
print("Iniciando análisis.....");

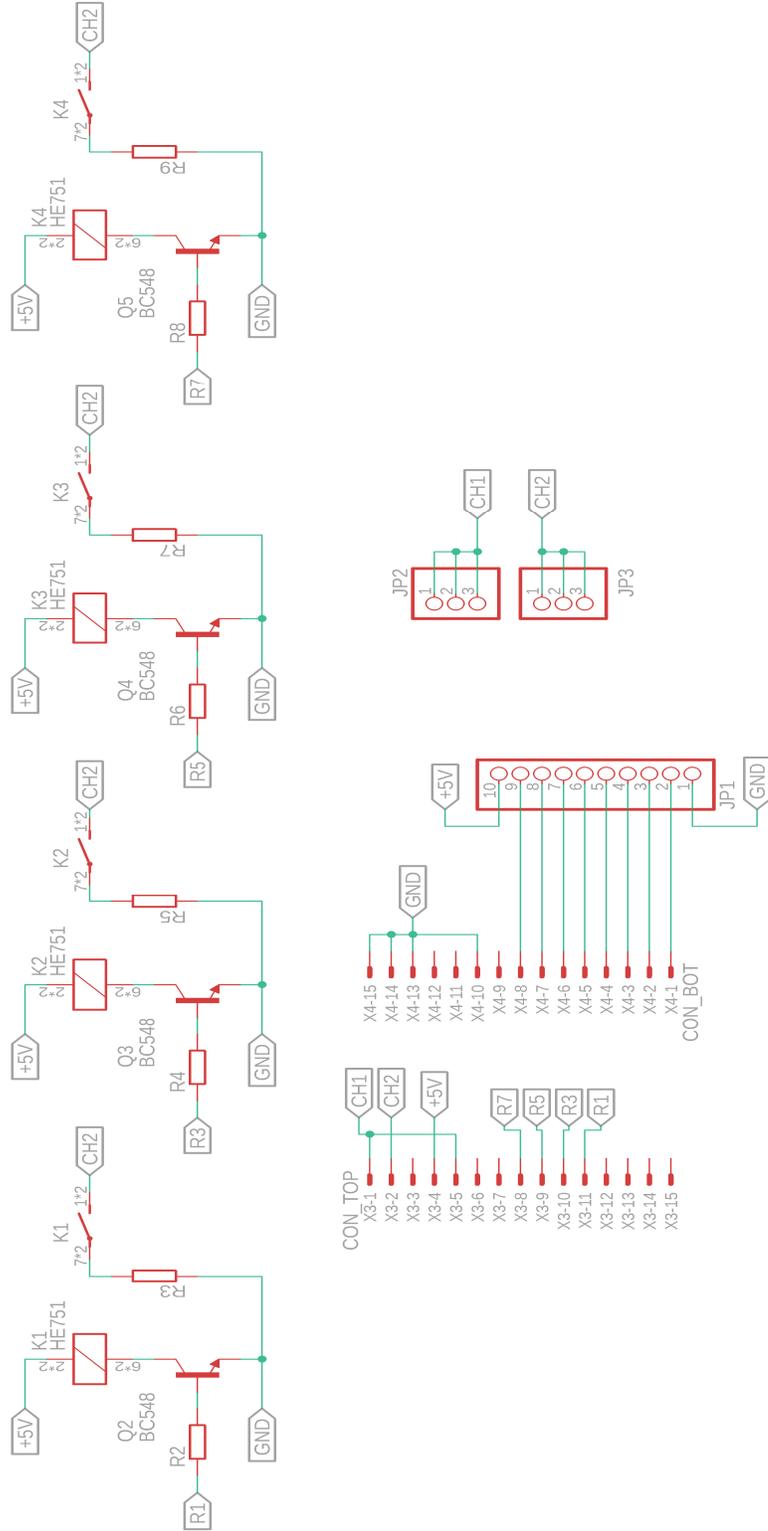
```

```

//if Tool.question("¿Iniciar Lecturas?") {
ConfigIOstatic();
EnablePowerSupply();
for (i=1000; i<=1300; i++)
{
//--Secuencia electrodo 01
//-----
SelectResistorShunt1();
SelectElectrodeChannel1();
print(" Electrodo 01 - Secuencia " + i);
doImpedance();
Impedancel.Export("F:/Impedance/Electrode1/data"+i+".eis");
wait(10);
//--Secuencia electrodo 02
//-----
SelectResistorShunt1();
SelectElectrodeChannel2();
print(" Electrodo 02 - Secuencia " + i);
doImpedance();
Impedancel.Export("F:/Impedance/Electrode2/data2"+i+".eis");
wait(10);
//--Secuencia electrodo 03
//-----
//SelectResistorShunt1();
//SelectElectrodeChannel3();
//print(" Secuencia " + i);
//doImpedance();
//Impedancel.Export("F:/Impedance/Electrode3/data2"+i+".eis");
//wait(600);
//--Secuencia electrodo 04
//-----
//SelectResistorShunt1();
//SelectElectrodeChannel4();
//print(" Secuencia " + i);
//doImpedance();
//Impedancel.Export("F:/Impedance/Electrode4/data2"+i+".eis");
//wait(600);
}
//}
print("¡Análisis finalizado!");

```

ANEXO B: Diagrama de tarjeta para selección de resistencia shunt



ANEXO C: Diagrama de tarjeta de selección de electrodo

