

# Proyecto Fin de Carrera Ingeniería Industrial

## Integración en un Lab-on-a-Chip del método de detección de *Cryptosporidium parvum* mediante inmunofluorescencia directa con tecnología MEMS

Autor: María Dolores Calero Fontenla

Tutor: Francisco Antonio Perdigones Sánchez

Dep. Ingeniería Electrónica  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2016





Proyecto Fin de Carrera  
Ingeniería Industrial

**Integración en un Lab-on-a-Chip del método de  
detección de *Cryptosporidium parvum*  
mediante inmunofluorescencia directa con  
tecnología MEMS**

Autor:

María Dolores Calero Fontenla

Tutor:

Francisco Antonio Perdigones Sánchez

Profesor Ayudante Doctor

Dep. Ingeniería Electrónica  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2016



Proyecto Fin de Carrera: Integración en un Lab-on-a-Chip del método de detección de *Cryptosporidium parvum* mediante inmunofluorescencia directa con tecnología MEMS

Autor: María Dolores Calero Fontenla  
Tutor: Francisco Antonio Perdigones Sánchez

El tribunal nombrado para juzgar el trabajo arriba indicado, compuesto por los siguientes profesores:

Presidente:

Vocal/es:

Secretario:

acuerdan otorgarle la calificación de:

El Secretario del Tribunal

Fecha:



# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
1.1. Riesgo de la presencia de <i>Cryptosporidium</i> en el agua potable . . . . .	3
1.2. Legislación sobre el control de <i>Cryptosporidium</i> en aguas potables . .	5
1.3. Objetivos . . . . .	6
<b>2. Estado del arte</b>	<b>7</b>
2.1. Introducción . . . . .	7
2.2. Metodología de detección estándar de los <i>Cryptosporidium Parvum</i> .	7
2.3. Técnicas de detección no convencionales. . . . .	10
<b>3. Conceptos previos</b>	<b>19</b>
3.1. Conceptos básicos de microfluídica . . . . .	19
3.1.1. Conceptos importantes de teoría de fluidos . . . . .	19
3.1.2. Números adimensionales . . . . .	28
3.1.3. Concepto de microfluídica y leyes de escala . . . . .	31
3.2. Concepto de inmunofluorescencia e inmunomagnetismo . . . . .	33
3.2.1. Inmunomagnetismo (IMS) . . . . .	33
3.2.2. Inmunofluorescencia . . . . .	34
<b>4. Diseño</b>	<b>39</b>
4.1. Proceso de concentración y detección de <i>Cryptosporidium Parvum</i> . .	39
4.2. Diseño de un concentrador de partículas en espiral . . . . .	40
4.2.1. Diseño microfluídico del separador . . . . .	40
4.2.2. Diseño geométrico del separador espiral . . . . .	46
4.2.3. Diseño del proceso de recirculación . . . . .	50
4.3. Diseño de un separador de partículas por IMS . . . . .	55
4.3.1. Diseño del canal de separación . . . . .	57

4.4. Diseño del analizador de partículas mediante inmunofluorescencia . . .	64
4.5. Integración . . . . .	67
<b>5. Conclusiones</b>	<b>69</b>
<b>6. Trabajos futuros</b>	<b>71</b>
<b>A. Apéndice</b>	<b>73</b>
A.1. Régimen de Hagen–Poiseuille ( $2D$ ) . . . . .	73
A.2. Máscaras (LEdit) . . . . .	75
A.2.1. Microsistema de concentración . . . . .	75
A.2.2. Microsistema de análisis . . . . .	77
A.3. Propiedades termodinámicas . . . . .	81
A.3.1. Propiedades del agua . . . . .	81
A.3.2. Propiedades del aire seco . . . . .	82
A.4. Código Matlab . . . . .	85
A.4.1. Diseño del separador de partículas en espiral . . . . .	85
A.4.2. Diseño del separador por inmunomagnetismo . . . . .	88
A.4.3. Exportación de la geometría completa de una cámara presu- rizada a L-Edit . . . . .	90
A.4.4. Exportación de la geometría de una separador espiral a L-Edit	92
A.4.5. Exportación de la geometría de un mezclador a L-Edit . . . . .	95
<b>Bibliografía</b>	<b>99</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>99</b>
<b>Nomenclatura</b>	<b>105</b>

# Resumen

En el agua potable se pueden encontrar diferentes tipos de patógenos, entre ellos los *Cryptosporidium Parvum*. Este patógeno obtiene mayor relevancia frente a los otros debido a su inmunidad frente al tratamiento de cloración que se desarrolla en las plantas potabilizadoras para la eliminación de los patógenos.

Por ello, es preciso desarrollar técnicas de detección de este tipo de patógenos, para un control y tratamiento de éste.

Actualmente, las técnicas utilizadas requieren de una cantidad de tiempo muy elevada para su realización y además, son técnicas muy costosas debido a que prácticamente todo el proceso de detección se realiza manualmente, por lo que se requiere de operarios cualificados, y con la utilización de equipos de detección caros.

Por ello, la principal motivación de la realización de este proyecto ha sido realizar una nueva técnica basada en la integración de dicho proceso de detección en un Lab-on-a-Chip, para así conseguir una total automatización de dicho proceso de detección, consiguiendo a su vez la reducción de tiempo de elaboración y de costos debido a que los equipos utilizados serían de bajo coste y no haría falta operarios.

Los principales puntos desarrollados en este proyecto son:

- *Capítulo 1:*

Que es el *Cryptosporidium Parvum*, el riesgo que conlleva su ingesta y la normativa correspondiente al tratamiento de dicho patógeno. Métodos de detección para el *Cryptosporidium Parvum*.

- *Capítulo 2:*

Conceptos básicos de microfluídica. Que es el inmunomagnetismo y la inmunofluorescencia.

- *Capítulo 3:*

Proceso de concentración y detección de *Cryptosporidium Parvum*. Diseño de un concentrador de partículas según su tamaño. Diseño de un separador de partículas por IMS según su tipología. Diseño de un analizador de partículas por inmunofluorescencia para la detección de éstas.

# 1. Introducción

## 1.1. Riesgo de la presencia de *Cryptosporidium* en el agua potable

Hoy en día, los países desarrollados cuentan con diferentes técnicas de tratamiento del agua potable (floculación, decantación, filtración...), de manera que ésta sea apta para el consumo humano. Pero estas técnicas no son suficientes para la eliminación de algunos patógenos que producen graves infecciones.

En el agua potable podemos encontrar diferentes tipos de patógenos, los cuales podemos clasificarlos en tres categorías: bacterias, virus y protozoos parásitos. Dentro de ésta última categoría, protozoos parásitos, se encuentran los *Cryptosporidium*. [1]

Según [2], “Los *Cryptosporidium* son pequeños parásitos que infectan el tracto digestivo y respiratorio de los vertebrados, y aunque se ha descrito muchas especies del género *Cryptosporidium*, parecen ser específicos para cada clase de vertebrados:

- *C. Parvum*, *C. Muris*, *C. Felis* y *C. Wrairi*, para mamíferos.
- *C. Caileyi* y *C. Meleagridis*, para aves.
- *C. Serpensis*, para reptiles.
- *C. Nasorum*, para peces.”

En el caso de los humanos, las infecciones son producidas por los *Cryptosporidium Parvum*. Su transmisión se produce por vía fecal-oral y la infección es obtenida mediante diversas vías:

- Agua contaminada.
- Contacto entre personas, sobre todo en lugares públicos.
- Contacto directo con heces de animales infectados.

- Contaminación por alimentos crudos, tales como la carne o la leche mal pasteurizada. [2]

La mayoría de infecciones provocadas por *Cryptos*, se deben a la contaminación del agua potable con dicho patógeno, lo cual conlleva un grave riesgo para la salud de los humanos. Esta enfermedad es llamada Criptosporidiosis. Dependiendo del estado de salud de cada persona puede provocar en ella diferentes tipos de infecciones.

Normalmente, en una persona cuyo estado sea saludable, una pequeña ingesta de estos patógenos le provocaría gastroenteritis. El periodo sintomático es más duradero que en otras infecciones bacterianas gastrointestinales. Los síntomas más habituales son diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómitos y incluso fiebre. El tiempo de recuperación en este tipo de personas es entre 2 y 3 semanas, aunque puede durar hasta 6 semanas.

En otros casos, pueden llegar a aparecer síntomas de debilidad física, dolores de cabeza y anorexia. Por ello, es particularmente peligrosa dicha infección en niños, personas mayores o personas adultas con el sistema inmunológico deprimido. El riesgo es especialmente alto en personas con VIH, pues no hay vacuna para curar la infección por *Cryptos* en este caso y podría provocar incluso la muerte. [2, 3, 4]

El estudio y tratamiento de dichos patógenos es muy importante, debido a que el riesgo de infección es muy elevado, pues sólo haría falta la ingesta de 10 de estos patógenos para que exista una posible infección. La probabilidad de infección está proporcionalmente relacionada con la cantidad ingerida, siendo 0.5 % la probabilidad de ser infectado al tomar un ooquiste<sup>1</sup>.

El tamaño de los *Cryptosporidium Parvum* es muy pequeño, del orden de micrómetros, por ello hay que tener controlada la concentración de dichos patógenos en el agua potable. [2, 4]

Los tratamientos usados en las plantas potabilizadoras para la eliminación de todo tipo de patógenos, siendo uno de los tratamientos más importantes la cloración, no afecta a los *Cryptosporidium Parvum*. Por ello, para limitar el riesgo de infección por dichos patógenos es importante llevar a cabo diariamente exhaustivos métodos de detección de éstos en el agua potable, dado que hoy en día no se conoce ninguna

---

<sup>1</sup>Ooquiste: Quiste que forma el cigoto de un esporozoo.

Esporozoo: Es una clase de protozoos parasitarios que tienen habitualmente un ciclo en que alterna una generación sexual con otra no sexual y que precisan más de un huésped para completar su ciclo.

técnica de eliminación de estos patógenos a gran escala que sea adecuada para una planta potabilizadora. [4]

## 1.2. Legislación sobre el control de *Cryptosporidium* en aguas potables

Referente a la normativa española, el Real Decreto 140/2003 recoge aspectos sobre la calidad que debe tener el agua para el consumo humano. La norma europea equivalente es la Directiva 98/83/CE. Según [5]:

“El Real Decreto 140/2003 tiene por objeto establecer los criterios sanitarios que deben cumplir las aguas de consumo humano y las instalaciones que permiten su suministro desde la captación hasta el grifo del consumidor y el control de éstas, garantizando su salubridad, calidad y limpieza, con el fin de proteger la salud de las personas de los efectos adversos derivados de cualquier tipo de contaminación de las aguas.”

El Artículo 5 de dicho decreto dice que,

“se considera el agua de consumo humano salubre y limpia cuando no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un riesgo para la salud humana”.

En el anexo I apartado A de dicha norma, viene adjunta una tabla con los parámetros microbiológicos (Tabla 1.1): [5]

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
1. <i>Escherichia coli</i>	0 UFC en 100 ml	
2. <i>Enterococo</i>	0 UFC en 100 ml	
3. <i>Clostridium perfringens</i> (incluidas las esporas)	0 UFC en 100 ml	1 y 2

Notas:

(1) Cuando la determinación sea positiva y exista una turbidez mayor de 5 UNF se determinarán, en la salida de ETAP o depósito, si la autoridad sanitaria lo considera oportuno, *Cryptosporidium* u otros microorganismos parásitos.

(2) Hasta el 1 de enero de 2004 se podrá determinar *Clostridium sulfito reductor* en vez de *Clostridium perfringens*. Las condiciones descritas en la nota 1 y el valor paramétrico serán los mismos para ambos.

**Tabla 1.1.:** Parámetros microbiológicos en las aguas potables según Real Decreto 140/2003.

La Directiva 2003/99/CE [6], sobre vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, incluye la criptosporidiosis y los agentes que la causan entre las zoonosis parasitarias, debiendo ser como objeto de vigilancia en función de la situación epidemiológica (*Anexo I, Lista B*).

Aunque en España, no es obligatorio controles diarios de la cantidad de *Cryptosporidium Parvum* en el agua potable, sí que lo es en otros países como es el caso de Reino Unido. Donde el cual, para que el agua muestreada se califique como apta para consumo humano, debe haber menos de 1 ooquiste por 10 litros de agua.

Por ello, es importante la detección de *C.Parvum*, dado que aunque la ley española no lo registre como tarea obligatoria, puede prever muchas infecciones importantes.

Y en el caso de otros países, no sólo por lo que se acaba de citar, sino porque además lo registra la ley de obligatorio cumplimiento.

### 1.3. Objetivos

Los principales objetivos de este proyecto son:

- Recopilación de las técnicas utilizadas para la detección de *Cryptosporidium*.
- Diseño de un separador de partículas según su tamaño, integrado en un Lab-on-a-Chip.
- Diseño de un separador de *Cryptosporidium* por IMS, integrado en un Lab-on-a-Chip.
- Diseño de un analizador de *Cryptosporidium*, integrado en un Lab-on-a-Chip.
- Diseño de las correspondientes máscaras fotolitográficas asociadas a los dos separadores y al analizador diseñado.

## **2. Estado del arte**

### **2.1. Introducción**

Debido a las consecuencias de la ingesta de este patógeno, es importante llevar a cabo métodos de detección, para evitar infecciones.

En este apartado, se han clasificado dos grandes grupos de detección; detección estándar, la cual es la que actualmente se lleva a cabo en muchas de las plantas potabilizadoras, y detección automática, la cuál se está desarrollando con la intención de poder sustituir a la estándar dado que ello ahorraría tiempo y sería menos compleja.

En la actualidad, ya hay algunos métodos de detección automática, que ahorra tiempo en algunos de los procesos aunque no en todos, ya que la automatización es de forma parcial. También hay investigaciones del uso de Lab-on-a-Chip en este campo, aunque aún no muy desarrollado. Este proyecto se centrará sobretodo en éste último, dado que supondría una automatización completa y a bajo coste.

### **2.2. Metodología de detección estándar de los *Cryptosporidium Parvum***

Existe una técnica de detección que consiste en la concentración de dichos patógenos en una pequeña cantidad de agua, para después con ella poder detectar y determinar un número aproximado de patógenos en el total de agua tratada. Así si la concentración de *C.Parvum* es elevada, ese agua no se podrá suministrar a los hogares. Si por el contrario, el agua tiene una concentración adecuada, el agua será apta para el consumo humano. Aunque este método no es un procedimiento universal, sí que es bastante utilizado mundialmente con unas cantidades parecidas de aguas a tratar.

[7]

Según [8], el método consistiría en coger una muestra de 1000 litros. Para que la muestra no sea en un tiempo exacto, sino que refleje bien la realidad y la posible varianza con el tiempo, se cogen muestras de forma continua con una duración de 24h y con un caudal de  $40\text{ l/h}$ . De dichas muestras se cogen muestras más pequeñas para ser examinadas en el laboratorio, y el resto del agua es filtrada in-situ.

Una vez en el laboratorio, las muestras se someten a un filtrado (las partículas se encuentran atrapadas en unos discos porosos, los cuales se someten a un lavado para la extracción de los microorganismos), más tarde a un tratamiento de IMS<sup>1</sup> de ooquistes atrapados en el filtro. La IMS, “emplea partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos para concentrar el antígeno”[9]. Por último, una vez concentrados, se utiliza para su detección la técnica de inmunofluorescencia, para así hacerlos más visibles y que facilite su cuenta con el microscopio.

Este proceso se encuentra legislado en el protocolo de EPA 1623.1 [8] para el tratado del agua (los valores de los litros de muestras pueden variar, pero lo que indica este protocolo son los tres pasos fundamentales que se han mencionado anteriormente, filtrado, IMS e inmunofluorescencia). Pero como se acaba de poner en manifiesto, éste no es un método universal, sino que en cada país sufre alguna variación, sobretodo en las cantidades de litros de las muestras que se toman para ser procesadas en el laboratorio.

Por ejemplo, en USA las muestras tomadas para ser examinadas en el laboratorio es de  $10\text{ l}$  sometiéndolas a un centrifugado y un tratamiento de IMS; mientras que, en el caso de Alemania, las muestras serían de  $20$  o  $2\text{ l}$  concentradas mediante centrifugación, reduciendo la muestra a examinar a  $0,2 - 2\text{ ml}$  que posteriormente es lavada dos veces con agua para después aplicarle IMS. Estos datos se encuentran recogidos en [7].

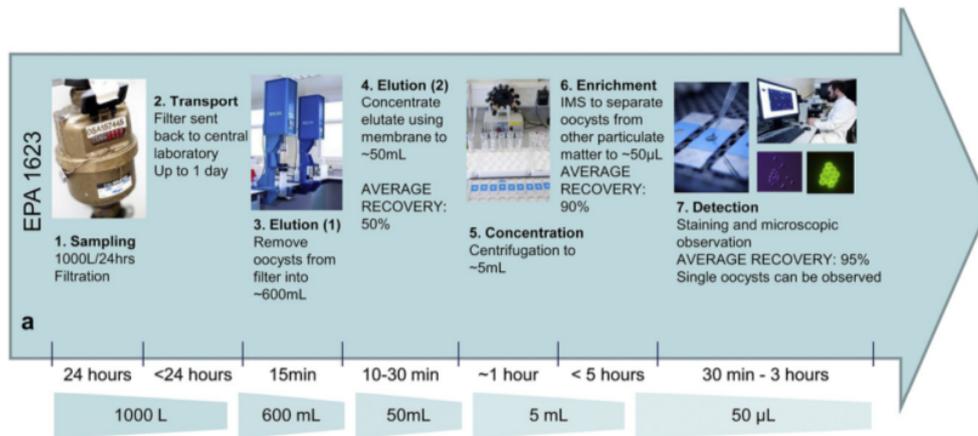
En la Figura 2.1, podemos observar el método usado en UK para el tratamiento de aguas potables, este método se basa en el protocolo de EPA 1623.1 [8] usando filtros IDEXX Filta-Max.

Donde el proceso descrito es:

1. Toma de muestras  $1000\text{ l}/24\text{ h}$ . Acto seguido se hace un filtrado.

---

<sup>1</sup>Separación Inmagnética: Técnica de separación celular en la que microesferas o cuentas magnetizables son primero revestidas con anticuerpo monoclonal, permitiéndole buscar y enlazar células dianas, y entonces eliminadas selectivamente cuando pasan a través de un campo magnético.



**Figura 2.1.:** Protocolo EPA para *Cryptosporidium* usando filtros IDEXX Filta-Max [4]

2. Dichos filtros son trasladados al laboratorio en un tiempo menor a 24h.
3. Se hace un proceso de elución<sup>2</sup>, para eliminar los patógenos del filtro y tener finalmente una muestra de aproximadamente 600 ml. Este paso dura unos 15 min.
4. Se vuelve a someter a dicha muestra a otro proceso de lavado, reduciendo así la muestra a 50 ml. El tiempo en realizar dicho lavado es de 10-30min y obtenemos una tasa de recuperación del 50 % de los patógenos.
5. A dicha muestra, se le somete a un proceso de centrifugación durante 1 h para conseguir concentrar la muestra a 5 ml.
6. Acto seguido, se le somete al tratamiento IMS, para separar los ooquistes del resto de partículas que hay en la muestra. Con este tratamiento conseguimos una tasa de recuperación del 90 % de los Cryptos. Tras este paso, el cual tarda algo menos de 5 h, los Cryptos se encuentran concentrados en una muestra de 50 microlitros.
7. El último paso es el uso de la inmunofluorescencia, donde los ooquistes de la muestra (50 µl) son teñidos para más tarde ser observados en un microscopio de fluorescencia y así poder contar el número de patógenos en dicha muestra de agua, pudiendo obtener una estimación de la concentración de éstos en el total de agua tratada. Este paso puede durar entre 30 min y 3 h, siendo la

<sup>2</sup>Elución: Lavado progresivo con un líquido apropiado

tasa de recuperación de éstos del 95 % (muy buena en comparación con la que obteníamos en el paso 4).

A este método estándar se le han hecho algunos cambios para mejorar la concentración y detección de los patógenos, como es el lavado megasónico (Megasonic-elution) [10]. Con este método conseguimos una considerable reducción de tiempo en el proceso y una mejor concentración de los patógenos. En la Figura 2.2 se muestra los pasos a realizar con este método y las principales diferencias con el método estándar:

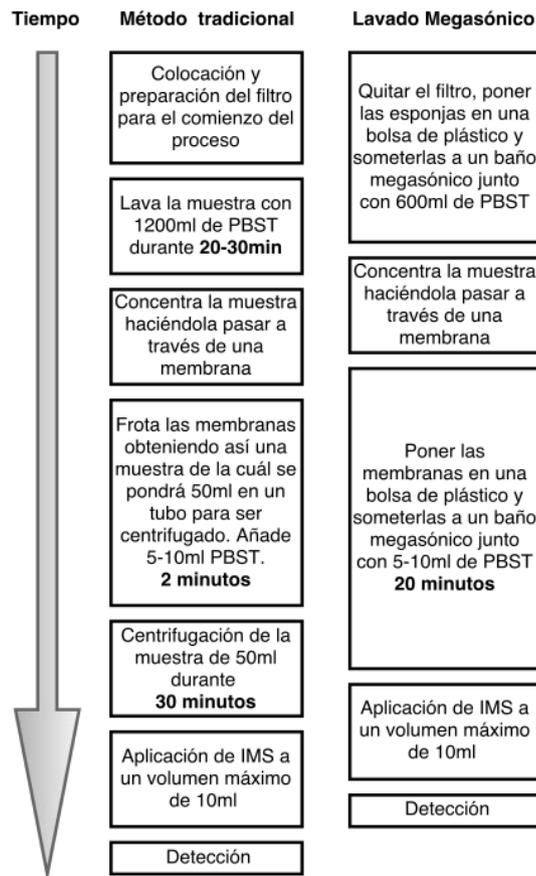


Figura 2.2.: Esquema que refleja el ahorro de tiempo con la utilización de megasonidos frente al método tradicional.[10]

### 2.3. Técnicas de detección no convencionales.

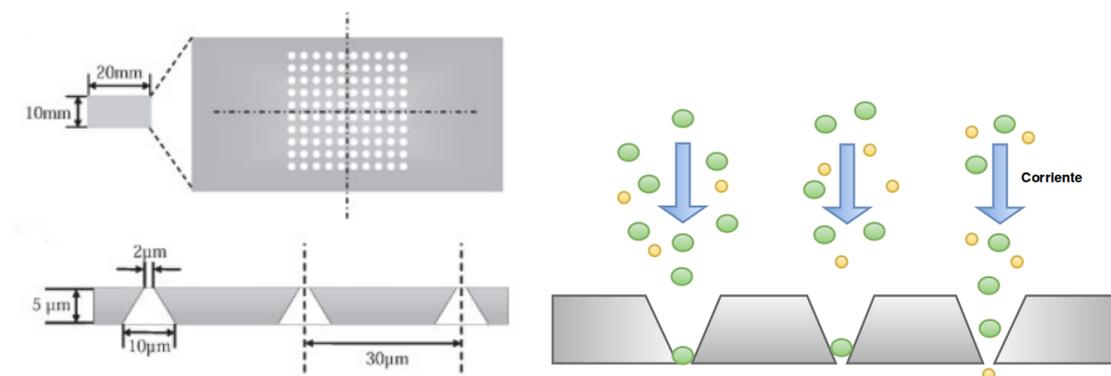
Hasta ahora, se han hecho numerosas investigaciones de cómo detectar los Cryptosporidium usando diversas técnicas, entre ellas dispositivos de detección integrados

en un Lab-on-a-Chip. Algunas de estas técnicas, se citan a continuación. [4]

### ▪ Técnicas de detección ópticas

- *Captura hidrodinámica combinada con detección por inmunofluorescencia*

La captura viene realizada mediante el uso de tamices o algún tipo de orificio de tamaño menor a la partícula, siendo normalmente el orificio de geometría cónica para mejorar la captura y permitir una posterior inyección de otro líquido. Un ejemplo, es el desarrollado en este proyecto para la detección por inmunofluorescencia de *Cryptosporidium* mediante el uso de una rejilla compuesta de agujeros cónicos. Dicho dispositivo, diseñado por [11] y que viene mostrado en la Figura 2.3.



**Figura 2.3.:** Método de captura hidrodinámica

- *Técnicas de microscopía holográfica*

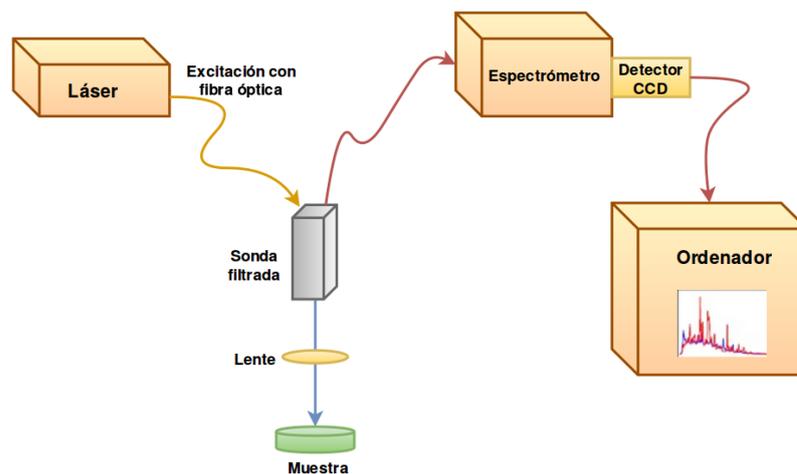
Este tipo de técnica se basan en el uso de una fuente de luz incoherente y su captación mediante un array de fotosensores CMOS para adquirir la imagen holográfica de las muestra. Este método de detección es capaz de detectar hasta un mínimo de 380 ooquistes por mililitro. Aunque se podría mejorar simplemente concentrando previamente la muestra por métodos de concentración tradicionales. Esta técnica permite analizar muestras de tamaño medio de unos  $60\mu L$ . Los mayores inconvenientes de dicha técnica es que no permite la especiación de los patógenos o analizar su viabilidad.

- *Técnicas de espectroscopia Raman*

Es una técnica basada en la dispersión de la luz. Se utiliza una luz monocromática incidente para excitar moléculas, que entran en un estado

vibracional, éstas a su vez emiten una radiación de una longitud de onda diferente, este proceso es conocido como “Dispersión de Raman”. Como las señales de Raman son relativamente débiles, la superficie donde las moléculas son desplazadas es generalmente recubierta con un metal noble, dando resultado a un incremento de la señal medida. Esta técnica se llama Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) o en español, Espectroscopía Raman. Ver Figura 2.4.

Esta técnica permite no sólo la detección y recuento de una pequeña muestra ( $\leq 10\mu l$ ) de los patógenos depositada en una superficie, sino la precisa especiación de la muestra. Actualmente se ha demostrado su utilidad a la hora de diferenciar entre *C.Parvum*, *C.Hominis* and *C.Meleagridis*. Sin embargo, esta técnica necesita fijar los patógenos a la superficie durante el tiempo de escaneo el cual puede ser bastante largo, de hasta media hora dependiendo del área de la muestra.



**Figura 2.4.:** Espectroscopia Raman

- *Sensor basado en fibra óptica*

Esta técnica se basa en utilizar la fibra óptica como medio de detección y transmitir señales ópticas. Para ello, se fijan anticuerpos selectivos al *C.Parvum* en la punta de un cable de fibra óptica, el cual se sumerge en la muestra. Tras el tiempo de incubación los patógenos quedan adheridos a la punta del cable y son excitados por una señal láser el cual se envía a través del cable. Este láser excita los ooquistes y los vuelve fluorescentes. La señal luminosa producida vuelve por el cable de fibra óptica hasta un

sensor donde se analiza la traza recibida. Al igual que la mayoría de las técnicas basadas en inmunofluorescencia, no permite la especiación de la muestra. Esta técnica tiene un fondo de escala de  $10^6$  ooquistes por *ml*.

### ■ Técnicas basadas en la detección de masa

“Un biosensor es un dispositivo analítico, que integra un elemento de reconocimiento biológico con un transductor físico para generar una señal medible proporcional a la concentración de los analitos<sup>3</sup>.”[4]

- *Detección con microbalanza de cristal de cuarzo*

“Dentro de los sistemas utilizados para construir biosensores podemos mencionar los que se basan en la piezoelectricidad, que componen los piezoinmunosensores. Para la anterior finalidad se utilizan cristales piezoelectricos dentro de los cuales es muy común encontrar cristales de cuarzo, gracias a su estabilidad en la frecuencia de resonancia, a los cambios de temperatura y algunas otras que no mencionaremos. Este género de sensores se caracterizan porque vibran a una frecuencia determinada y cuando sobre ellos se deposita alguna masa, la frecuencia de resonancia disminuye en proporción a la masa depositada sobre él. Al medir estos cambios de frecuencia se puede determinar una relación que revele la cantidad de masa depositada.”[13]

Esta técnica ha sido sobretodo usada para detección de proteínas, lisozima y BSA, secuencias de ADN de patógenos como *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) y *Escherichia coli* (*E. coli*), y detección de patógenos como *B. anthracis* y *C. parvum*. [4]

- *Detección basada en “Cantilevers”*

Este biosensor es comúnmente llamado Piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever (PEMC).

Los biosensores PEMC son sensores formados por dos capas, cada una de ellas con una función distinta. La capa piezoelectrica, generalmente hecha de titanato zirconato de plomo (PZT), actúa como actuador y sensor al mismo tiempo. Se hace pasar una corriente alterna por la capa PZT y este vibra según el modo de resonancia  $n$ -ésimo cuya frecuencia  $F_n$  se

---

<sup>3</sup>Analito: Es un componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra[12].

obtiene de acuerdo con la relación:

$$F_n = \kappa_n \sqrt{K/M_e}$$

donde  $\kappa_n$  corresponde a los valores propios de la ecuación característica de un 'cantilever' de sección rectangular,  $K$  constante efectiva del muelle que viene dada por el tipo de material y estructura del 'cantilever',  $M_e$  masa efectiva del 'cantilever'.

La otra capa, que se hace por lo general de sílice o vidrio, funciona con elementos de reconocimiento, los cuales son sustancias químicas que se unen a los microorganismos que se desean detectar llamados 'target'. Como en el sensor QCM, la masa unida a el 'cantilever' decrementa la frecuencia de resonancia, siendo detectado por el sensor.[4]

Éste tipo de sensores piezoeléctricos han sido usado para la detección de toxinas, proteínas similares a la inmuglobina G de conejos, biomarcadores y microorganismos patógenos tales como B. anthracis, E. coli y C. Parvum.[4]

#### ■ Resonancia por plasmones superficiales

Este sensor es llamado Surface Plasmon Resonance (SPR) o en español, Resonancia por Plasmones<sup>4</sup> Superficiales.

Dicho sensor mide los cambios del índice de refracción en la interfaz entre una superficie plana de metal y un material dieléctrico. Las uniones de analitos se detectan mediante el acoplamiento de los fotones desde una fuente de luz a la superficie de los plasmones, ésto permite medir un cambio de las propiedades de la luz reflejada. Estos detectores han sido diseñados para medir la intensidad, ángulo de incidencia, la longitud de onda o la fase de la luz reflejada. Dichos sensores, se han utilizado para detectar una variedad de analitos tales como antibióticos, vitaminas, hormonas, plaguicidas, así como bacterias y protozoos.[4]

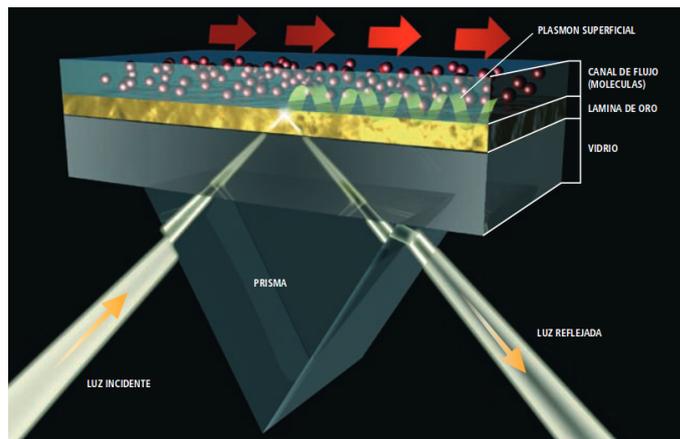
En la Figura 2.5 se muestra el funcionamiento de un sensor SPR, cuyo funcionamiento se explica a continuación:

“Se hace que una lámina metálica de oro (con un espesor de unas decenas de nanómetros) crezca sobre un sustrato de vidrio. Por la superficie del metal ex-

---

<sup>4</sup>Plasmón: En física, es un cuanto de oscilación del plasma.[14]

puesta al aire se hace circular un fluido compuesto por moléculas, en principio desconocidas. Se manda luz, que pasa por un prisma e incide sobre la superficie del metal, que se halla en contacto con el vidrio. Este haz de luz genera un plasmón superficial, que corre por la superficie de arriba (dentro de ciertas condiciones de ángulo y longitud de onda). Las propiedades de este plasmón superficial vienen determinadas por el tipo de moléculas adsorbidas por el metal en la superficie. Analizando la razón de dependencia de la intensidad de la luz reflejada respecto del ángulo de incidencia y de la longitud de onda utilizada, podemos determinar qué tipo de moléculas fluye por el canal.”[15]



**Figura 2.5.:** Esquema simplificado del funcionamiento de un dispositivo de resonancia de plasmones superficiales[15]

### ■ Sistemas de diagnóstico molecular y análisis de existencia total

Las técnicas de detección molecular incluyen preamplificación del material genético del parásito, contenido dentro de los esporozoitos en el interior de los ooquistes, seguido por la detección, ya sea a través de fluorescencia o por medios electroquímicos. Estas técnicas de detección, debido a que todas están asociadas con una etapa de amplificación de ácidos nucleicos, no serán tratadas por separados. La extracción del ácido nucleico a partir de esporozoitos es muy difícil debido a que la pared de los ooquistes es robusta.

El desarrollo de un método fiable y rápido es requerido para obtener el material genómico de un sólo ooquiste. El método más ampliamente utilizado para la amplificación de material genómico, es “la reacción en cadena de polimerasa” (PCR). Esta técnica muestra la especiación, pero no da ninguna indicación sobre la viabilidad de los parásitos. La cuantificación del mRNA puede revelar

la expresión del nivel de genes. Como todas las especies de ooquistes de *Cryptosporidium* responden a un choque de calor produciendo la proteína Hsp70, el gen que codifica ARNm para Hsp70, por tanto, puede ser usado por los científicos como un marcador de viabilidad. A pesar de ello, este método no es usado por las empresas en el estudio de la detección de *Cryptosporidium* en el agua por estar poco estudiado hasta la fecha.

Una de las técnicas para amplificar ARNm es la Nucleic-Acid-Sequence-Based Amplification (NASBA) o Amplificación Basada en Secuencia de Ácido Nucleico, una técnica de amplificación isotérmica que depende de la acción de tres enzimas diferentes para amplificar segmentos de ARNm específicas. Aunque tiene un factor de amplificación más grande y menos necesidad de potencia eléctrica que la PCR, el NASBA está limitado por el tiempo de acción de las enzimas, en lugar de las dimensiones de los vasos de reacción como ocurría en la PCR. Además, los reactivos de ensayo NASBA son 50-130 % más caros que los reactivos de RT-PCR. [4]

#### ■ Métodos eléctricos

Los métodos eléctricos están basados en el uso de técnicas de medición eléctricas para detectar y cuantificar la presencia de *Cryptosporidium* en una muestra. Mientras la técnica de bioimpedancia se basa en la medición de la impedancia biológica del material (sólido o líquido), la dielectroforesis se basa en la concentración selectiva y la posterior detección de la totalidad de parásitos en la muestra de agua.

- *Método de bioimpedancia*

Es una técnica que permite detectar y cuantificar analitos en líquidos. El pequeño tamaño de estos sensores es lo que le hace importante, lo cual hace posible su integración en sistemas más grandes. Además de esto, también es atractivo debido a su funcionamiento, dado que a menudo permite una detección con alto rendimiento.[4]

- *Dielectroforesis*

“La dielectroforesis es un proceso de transporte de partículas, gracias a la cual es posible lograr la manipulación de partículas mediante el empleo de campos eléctricos no uniformes. Cuando una partícula (neutra o cargada eléctricamente) está suspendida en un líquido y se aplica un

campo eléctrico no uniforme experimenta un desequilibrio en sus fuerzas electrostáticas internas; se genera una fuerza neta que producirá su movimiento. La dielectroforesis puede presentarse en dos tipos: será positiva cuando la partícula se polarice en mayor medida que el líquido de suspensión, siendo atraída a las regiones de mayor intensidad de campo eléctrico; en caso contrario, será negativa y la partícula será repelida.”[16]



## 3. Conceptos previos

### 3.1. Conceptos básicos de microfluídica

En este apartado se expone que es la microfluídica, conceptos más importantes de microfluídica y orden de magnitud de las fuerzas más importantes en dicho sector.

#### 3.1.1. Conceptos importantes de teoría de fluidos

- **Hidrostática:**

Una de las propiedades más importantes de los fluidos es la densidad, la cual depende de la temperatura, y la denotaremos como:

$$\rho = \frac{\text{masa}}{\text{volumen}} = \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$$

Existen dos principios muy importantes en la teoría de fluidos, uno es el principio de Pascal y otro el de Arquímedes.

El *principio de Pascal* dice, la presión ejercida sobre un fluido poco compresible y en equilibrio dentro de un recipiente de paredes indeformables se transmite con igual intensidad en todas las direcciones y en todos los puntos del fluido.[17]

Partiendo de que los líquidos son incompresibles y que en este caso la densidad es prácticamente constante, obtenemos la siguiente ecuación que refleja la ley de Pascal:

$$p = p_0 + \rho gh$$

donde,  $\rho$  es la densidad del fluido,  $g$  la aceleración de la gravedad,  $p_0$  presión sobre la superficie libre del fluido,  $p$  presión total en la profundidad  $h$ .

“Si se aumenta la presión sobre la superficie libre, la presión total en el fondo ha de aumentar en la misma medida, ya que el término  $\rho gh$  no varía al no hacerlo la presión total (si el fluido fuera compresible, la densidad del fluido respondería a los cambios de presión y el principio de Pascal no podría cumplirse)”[18]

Dicha ecuación se llama *ecuación fundamental de la hidrostática*, pudiéndose poner de manera general de la siguiente forma:

$$P(z) + \rho gz = P(H) + \rho gH \rightarrow$$

$$\rightarrow \frac{dP}{dz} = -\rho g$$

donde,  $z$  y  $H$  son dos alturas cualesquiera en el fluido.

En el caso de los gases, sí son compresibles, y por lo tanto esta relación no se cumple. Teniendo que tener en cuenta el módulo de compresibilidad  $B$ , definido como el cociente entre el cambio de presión y la disminución relativa al volumen:

$$B = -\frac{\Delta P}{(\Delta V/V)}$$

donde,  $B$  dependerá del tipo de material.

Por otro lado, tenemos el *principio de Arquímedes*, el cuál dice que un cuerpo total o parcialmente sumergido en un fluido en reposo, recibe un empuje de abajo hacia arriba igual al peso del volumen del fluido que desaloja.

Esta fuerza recibe el nombre de *empuje hidrostático*, midiéndose en Newtons  $N$ . Dicho principio es formulado de la siguiente forma:

$$E = -mg = -\rho_f gV$$

donde,  $E$  es el empuje,  $\rho_f$  densidad del fluido,  $V$  volumen de fluido desplazado,  $g$  la aceleración de la gravedad,  $m$  masa del cuerpo sumergido.

#### ■ Tensión superficial

La tensión superficial es la cantidad de energía necesaria para aumentar la superficie de un líquido por unidad de área.

$$\gamma = \frac{W}{A}$$

donde,  $W$  es el trabajo necesario a realizar,  $A$  área y  $\gamma$  tensión superficial medida en  $N/m$

Debido a la existencia de tensión superficial, la presión dentro y fuera de una gota de líquido, no son la misma. Dicha diferencia viene determinada por la *ley de Laplace*. “La cuál relaciona el cambio de presiones en la superficie que separa dos fluidos de distinta naturaleza con las fuerzas de línea debidas a efectos moleculares.”[19]

$$\Delta P = \sigma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

donde,  $\Delta P$  es el salto de presión entre superficies (siempre mayor en el lado cóncavo),  $\sigma$  tensión superficial y ambas  $R$  son dos radios de curvatura perpendiculares.

Para el caso de esferas (gotas, bombas...), tenemos que la ecuación queda:

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R}$$

puesto que  $R_1 = R_2$ .

Por otro lado, para el caso de cilindros (probetas, tuberías...), tenemos que:

$$\Delta P = \frac{\sigma}{R}$$

puesto que  $R_2 = \infty$ .

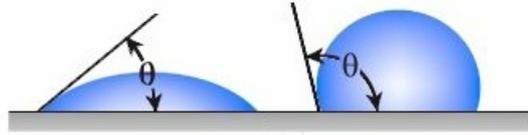
La tensión superficial junto con las fuerzas que se dan debido al contacto entre líquidos y superficies sólidas, dan lugar a la capilaridad.

“La capilaridad es debido a que los líquidos presentan las propiedades de cohesión y adhesión. La cohesión permite al líquido resistir esfuerzos de tracción, mientras que la adhesión permite que se adhiera a otros cuerpos.

Si las moléculas líquidas tienen mayor adhesión que cohesión, entonces el líquido se pega a las paredes del recipiente con el cual está en contacto, resultando en un aumento de la capilaridad de la superficie del líquido; un predominio de la cohesión causa por el contrario una depresión de la capilaridad. “[20]

Debido a la adhesión y cohesión, podemos definir el concepto de *ángulo de contacto*  $\theta_c$ . Siendo éste, el que forma la superficie del sólido y la tangente de

la interfase líquido-gas en el punto de contacto de las tres fases. Si  $\theta_c < 90^\circ$ , el líquido moja al sólido. Si por el contrario,  $\theta_c > 90^\circ$ , el líquido no moja al sólido. Ver Figura 3.1.



**Figura 3.1.:** Ángulo de contacto

### ■ Hidrodinámica[20]

Para el estudio del movimiento de fluidos, suponemos fluidos incompresibles y con la geometría del conjunto conocida. Teniendo como variables, la presión y la velocidad del fluido.

Para definir el movimiento del fluido, necesitamos hacer uso de dos ecuaciones:

- Ecuación de conservación de la masa (Ecuación de continuidad)
- Ecuación de conservación de la cantidad de energía (Ecuación de Bernouilli)

La ecuación de continuidad expresa que, el caudal que entra en el conducto es igual al caudal que sale de éste.

$$Q_{entra} = Q_{sale} = Q$$

$$Q = \frac{dV}{dt} = A_1 v_1 = A_2 v_2$$

Siendo  $A_1, A_2$  el área de entrada y salida del conducto respectivamente y  $v_1, v_2$  la velocidad de entrada y salida del fluido.

Debido a que el caudal es el mismo a la entrada y la salida, si  $A$  aumenta,  $v$  tiene que disminuir.

Por otro lado tenemos la ecuación de Bernouilli, la cuál sólo es aplicable para fluidos perfectos, es decir, fluidos sin viscosidad.

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho \vec{v} \vec{\nabla} \vec{v} = -\vec{\nabla} P$$

Esta ecuación no tiene en cuenta la pérdida de presión debido a las fuerzas de resistencia viscosa. El hecho de que un fluido disminuya su presión cuando aumenta su velocidad, es llamado como *efecto Venturi*.

#### ■ **Viscosidad. Turbulencia**

Los fluidos newtonianos son aquellos que tienen una viscosidad constante a lo largo del tiempo, siendo dicha fuerza viscosa (fricción interna del fluido):

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv_x}{dy}$$

donde  $\eta$  es el coeficiente de viscosidad, el cuál depende del fluido.

Por otro lado, existen los fluidos newtonianos, los cuales su viscosidad es dependiente del gradiente de velocidad.

Con respecto al flujo de los fluidos, podemos clasificarlos en dos tipos: flujo en régimen laminar o en régimen turbulento.

“Se llama *flujo laminar* o corriente laminar, al movimiento de un fluido cuando éste es ordenado, estratificado, suave. En un flujo laminar el fluido se mueve en láminas paralelas sin entremezclarse y cada partícula de fluido sigue una trayectoria suave, llamada línea de corriente.”[21]

“Se llama flujo turbulento o corriente turbulenta al movimiento de un fluido que se da en forma caótica, en que las partículas se mueven desordenadamente y las trayectorias de las partículas se encuentran formando pequeños remolinos periódicos (no coordinados).”[22]

Ambos flujos son caracterizados mediante un número adimensional llamado *número de Reynolds*( $Re$ ).

$$Re = \frac{\rho v_s D}{\mu}$$

siendo  $\rho$  la densidad del fluido,  $\mu$  viscosidad dinámica del fluido,  $v_s$  velocidad característica del fluido y  $D$  longitud característica del conducto.

#### ■ **Ecuaciones de Navier-Stokes**

“Se trata de un conjunto de ecuaciones en derivadas parciales no lineales que describen el movimiento de un fluido. Estas ecuaciones se obtienen aplicando

los principios de conservación de la mecánica y la termodinámica a un volumen fluido. Haciendo esto se obtiene la llamada formulación integral de las ecuaciones. No se dispone de una solución general para este conjunto de ecuaciones, y salvo ciertos tipos de flujo y situaciones muy concretas no es posible hallar una solución analítica; por lo que en muchas ocasiones es preciso recurrir al análisis numérico para determinar una solución aproximada”[23]

Para poder definir las ecuaciones de Navier-Stokes, hace falta definir primero la definición de *derivada sustancial*, la cual permite calcular la variación de una magnitud del fluido ligada a una partícula del fluido:

$$\frac{D}{Dt} (*) = \frac{\partial (*)}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla (*)$$

donde  $\mathbf{v}$  es la velocidad del fluido, definida  $\mathbf{v} = v_x(x, y, z, t)\hat{\mathbf{i}} + v_y(x, y, z, t)\hat{\mathbf{j}} + v_z(x, y, z, t)\hat{\mathbf{k}}$ .

Por otra parte, la variación de una magnitud fluida extensiva ligada a un volumen fluido, viene definida por el *teorema del transporte de Reynolds*, definido de forma general:[23]

$$\frac{d}{dt} \int_{V_f(t)} \phi d\Omega = \frac{d}{dt} \int_{V_c(t)} \phi d\Omega + \int_{S_c(t)} \phi (\mathbf{v} - \mathbf{v}_c) \cdot \mathbf{n} d\sigma$$

donde  $\phi$  es la magnitud fluida extensiva definida por unidad de volumen,  $V_f$  es un volumen fluido,  $V_c$  es un volumen de control que coincide con  $V_f$  en el instante  $t$ ,  $S_c$  la superficie de dicho volumen de control,  $\mathbf{v}$  la velocidad del fluido y  $\mathbf{v}_c$  la velocidad de la superficie de control.

“El teorema del transporte de Reynolds viene a decir que la variación de una propiedad extensiva en un volumen fluido, es igual a la variación de dicha propiedad en el interior de ese volumen más la cantidad de dicha propiedad que atraviesa la superficie del volumen.”[23]

A la ecuación anterior, le aplicamos el *teorema de la divergencia*, el cual bajo ciertas hipótesis, podemos transformar integrales de superficie en integrales de volúmenes. Para ello, recordamos la definición de divergencia ( $div(*)$ ) y rotacional ( $rot(*)$ ) (poniendo como parámetro  $* = F$  para mayor claridad):

$$div(\vec{F}) = \frac{\partial F_1}{\partial x_1} + \frac{\partial F_2}{\partial x_2} + \frac{\partial F_3}{\partial x_3} = \nabla \cdot \vec{F}$$

$$rot(\vec{F}) = \frac{\partial F_3}{\partial x_2} - \frac{\partial F_2}{\partial x_3}, \frac{\partial F_1}{\partial x_3} - \frac{\partial F_3}{\partial x_1}, \frac{\partial F_2}{\partial x_1} - \frac{\partial F_1}{\partial x_2} = \nabla \times \vec{F}$$

Para el caso de fluidos incompresibles,  $\nabla \cdot \vec{u} = 0$ . Siendo  $\vec{u}$  el vector velocidad del fluido.

Aplicando el *teorema de la divergencia* a la ecuación obtenida por el teorema de transporte de Reynolds, obtenemos:

$$\iiint_V (\nabla \cdot \vec{F}) dV = \iint_{\partial V} \vec{F} \cdot \vec{n} dS$$

Aplicando conservación de la masa, incompresibilidad y conservación del momento, obtenemos las *ecuaciones de Navier-Stokes*:

- Incompresibilidad:  $\nabla \cdot \vec{u} = 0$
- Conservación de la masa:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial \rho u_i}{\partial x_i} = 0 \rightarrow$$

$$\rightarrow \rho_t + \vec{u} \cdot \nabla \rho = 0$$

siendo  $\rho$  la densidad y  $u_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) las componentes cartesianas de la velocidad.

- Conservación del momento:

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \vec{u} \cdot \nabla_x \vec{u} \right) = F_{internas} + F_{externas} \rightarrow$$

$$\rightarrow \rho \left( \frac{\partial u_i}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla u_i \right) = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \nu \Delta u_i + f_{ext}^i$$

donde  $\nu = cte \geq 0$  es la viscosidad y  $f_{ext}$  es la fuerza externa con  $i = 1, 2, 3$ .

Dependiendo del tipo de fluido y flujo que tengamos, podemos hacer algunas simplificaciones en las ecuaciones anteriores:

- Fluido incompresible:  $\nabla \cdot \vec{u} = 0$
- Fluido perfecto:  $\nu = 0$
- Fluido viscoso:  $\nu \neq 0$
- Fluido homogéneo:  $\rho = 1$

- Fluido ideal:  $\nabla \cdot \vec{u} = 0; \nu = 0; \rho = 1$

Por último, se explica el concepto de vorticidad. La *vorticidad* es un término que sirve para cuantificar la rotación local de un fluido, y viene definida:

$$\vec{\omega}(x, t) = \nabla \times \vec{u}(x, t) = \left( \frac{\partial u_3}{\partial x_2} - \frac{\partial u_2}{\partial x_3}, \frac{\partial u_1}{\partial x_3} - \frac{\partial u_3}{\partial x_1}, \frac{\partial u_2}{\partial x_1} - \frac{\partial u_1}{\partial x_2} \right)$$

siendo  $\vec{\omega}$  la vorticidad y  $\vec{u}$  la velocidad del fluido.

#### ■ Movimiento de los sólidos en un fluido. Ley de Stokes[20]

Cuando un sólido se mueve en un fluido, se producen fuerzas entre el fluido y el sólido que dependen de la velocidad.

A continuación, se muestran dos casos, el movimiento de una esfera en un fluido ( $Re \ll 1$ ) y el movimiento de un objeto en un fluido con  $Re \gg 1$ .

- *Esfera en un fluido:*

La *ley de Stokes* muestra la fricción que experimenta una esfera cuando se mueve en el seno de un fluido viscoso a un  $Re \ll 1$  (flujo laminar).

Dicha fuerza es:

$$F_{stokes} = 6\pi R\eta v$$

donde  $v$  es la velocidad del fluido,  $R$  es el radio de la esfera,  $\eta$  es la viscosidad del fluido,  $6\pi$  es un factor válido sólo para el caso de tener una esfera como sólido.

Además de dicha fuerza, la esfera estará sometida a la fuerza peso  $F_{peso}$  y a la fuerza de Arquímedes  $F_{arquímedes}$ , siendo éstas:

$$F_{arquímedes} = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho g$$

$$F_{peso} = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho_0 g$$

siendo  $\rho$  la densidad del fluido y  $\rho_0$  la densidad del objeto.

Si la esfera se encuentra cayendo verticalmente en un fluido viscoso debido a su propio peso, su velocidad de sedimentación o de caída puede ser

calculada de la siguiente forma:

$$F_{\text{peso}} = F_{\text{stokes}} + F_{\text{arquímedes}}$$

$$6\pi\eta rv = \frac{4}{3}\pi r^3 (\rho_0 - \rho) g \rightarrow$$

$$\rightarrow v_{\text{sedimentación}} = \frac{2}{9} \frac{r^2}{\eta} (\rho_0 - \rho) g$$

Si dicha esfera se encuentra sometida a un proceso de centrifugación, aparecerá una aceleración centrífuga dando lugar a una velocidad de sedimentación de la siguiente forma:

$$v_{\text{sedimentación}} = \frac{2}{9} \frac{r^2}{\eta} (\rho_0 - \rho) \omega^2 R$$

donde el valor de  $\omega^2 R$  puede ser mucho mayor que el de  $g$ .

- *Objeto en un fluido con  $Re \gg 1$*

A medida que aumenta el Reynolds, aparecen vórtices y gran turbulencia en la zona posterior del objeto. Así, con una velocidad elevada, se tendrá una presión baja. Teniendo que,

$$\Delta P \approx \frac{1}{2} \rho v^2$$

La fuerza generada debido a este fenómeno es,

$$F = \frac{1}{2} \rho v^2 C_x A_x$$

donde  $A_x$  es la proyección de área frontal, y  $C_x$  el coeficiente adimensional de resistencia aerodinámica, el cual depende de la forma del objeto.

Cuanto menor sea dicho coeficiente, menor será la fuerza de resistencia.

Una mayor complejidad la obtenemos en el caso de que el objeto sea asimétrico, dado que entonces aparecerá una fuerza perpendicular a la velocidad llamada *fuerza de sustentación*.

El ejemplo más claro de ello es el ala de un avión, la cual es una superficie curvada. Suponemos que  $v_1$  es el flujo de aire que pasa por la zona de arriba del ala, y  $v_2$  la velocidad del flujo del aire que pasa por la parte

de abajo del ala. La superficie de arriba del ala designada como 1, será mayor que la de abajo del ala 2, aunque el tiempo que tarda en recorrer un espacio dado es el mismo. Con todo ello tenemos que,[20]

$$v_1 > v_2 \Rightarrow P_1 < P_2 \Rightarrow \Delta P \approx \frac{1}{2}\rho(v_1^2 - v_2^2)$$

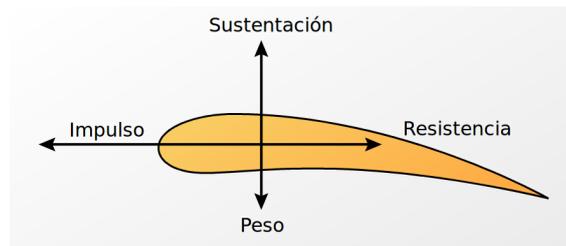
$$\Delta P \cdot A = F$$

Con ello tenemos que, la fuerza de resistencia y la de sustentación pueden ser definidas de la siguiente forma,

$$F_{resistencia} = \frac{1}{2}\rho v^2 C_x A_x$$

$$F_{sustentación} = \frac{1}{2}\rho v^2 C_y A_y$$

donde  $C_x$  y  $C_y$  son los coeficientes de resistencia y sustentación respectivamente que dependen de la forma del objeto. Y,  $A_x, A_y$  el área de la proyección vertical y horizontal del objeto. Ver Figura 3.2.



**Figura 3.2.:** Fuerzas que actúan sobre un perfil aerodinámico[24]

### 3.1.2. Números adimensionales

“Número adimensional es un número que no tiene unidades físicas que lo definan y por lo tanto es un número puro. Los números adimensionales se definen como productos o cocientes de cantidades que sí tienen unidades de tal forma que todas éstas se simplifican.”[25]

En este apartado se recogen los números adimensionales más importantes desde el punto de vista de la teoría de fluidos:

- *Número de Bond*

“Es aplicado en el caso de aparición de una fuerza capilar debido a la flotación. Puede ser usado para caracterizar la forma de una esfera de fluido. El número de Bond es proporcional al cociente entre las fuerzas de flotación y las fuerzas debidas a la tensión superficial.”[26]

$$Bo = \frac{\Delta\rho a L^2}{\gamma}$$

donde  $Bo$  es el número de Bond,  $\Delta\rho$  es la diferencia de densidades entre las dos fases,  $a$  es la aceleración asociada con fuerzas másicas,  $L$  es la longitud característica (el radio de la gota de fluido o el diámetro del capilar),  $\gamma$  es la tensión superficial del fluido.

- *Número de Dean*

“El Número de Dean ( $De$ ) es un número adimensional utilizado en mecánica de fluidos para el estudio de flujos en tuberías y canales curvados.”[27]

$$D = \frac{\rho u a}{\mu} \left( \frac{a}{2R} \right)^{1/2}$$

donde  $\rho$  es la densidad del fluido,  $\mu$  es la viscosidad del fluido,  $u$  es la velocidad axial,  $a$  es la longitud característica asociada con la sección transversal del canal o tubería,  $R$  es el radio de curvatura del canal o tubería.

- *Número de Grashof*

“El Número de Grashof ( $Gr$ ) es un número adimensional en mecánica de fluidos que es proporcional al cociente entre las fuerzas de flotación y las fuerzas viscosas que actúan en un fluido.”[28]

$$Gr = \frac{g\beta(T_s - T_\infty)L^3}{\nu^2}$$

donde  $g$  es la aceleración de la gravedad,  $\beta$  es el coeficiente de expansión volumétrica,  $T_s$  es la temperatura de una superficie,  $T_\infty$  es la temperatura ambiente,  $L$  es una longitud característica,  $\nu$  es la viscosidad cinemática.

- *Número de Nusselt*

“El Número de Nusselt ( $Nu$ ) es un número adimensional que mide el aumento de la transmisión de calor desde una superficie por la que un fluido discurre (transferencia de calor por convección) comparada con la transferencia de calor

si ésta ocurriera solamente por conducción.”[29]

$$Nu_L = \frac{hL}{\kappa_f}$$

donde  $L$  una longitud característica (para formas complejas se define como el volumen del cuerpo dividido entre su área superficial),  $\kappa_f$  es la conductividad térmica del fluido,  $h$  es el coeficiente de transferencia de calor.

El numerador expresa la transferencia de calor por convección, mientras que el denominador refleja la transferencia de calor por conducción.

“Existen muchas correlaciones empíricas expresadas en términos del número de Nusselt que evalúan generalmente el número de Nusselt medio en una superficie. Estas correlaciones tienen la forma de  $Nu = f(Re, Pr)$ .”[29]

- *Número de Reynolds*

“El número de Reynolds ( $Re$ ) es un número adimensional utilizado en mecánica de fluidos, diseño de reactores y fenómenos de transporte para caracterizar el movimiento de un fluido. El número de Reynolds relaciona la densidad, viscosidad, velocidad y dimensión típica de un flujo en una expresión adimensional, que interviene en numerosos problemas de dinámica de fluidos.”[30]

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu}$$

donde  $\rho$  es la densidad del fluido,  $v$  velocidad característica del fluido,  $D$  longitud característica del sistema (por ejemplo, en el caso de una tubería, el diámetro de la tubería a través de la cual circula el fluido),  $\mu$  viscosidad dinámica del fluido.

Utilizando  $\nu = \frac{\rho}{\mu}$  el cambio obtenemos otra expresión común del Reynolds:

$$Re = \frac{vD}{\nu}$$

donde  $\nu$  es la viscosidad cinemática del fluido.

“Dicho número o combinación adimensional aparece en muchos casos relacionado con el hecho de que el flujo pueda considerarse laminar o turbulento.”[30]

Si  $Re \gg 1 \Rightarrow F \propto v^2$  por lo que domina la turbulencia.

Si  $Re \ll 1 \Rightarrow F \propto v$  por lo que domina la viscosidad.

- *Número de Prandtl*

“El Número de Prandtl ( $Pr$ ) es un número adimensional proporcional al cociente entre la difusividad de momento (viscosidad) y la difusividad térmica.”[31]

$$Pr = \frac{\nu}{\alpha} = \frac{C_p \mu}{\kappa}$$

donde  $\nu$  es la viscosidad cinemática,  $\alpha$  es la difusividad térmica,  $C_p$  es la capacidad calorífica a presión constante,  $\mu$  es la viscosidad,  $\kappa$  es la conductividad térmica.

- *Número de Rayleigh*

“En mecánica de fluidos, el Número de Rayleigh ( $Ra$ ) de un fluido es un número adimensional asociado con la transferencia de calor en el interior del fluido. Cuando el número de Rayleigh está por debajo de un cierto valor crítico, la transferencia de calor se produce principalmente por conducción; cuando está por encima del valor crítico, la transferencia de calor se produce principalmente por convección.”[32]

$$Ra = Gr \cdot Pr = \frac{C_p g \beta \rho^2}{\mu \kappa} (T_p - T_\infty) L^3$$

El número de Rayleigh se define como el producto del Grashof por el Prandtl.

#### 3.1.3. Concepto de microfluídica y leyes de escala

“La microfluídica es una actividad de reciente aparición, categorizándose como la ciencia y la tecnología de sistemas que emplean y controlan pequeños volúmenes (líquidos o gases), basándose en la multidisciplinaria complejidad tanto de los principios físicos como de los dispositivos empleados”. [33]

Las leyes de escala se obtienen a partir de relaciones geométricas, obteniendo así la siguiente relación:

$$w = \frac{\text{superficie}}{\text{volumen}} \sim \frac{l^2}{l^3} = \frac{1}{l}$$

De esta ecuación podemos sacar que cuando  $l \rightarrow 0$ ,  $w \rightarrow \infty$ , lo que implica que las

fuerzas relacionadas con la superficie, es decir, los flujos y las características de los procesos se vuelven dominantes en micro y nanofluidos. En la Figura 3.3 se muestra las leyes de escala para algunas variables, y su correspondiente valor. Las propiedades de los materiales y la mayoría de los coeficientes no dependen del tiempo, por lo que se escala de forma  $l^0 = 1$ .

Cantidad y correlación	Resultado
Longitud del sistema: $L \sim l$	$l$
Área superficial: $S$ o $A \sim l^2$	$l^2$
Volumen: $V \sim l^3$	$l^3$
Flujo de calor $\vec{q}(\text{macro}) = -K\nabla T \sim \frac{1}{l}$ , siendo $K$ cnte	$l^{-1}$
Flujo de calor $\vec{q}(\text{micro}) = -K\nabla T \sim \frac{l^1}{l} = l^0$	$1$

**Figura 3.3.:** Leyes de escala de algunas variables para microfluídica [33]

Dichas leyes de escala son muy importantes para definir las variables y fuerzas dominantes a escala microscópica, y por tanto, poder saber el comportamiento del fluido.

Con respecto a la escala macroscópica, aunque la física clásica sigue siendo válida en escala microscópica, el comportamiento de los sistemas microscópicos cambia y con ello la dominancia de las distintas fuerzas. Así es que, la fuerza de inercia y la gravedad disminuyen con respecto a las que aparecen en el caso macroscópico. Por el contrario, en la escala microscópica, la tensión superficial, la viscosidad y las fuerzas electrostáticas aumentarán. Ver Figura 3.4.



**Figura 3.4.:** Variación de las fuerzas en escala microscópica respecto a la macroscópica

## 3.2. Concepto de inmunofluorescencia e inmunomagnetismo

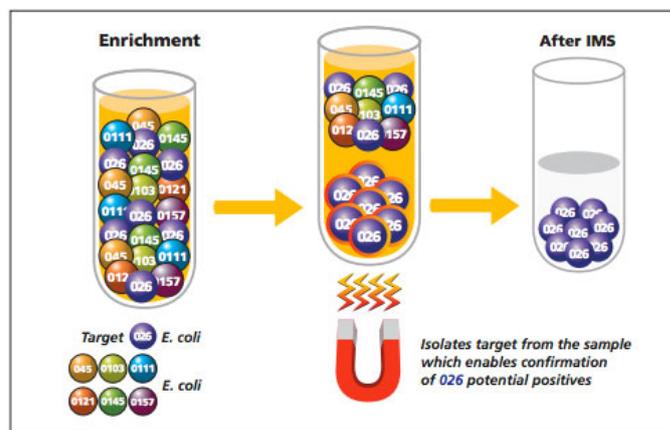
### 3.2.1. Inmunomagnetismo (IMS)

El inmunomagnetismo es una técnica muy usada como método de separación de diferentes tipos de partículas, facilitando así su posterior detección y recuento, y por consiguiente una reducción del tiempo empleado para ello. La técnica es ampliamente utilizada para mejorar las tasas de aislamiento y crear muestras concentradas para mejorar el rendimiento de otros procesos.

Una explicación breve de en qué consiste el inmunomagnetismo nos la da [34].

“Los métodos de separación inmunomagnética, están basados en la adhesión de pequeñas partículas magnetizadas a las células a través de anticuerpos o lectinas<sup>1</sup>. Cuando el conjunto de células mezcladas es sometido a un campo magnético, aquellas células que tienen adheridas a ellas partículas magnéticas se verán atraídas por el imán y por consiguiente, separadas del resto de células que no tienen adheridas a ellas partículas magnéticas”.

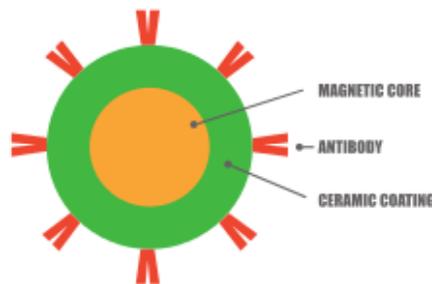
Para una mejor comprensión, ver Figura 3.5.



**Figura 3.5.:** Representación gráfica de la separación inmunomagnética [36]

<sup>1</sup>lectinas: son una gama de proteínas de origen vegetal y animal capaces de unirse en forma más o menos específica a moléculas de azúcares, formando uniones muy similares a las de las enzimas con sus sustratos y los anticuerpos por sus respectivos antígenos [35]

Las partículas magnéticas microscópicas están recubiertas con anticuerpos específicos. Estas bolas son fabricadas con diferentes tamaños utilizando un proceso de mezcla de alta velocidad. Están compuestas por un núcleo magnético dentro de un recubrimiento de óxido de circonio de cerámica[37]. Ver Figura 3.6. Un ejemplo de dichas partículas son las *Dynabeads* [38], utilizadas para el proceso de separación de *Cryptosporidium*.



**Figura 3.6.:** Partículas magnéticas utilizadas en el método de inmunomagnetismo

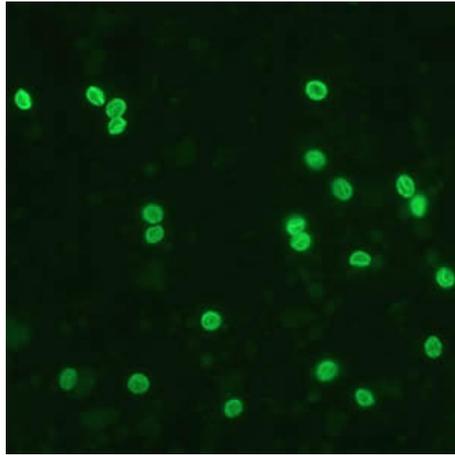
Las bolas se mezclan con una solución que contiene los microorganismos a los cuales se unirán dichas bolas, en nuestro proyecto serán los *Cryptosporidium*, para permitir que los anticuerpos se unan a los antígenos de superficie celular. Estas uniones no se forman correctamente en las células muertas, por lo que el IMS no parece sufrir de falsos positivos cuando una muestra se compone de organismos muertos. Acto seguido, dicha mezcla se somete a la acción de un separador magnético, el cual atrae a las partículas con células unidas, separando así los dos grupos de partículas. Las partículas no atraídas pueden ser desechadas mediante la aplicación de un lavado.

Con ello, conseguimos que microorganismos que son difíciles de diferenciar, con la aplicación de este método se consiga de manera más fácil y en menor tiempo.[37]

Para la detección y visualización de dichas partículas retenidas, se hace uso de la técnica de inmunofluorescencia.

### 3.2.2. Inmunofluorescencia

“La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula.”[39] Ver Figura 3.7.



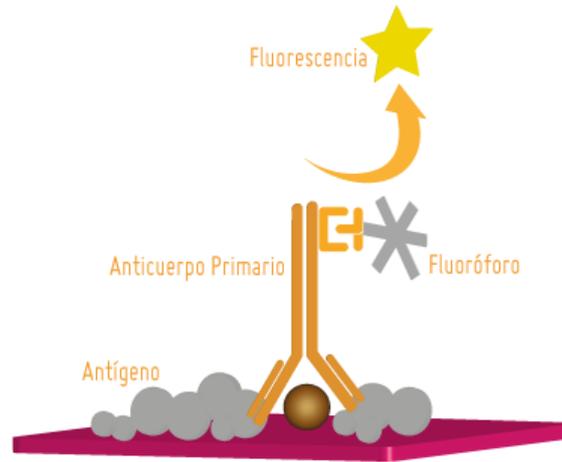
**Figura 3.7.:** Cryptosporidium tras la aplicación de la inmunofluorescencia.[40]

Para ello, se combinan colorantes fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, rodamina B de lisamina o ácido 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfónico) con anticuerpos o antígenos. Acto seguido, esta combinación es expuesta a los anticuerpos o antígenos correspondientes. Una vez expuesto a luz ultravioleta, la fluorescencia se observará (cuando la reacción sea positiva) con un microscopio de inmunofluorescencia.[41]

Con respecto a los tipos de colorantes a utilizar, debemos usar aquellos que formen uniones con las proteínas pero sin afectar los grupos de combinación específica del anticuerpo. Además, debemos de trabajar a pH estable y adecuado para cada tipo de colorante, pues el pH afecta la fluorescencia. [41]

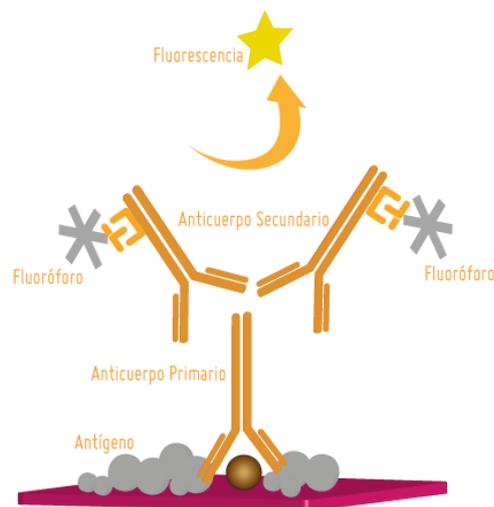
Según [42], para la preparación de las muestras podremos usar dos tipos de técnicas:

- **Directa:** el marcaje directo en el que el anticuerpo primario está marcado con un marcador fluorescente. El método de marcaje directo, usando una unión covalente previa del fluoróforo con el anticuerpo primario, sólo requiere una única etapa de incubación con el antígeno y una sola etapa de lavado. El marcador fluorescente generalmente produce una sustancia colorada o un aumento en la cantidad de luz emitida a una longitud de onda determinada, si el antígeno está presente. En el caso de ausencia de antígeno, no hay unión del anticuerpo primario marcado y por lo tanto no hay señal. Ver Figura 3.8.



**Figura 3.8.:** Inmunofluorescencia directa[42]

- Indirecta:** el marcaje indirecto es el que un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo se utiliza para reconocer un anticuerpo primario. El método de marcaje indirecto es un proceso más largo que el directo, ya que consiste en el uso de un anticuerpo primario no marcado que se une específicamente al antígeno diana, y el anticuerpo secundario, que lleva el fluoróforo, reconoce el anticuerpo primario y se une a él. Varios anticuerpos secundarios pueden unirse al anticuerpo primario y esto proporciona una amplificación de la señal mediante el aumento del número de moléculas de marcadores fluorescentes por antígeno. Ver Figura 3.9.



**Figura 3.9.:** Inmunofluorescencia indirecta[42]

### 3.2 Concepto de inmunofluorescencia e inmunomagnetismo

La inmunofluorescencia indirecta ofrece una mayor fluorescencia que la directa. A continuación, se muestra en la Figura 3.10 las principales ventajas y desventajas de una técnica con respecto a la otra:

Método DIRECTO		Método INDIRECTO	
PROS	CONTRAS	PROS	CONTRAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Rápido porque sólo se usa un anticuerpo y se necesitan menos etapas.</li> <li>* Unión específica del anticuerpo secundario (no hay reactividad cruzada).</li> <li>* Disminución de la variabilidad del ensayo y mejora de la calidad de los datos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Falta de sensibilidad para detectar bajos niveles de expresión del antígeno.</li> <li>* Necesidad de marcar cada anticuerpo primario para cada antígeno de interés: consume tiempo y es costoso.</li> <li>* La inmunoreactividad del anticuerpo primario puede verse afectada adversamente por el marcaje.</li> <li>* No hay flexibilidad en la elección marcador del anticuerpo primario de un experimento a otro.</li> <li>* Amplificación de señal mínima.</li> <li>* Altos conocimientos científicos especializados requeridos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Mayor nivel de sensibilidad y genera una señal más intensa.</li> <li>* Una amplia variedad de anticuerpos secundarios marcados disponibles comercialmente.</li> <li>* Máxima inmunoreactividad del anticuerpo primario se mantiene, ya que no está etiquetado.</li> <li>* Mayor amplificación de la señal debido a la unión de varios anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Unión no específica del anticuerpo secundario y alto ruido de fondo.</li> <li>* El uso de un anticuerpo secundario requiere pasos adicionales de bloqueo y de control.</li> </ul>

**Figura 3.10.:** Ventajas y desventajas de la inmunofluorescencia directa e indirecta[42]

Por otro lado, es importante tener presente las desventajas o limitaciones que la inmunofluorescencia presenta. Además, del elevado coste del reactivo y equipo necesario, y la necesidad de personal especializado; según [43], la inmunofluorescencia puede presentar algunas limitaciones:

“La fluorescencia visualizada depende de la calidad y concentración del anticuerpo, el manejo adecuado de la muestra, y la detección con el apropiado anticuerpo secundario.”

A pesar de la limitación citada, es una técnica muy usada en la investigación científica y laboratorios clínicos, ya que se puede detectar y visualizar fácilmente la

presencia de un determinado tipo de molécula en un microorganismo. Es una técnica muy usada para estudios bacteriológicos, virales, parasitológicos. Un ejemplo de aplicación, es la diagnóstico de enfermedades dermatológicas.

Algunas de las ventajas que proporciona el uso de esta técnica son la rapidez de obtención de los resultados, la no necesidad de realizar cultivos, distinción de diferentes tipos de microorganismos en una mezcla y la no fluorescencia de organismos muertos.

## 4. Diseño

### 4.1. Proceso de concentración y detección de *Cryptosporidium Parvum*

En este proyecto, para la detección de *Cryptosporidium Parvum* se hace uso de la inmunofluorescencia. Para ello, se deben seguir una serie de pasos previos que nos permitirán hacer visibles los Cryptos cuando usemos el microscopio fluorescente.

1. **Filtrado.** Esta etapa del proceso elimina gran parte del agua y concentra las partículas en suspensión. También sirve para descartar partículas de gran tamaño ( $\geq 50\mu m$ ). Este proceso no es susceptible de integrarse en un Lab-on-a-Chip y no presentaría ninguna mejora por hacerse de ese modo, por lo que no se diseña en este proyecto.
2. **Concentración de partículas.** Debido a que la concentración de Cryptos en el agua es muy baja y además éstos son muy pequeños, es necesario el uso de un separador que aumente la concentración de éstos. Así tendremos un número considerable de Cryptos en un pequeño volumen de agua, siendo más fácil su detección. Además, la cantidad de reactivos necesarios para este proceso será mucho menor, disminuyendo así notablemente el coste final del proceso.
3. **Separación de partículas.** Ésta se lleva a cabo con el uso del inmunomagnetismo. En el agua existe numerosos tipos de partículas orgánicas e inertes en suspensión del mismo tamaño que los Cryptos, por lo que será necesario separar dichos patógenos del resto de partículas en suspensión.
4. **Detección de *Cryptosporidium*.** La detección se lleva a cabo mediante la aplicación de la inmunofluorescencia. Para ello, hay que realizar una serie de pasos intermedios para producir la fluorescencia de los Cryptos y su visualización en el microscopio. Estos pasos vienen recogidos en la EPA Method 1622[44].

## 4.2. Diseño de un concentrador de partículas en espiral

En esta sección se explicará cómo se realiza la concentración de las partículas. La técnica utilizada, está motivada por la necesidad del uso de técnicas que permitan una continua separación de partículas en Lab-on-a-Chip, para así disminuir el tiempo de análisis y detección. Para ello, se diseñará un separador de partículas que clasifique las partículas según su tamaño.

Ésto se realizará introduciendo por la entrada del separador una corriente de agua con Cryptos y otras partículas que contenga el agua. A medida que el flujo de agua avanza a través del separador, las partículas se van dividiendo en dos corrientes diferentes. En la salida del separador, se tendrá dos corrientes con un tamaño de partículas distinto en cada una de éstas. La corriente que contiene las partículas del tamaño deseado se vuelven a recircular por el separador, y la otra corriente se desecha.

De este modo, después de un tiempo de procesado se obtendrá un volumen de agua con una gran concentración de patógenos que podrá ser analizado por técnicas posteriores.

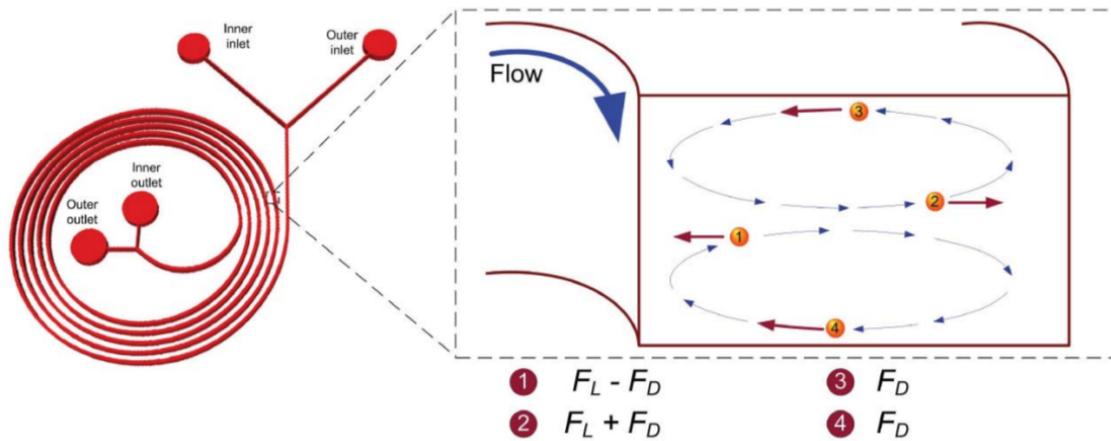
### 4.2.1. Diseño microfluídico del separador

El proceso explicado en el punto anterior, se ha llevado a cabo mediante la utilización de un separador el cuál lo forma un microcanal con forma geométrica en espiral. Esta geometría, hace posible la separación de las partículas de un determinado tamaño del resto del fluido.

Dicha separación se produce a la salida del microcanal, en la parte exterior de la espiral, tras ir separándose progresivamente las partículas a lo largo del recorrido por el microcanal desde el centro de la espiral hasta el exterior de ésta. Esto se debe a dos mecanismos, las fuerzas de sustentación inducida por la pared y las fuerzas de Dean, que suceden en el interior de dicha espiral al pasar a través de ella el fluido.

El fluido que circula a través de un canal curvilíneo, experimenta una aceleración centrífuga la cual está dirigida en la dirección radial, hacia fuera. Esta aceleración, lleva a la formación de dos vórtices. Estos vórtices se les conoce como vórtices de

Dean, los cuales se forman en la mitad superior e inferior del canal, ambos vórtices son iguales y de sentido opuesto. Ver Figura 4.1.



$F_L$  Fuerza de Dean  
 $F_D$  Fuerza de sustentación

**Figura 4.1.:** Diseño del separador espiral y representación de los vórtices de Dean[45]

La magnitud de estos flujos secundarios se cuantifica mediante un número adimensional (número de Dean,  $De$ ) dado por:

$$De = \frac{\rho U_f D_h}{\mu} \sqrt{\frac{D_h}{2R}} = Re \sqrt{\frac{D_h}{2R}}$$

donde  $\rho$  es la densidad del fluido ( $kg \cdot m^{-3}$ ),  $U_f$  es la velocidad media del fluido ( $m \cdot s^{-1}$ ),  $\mu$  es la viscosidad del fluido ( $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$ ),  $R$  es el radio de curvatura ( $m$ ) del canal,  $D_h$  es el diámetro hidráulico del microcanal ( $D_h = \frac{4A}{P}$ ) y  $Re$  es el número de Reynolds del flujo.

A mayor número de Dean, mayor es el flujo de Dean que se forma. Por ello, en los microcanales rectos, el  $De = 0$ . Mientras que, en los microcanales curvos el  $De$  incrementa a medida que aumenta la curvatura (a medida que disminuye  $R$ ), aumenta el  $Re$  y los tamaños de los canales aumentan.

Otro número adimensional importante a la hora de caracterizar el movimiento de partículas es el número de Reynolds de la partícula, que se define como:

$$Re_p = Re \cdot \left(\frac{a_p}{D_h}\right)^2$$

Las fuerzas inerciales son dominantes, produciendo la concentración de las partículas para valores de  $Re_p$  del orden de uno.

La velocidad media de las corrientes de Dean viene caracterizada por la fórmula de Ookawara[46].

$$\bar{U}_D = 1,8 \cdot 10^{-4} De^{1,63} \quad (m \cdot s^{-1})$$

Como resultado, las partículas que circulan a través de los microcanales curvilíneos, sufren una fuerza de arrastre debido a los flujos transversales de Dean que se forman. Dependiendo del tamaño de las partículas, esta fuerza de arrastre,  $F_D$  (ver Figura 4.1) hace que las partículas se muevan a lo largo de los vórtices de Dean de forma circular y por lo tanto se mueven hacia la pared ya sea del canal interior o exterior.

Si se asume que las partículas son esféricas, siendo su diámetro  $a_p$ , y siguen un régimen de Stokes, la fuerza media de arrastre producida por este flujo secundario puede calcularse de la siguiente forma:[45]

$$F_D = 3\pi\mu a_p \bar{U}_{De} = 5,4 \cdot 10^{-4} \pi\mu De^{1,63} a_p \quad (N)$$

El otro mecanismo presente, es el de sustentación de las partículas debido al gradiente de los esfuerzos cortantes y las inducidas por las paredes del microcanal. Esta fuerza puede ser caracterizada usando la ecuación de Asomolov, que relaciona la sustentación con el tamaño de las partículas y los esfuerzos cortantes.

$$F_L = \rho G^2 C_L a_p^4 = \rho \left( \frac{2U_f}{D_h} \right)^2 C_L a_p^4$$

donde  $G$  es el ratio de los esfuerzos cortantes ( $s^{-1}$ ), que en un régimen de Poiseuille es igual a  $U_{max}/D_h$ , y  $C_L$  es el coeficiente de sustentación que depende de la posición de la partícula en el canal, aunque se asumirá un valor medio de 0,5 (según indica [45]). Igual que anteriormente utilizamos la ecuación de Stokes para el cálculo de la fuerza de Dean, ahora se usará para predecir la velocidad de la partícula debido a las fuerzas de arrastre:

$$\bar{U}_L = \frac{F_L}{3\pi\mu a_p} = \frac{4\rho C_L a_p^3 U_f^2}{3\pi\mu D_h^2}$$

Como se observa de las expresiones de las fuerzas de arrastre  $F_D$  y  $F_L$ , la dependen-

cia de ambas fuerzas con el diámetro de las partículas siguen relaciones distintas.  $F_D$  aumenta linealmente con  $a_p$  mientras que  $F_L$  aumenta de manera lineal con  $a_p^4$ . Ésto hace que para partículas pequeñas, la fuerza de Dean sea dominante y las partículas quedan atrapadas en los vórtices secundarios. Mientras que, para las partículas de mayor tamaño, la fuerza de sustentación debida a los esfuerzos cortantes y la proximidad de la pared es dominante, quedando las partículas atrapadas en una posición de equilibrio cercana a la pared interior del microcanal. Ésto da como resultado la formación de dos corrientes distintas de partículas con dos tamaños diferentes que pueden ser separadas simplemente dividiendo el canal en dos.

Como resultado de esto dos mecanismos, la longitud necesaria del microcanal para producir que las partículas de distintos tamaños migren completamente a su posición de equilibrio puede ser deducida a partir de la expresión de las velocidades de migración debido a los dos efectos:

- *Partículas que se desea concentrar:*

El tiempo necesario para que una partícula, de gran tamaño donde las fuerzas dominantes son las inerciales, recorra el ancho del microcanal  $\left(\frac{W}{U_L}\right)$  debe ser menor que el tiempo de residencia de la partícula en el canal  $\left(\frac{L}{U_f}\right)$  [45]

$$L \geq \frac{U_f}{U_L} W = \frac{4\rho C_L a_p^3}{3\pi\mu D_h^2 U_f^3} W$$

- *Partículas que se desea dispersar:*

El tiempo necesario para que una partícula de pequeño tamaño, cuyas fuerzas dominante son producida por el arrastre de los flujos secundarios de Dean, recorra el ancho del microcanal  $\left(\frac{W}{U_D}\right)$  debe ser menor que el tiempo de residencia de la partícula en el canal  $\left(\frac{L}{U_f}\right)$

$$L \geq \frac{U_f}{U_L} W$$

Por último, se debe tener en cuenta las limitaciones de flujo del microcanal debido a la pérdida de carga que se produce en él. Esta pérdida de carga se puede estimar suponiendo que el flujo es laminar y sigue un régimen de Hagen–Poiseuille ( $2D$ ). En este caso, la pérdida de carga por unidad de longitud puede ser obtenida de la

siguiente expresión:

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{12\mu U_f}{H^2} \leq \frac{\Delta P_{max}}{L}$$

La deducción de dicha fórmula se puede consultar en Sección A.1

A continuación, se muestra el procedimiento y los valores del separador diseñado:

### 1. Cálculo de la altura de los microcanales.

Para partículas de tamaño mayor a  $5\mu m$  (tamaño medio de los *Cryptosporidium Parvum*), las fuerzas de Dean son dominantes cuando se cumple  $a_p/H > 0,07$ . [47] Siendo  $H$  la altura de los microcanales y  $a_p$  el tamaño de las partículas. Por tanto  $H < 71,43\mu m$ , en este caso cogemos un valor de  $H = 68\mu m$ .

### 2. Cálculo del radio de curvatura de los microcanales.

Para que las fuerzas inerciales sean dominantes el número de Reynolds de las partículas deber ser del orden de la unidad  $Re_p \sim 1$ . Por lo tanto, el Reynolds del flujo puede deducirse a partir de éste como sigue:

$$Re_p = Re \cdot \left(\frac{a_p}{D_h}\right)^2 \sim 1$$

En un conducto rectangular el diámetro hidráulico viene dado por la siguiente fórmula:

$$D_h = \frac{4A}{P} = \frac{4WH}{2W + 2H}$$

Sin embargo, como el conducto tiene ratio de aspecto muy elevado  $W \gg H$ , la longitud característica en este caso es  $H$  y por lo tanto  $D_h = H$ . Finalmente, el Reynolds del flujo puede estimarse como sigue:

$$Re \leq \left(\frac{H}{a_p}\right)^2 = \left(\frac{68\mu m}{5\mu m}\right)^2 = 184,96 \rightarrow Re = 110$$

$$Re = \frac{\rho U_f D_h}{\mu} \rightarrow U_f = \frac{\mu Re}{\rho D_h} = \frac{8,91 \cdot 10^{-4} \frac{kg}{m \cdot s} \times 110}{999,97 \frac{kg}{m^3} \times 68 \cdot 10^{-6} m} = 1,441 \frac{m}{s}$$

Los valores de las propiedades termodinámicas del agua se encuentran en tablas anexas (Subsección A.3.1) .

Por último, se elige un número de Dean menor que 20 según las recomendaciones [48]. Tras ésto, se hace una estimación del radio de curvatura del canal a partir de la definición del número de Dean:

$$De = 10 \rightarrow De = Re \sqrt{\frac{D_h}{2R}}$$

$$R = \frac{H}{2} \left( \frac{Re}{De} \right)^2 = \frac{68 \cdot 10^{-3} mm}{2} \left( \frac{110}{10} \right)^2 = 4,11 mm$$

### 3. Cálculo de la anchura y longitud de los microcanales.

La anchura y longitud de los microcanales pueden ser calculadas a partir de las limitaciones de presión y tiempo de residencia.

$$L \geq \frac{U_f}{U_L} W = \frac{3\pi\mu D_h^2}{4\rho C_L a_p^3 U_f} W$$

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{12\mu U_f}{H^2} \leq \frac{\Delta P_{max}}{L} \rightarrow L \leq \frac{H^2}{12\mu U_f} \Delta P_{max}$$

$$\frac{3\pi\mu D_h^2}{4\rho C_L a_p^3 U_f} W \leq L \leq \frac{H^2}{12\mu U_f} \Delta P_{max} \rightarrow$$

$$L_{min} = \frac{3\pi\mu D_h^2}{4\rho C_L a_p^3 U_f} W \leq L \leq \frac{H^2}{12\mu U_f} \Delta P_{max} = L_{max}$$

$$L_{max} \geq L_{min} \rightarrow W \leq \frac{\rho C_L a_p^3}{9\pi\mu^2} \Delta P_{max} =$$

$$= \frac{999,97 \frac{kg}{m^3} \times 0,5 \times (5 \cdot 10^{-6} m)^3}{9\pi \times (8,91 \cdot 10^{-4} \frac{kg}{m \cdot s})^2} \Delta P_{max} = 2,78 \frac{nm}{Pa} \cdot \Delta P_{max}$$

La presión máxima, por razones de diseño, se elige que sea de  $2,2 atm = 2,2 \cdot 101,325 kPa$ :

$$W \leq \frac{\rho C_L a_p^3}{9\pi\mu^2} \Delta P_{max} = 2,78 \frac{nm}{Pa} \cdot 2,2 \cdot 101,325 \cdot 10^3 Pa = 620,67 \mu m$$

Se selecciona un valor de  $W = 400 \mu m$ ,

$$\begin{aligned} L_{max} &= \frac{H^2}{12\mu U_f} \Delta P_{max} = \frac{(68 \cdot 10^{-6} m)^2 \cdot \Delta P_{max}}{12 \times \left(8,91 \cdot 10^{-4} \frac{kg}{m \cdot s}\right) \times \left(1,441 \frac{m}{s}\right)} = \\ &= 0,30 \frac{\mu m}{Pa} \cdot \Delta P_{max} = 66,88 mm \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} L_{min} &= \frac{3\pi\mu D_h^2}{4\rho C_L a_p^3 U_f} W = \frac{3\pi \times \left(8,91 \cdot 10^{-4} \frac{kg}{m \cdot s}\right) \times (68 \cdot 10^{-6} m)^2}{4 \times \left(999,97 \frac{kg}{m^3}\right) \times 0,5 \times (5 \cdot 10^{-6} m)^3 \times \left(1,441 \frac{m}{s}\right)} W = \\ &= 107,75 \cdot W = 43,10 mm \end{aligned}$$

Sabiendo el valor de  $L_{max}$  y  $L_{min}$ , establecemos que la longitud  $L$  de nuestra espiral será de  $66mm$ .

Con estos parámetros geométricos el caudal que puede asumir el separador es de:

$$Q = H \cdot W \cdot U_f = 39,20 \frac{\mu L}{s}$$

#### 4.2.2. Diseño geométrico del separador espiral

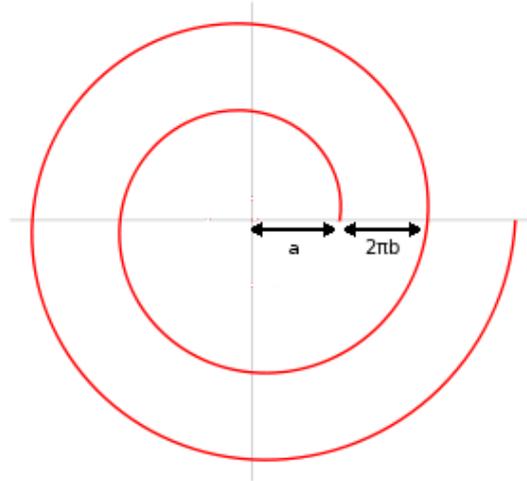
El separador diseñado sigue una geometría conocida como espiral de Arquímedes, debido a que permite una alta compacidad entre los canales en comparación con otro tipo de espirales. La línea media del canal viene definida en coordenadas polares con la siguiente ecuación:

$$r(\theta) = a + b\theta$$

Siendo  $a$  el radio inicial de dicha espiral (el radio del centro de la espiral a la línea media del canal a la entrada), y  $b$  es lo que incrementa el radio de dicha espiral por radián a medida que cambia el ángulo girado  $\theta$ . Ver Figura 4.2.

Así, como las ecuaciones de la pared interior ( $i$ ) y la exterior ( $e$ ) son:

$$r_i(\theta) = a + b\theta - \frac{W}{2}$$



**Figura 4.2.:** Espiral de Arquímedes

$$r_e(\theta) = a + b\theta + \frac{W}{2}$$

Para calcular todos los parámetros que hacen falta para definirla, se siguen los siguientes pasos:

1. **Cálculo de  $b_{min}$ :**

Tenemos que tener en cuenta que entre la pared exterior de una determinada vuelta y la interior de la siguiente vuelta, debe haber un determinado espesor de pared  $t$  para que no se produzca una superposición de las paredes de los canales de la espiral. El cálculo a realizar para que esto se cumpla es,  $r_e(\theta) + t \leq r_i(\theta + 2\pi)$ , que sustituyendo en dicha ecuación las ecuaciones definidas anteriormente de  $r_i(\theta)$  y  $r_e(\theta)$ , nos queda:

$$a + b\theta + \frac{W}{2} + t \leq a + b(\theta + 2\pi) - \frac{W}{2} \rightarrow$$

$$\rightarrow 2\pi b \geq W + t \rightarrow$$

$$\rightarrow b_{min} = \frac{W + t}{2\pi}$$

Sustituyendo en dicha ecuación el valor de  $t = 200\mu m$ , nos queda que el valor de  $b_{min}$  es:

$$b_{min} = \frac{400\mu m + 200\mu m}{2\pi} = 95,49 \frac{\mu m}{rad}$$

## 2. Cálculo del radio inicial $a$ :

El radio inicial y el número de vueltas de la espiral definen la longitud y radio de curvatura de éstas. Durante la fase de diseño previo se calculó la longitud necesaria del canal para la completa separación de las partículas y la curvatura necesaria para que las corrientes de Dean fueran efectivas. Por ello, debemos calcular los parámetros de la espiral que hagan que la curvatura y longitud de ésta sean los deseados.

Para ello, calculamos la curvatura de la espiral usando la siguiente fórmula de la curvatura de una curva en coordenadas polares:

$$\kappa(\theta) = \frac{2r'^2 - rr'' + r^2}{(r^2 + r'^2)^{3/2}}$$

Siendo,

$$r(\theta) = a + b\theta$$

$$r'(\theta) = b \quad r''(\theta) = 0$$

Sustituyendo en la ecuación de  $\kappa(\theta)$ , la definición de la línea media del canal y sus derivadas, nos queda:

$$\kappa(\theta) = \frac{2b^2 + (a + b\theta)^2}{[(a + b\theta)^2 + b^2]^{3/2}}$$

Suponiendo que  $a \gg 2\pi N \cdot b$ , la ecuación de la curvatura nos quedaría:

$$\kappa(\theta) \simeq \frac{1}{a}$$

Sabiendo que la curvatura  $\kappa$  es la inversa del radio de curvatura  $R$ , obtenemos:

$$\kappa(\theta) = \frac{1}{R} \rightarrow$$

$$\rightarrow a = R = 4,11 \text{ mm}$$

### 3. Cálculo del número de vueltas de la espiral, $N$ :

Sabiendo que la longitud de una curva,  $L$ , viene definida en coordenadas cartesianas de la siguiente forma:

$$L = \int_{t_1}^{t_2} \sqrt{x'(t)^2 + y'(t)^2} dt$$

Haciendo un cambio a coordenadas polares, nos queda:

$$x(\theta) = r(\theta) \cos \theta$$

$$y(\theta) = r(\theta) \sin \theta$$

$$x' = r' \cdot \cos \theta - r \cdot \sin \theta$$

$$y' = r' \cdot \sin \theta + r \cdot \cos \theta$$

$$L = \int_0^{2\pi N} \sqrt{(r' \cos \theta - r \sin \theta)^2 + (r' \sin \theta + r \cos \theta)^2} d\theta = \int_0^{2\pi N} \sqrt{r'^2 + r^2} d\theta$$

Para la espiral de Arquímedes queda de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} L &= \int_0^{2\pi N} \sqrt{b^2 + (a + b\theta)^2} d\theta \simeq \int_0^{2\pi N} \sqrt{(a + b\theta)^2} d\theta = \\ &= \int_0^{2\pi N} (a + b\theta) d\theta = a\theta + b \frac{\theta^2}{2} \Big|_0^{2\pi N} = 2\pi N (a + b\pi N) = \\ &= 2\pi N \cdot \bar{r} \end{aligned}$$

Finalmente, a partir del valor de  $L$  podemos estimar el número de vueltas necesario para la espiral:

$$2\pi^2 b N^2 + 2\pi a N - L = 0$$

$$N = \frac{-2\pi a + \sqrt{4\pi^2 a^2 + 8\pi^2 b L}}{4\pi^2 b} = \frac{-a + \sqrt{a^2 + 2bL}}{2\pi b} = 2,20$$

Por último, se debe comprobar que la curvatura real de la espiral no difiera mucho de la curvatura estimada. Para ello, se calcula el valor mínimo de la

curvatura ( $\theta = 2\pi N$ ).

$$\kappa(2\pi N) = \frac{2b^2 + (a + 2\pi Nb)^2}{\left[(a + 2\pi Nb)^2 + b^2\right]^{3/2}}$$

$$\frac{1}{\kappa} = 5,43 \text{ mm} \gg R = 4,11 \text{ mm}$$

El radio de curvatura es muy dispar por lo que tenemos que hacer una nueva estimación de  $a$ , para ello usaremos el valor del número de vueltas anteriormente aproximado.

$$\kappa(2\pi N) = \frac{2b^2 + (a + 2\pi Nb)^2}{\left[(a + 2\pi Nb)^2 + b^2\right]^{3/2}} \simeq \frac{1}{a + 2\pi Nb}$$

$$a + 2\pi Nb = R$$

$$\sqrt{a^2 + 2bL} = R \rightarrow a = \sqrt{R^2 - 2bL} = 2,078$$

$$N = \frac{-a + \sqrt{a^2 + 2bL}}{2\pi b} = 3,39$$

Comprobamos el valor mínimo de la curvatura de nuevo para los nuevos valores de los parámetros  $a$  y  $N$ .

$$\kappa(2\pi N) = \frac{2b^2 + (a + 2\pi Nb)^2}{\left[(a + 2\pi Nb)^2 + b^2\right]^{3/2}} = 266,8692 \text{ m}^{-1}$$

$$\frac{1}{\kappa} = 4,112 \text{ mm} \approx R = 4,11 \text{ mm}$$

Estos valores corresponden a un valor de  $De = 10,001345$ , valor muy cercano al de diseño  $De = 10$ .

Los parámetros geométricos de la espiral están resumidos en la Tabla 4.1.

### 4.2.3. Diseño del proceso de recirculación

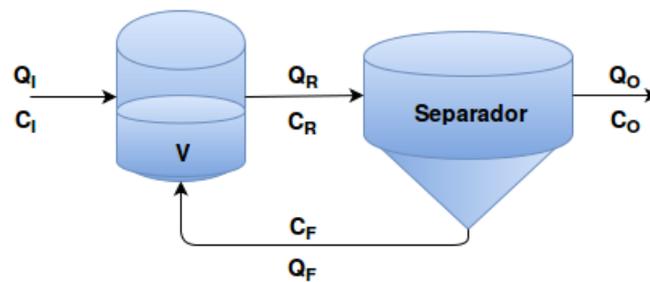
Como ya se puso de manifiesto con anterioridad, el *Cryptosporidium Parvum* es un patógeno presente en el agua que presenta una peligrosidad incluso en baja concentraciones  $10^9/10\text{L}$ . Por ello, es necesario analizar grandes cantidades de agua, lo cual presenta un gran problema a la hora de tomar una pequeña muestra. Debido

Parámetro	Valor	Descripción
$H$	$68 \mu m$	Espesor del canal
$W$	$400 \mu m$	Anchura del canal
$L$	$66 mm$	Longitud del canal
$N$	3,39	Número de vueltas de la espiral
$a$	$2,08 mm$	Radio inicial de la espiral
$b$	$95,49 \mu m$	Tasa de apertura de la espiral
$t$	$200 \mu m$	Espesor de la pared del canal

**Tabla 4.1.:** Parámetros geométricos del separador espiral

a ésto, es necesario separar y concentrar dichos patógenos para poder detectarlos.

Para poder concentrar dichos patógenos se utiliza el separador antes diseñado y se recircula la corriente rica en partículas del tamaño deseado otra vez por el separador. Para ello, se necesita un volumen intermedio  $V$  que contendrá la solución con las partículas concentradas al finalizar el proceso. El diagrama del proceso se muestra en la Figura 4.3.



$Q_i, C_i$  Flujo y concentración de la corriente  $i$ -ésima.

- $Q_I, C_I$  Flujo de entrada de la muestra a analizar (diluida).
- $Q_R, C_R$  Flujo de entrada al separador.
- $Q_O, C_O$  Flujo de salida de agua sin patógenos (Caso separador ideal  $C_O = 0$ ).
- $Q_F, C_F$  Flujo de recirculación concentrado en patógenos.

**Figura 4.3.:** Diagrama del proceso de recirculación

Se definen a continuación varias magnitudes relevantes para el proceso:

1. *Tasa de recirculación  $\alpha$* : Es el ratio entre el caudal que se recircula y el caudal que sale del separador (igual al que entra).

$$\alpha = \frac{Q_F}{Q_R}$$

2. *Tasa de recuperación RR*: Es el ratio entre el número de partículas correctamente separadas por el separador y el número de partículas que entran en éste. Es una medida de la eficacia del separador.

$$RR = \frac{Q_F C_F}{Q_R C_R} = \alpha \frac{C_F}{C_R}$$

Para obtener un modelo matemático del proceso se calcula las ecuaciones de balance de materia en el volumen  $V$ , obteniéndose las siguientes ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{dV(t)}{dt} = Q_I + Q_F - Q_R = Q_I + (\alpha - 1) Q_R$$

$$V(t) = V_0 + (Q_I + (\alpha - 1) Q_R) t$$

$$\frac{d(C_R(t) \cdot V(t))}{dt} = Q_I C_I + Q_F C_F - Q_R C_R$$

$$V(t) \frac{dC_R(t)}{dt} + C_R(t) \frac{dV(t)}{dt} = Q_I C_I + (RR - 1) Q_R C_R$$

$$V(t) \frac{dC_R(t)}{dt} + \left( (1 - RR) Q_R + \frac{dV(t)}{dt} \right) C_R(t) = Q_I C_I$$

La solución de esta ecuación diferencial ordinaria viene dada por:

$$C_R(t) = e^{-\int_0^t \left( \frac{1-RR}{V} Q_R + \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \right) dt} \cdot \left( C_R(0) + \int_0^t \frac{Q_I C_I}{V} e^{-\int_0^t \left( \frac{1-RR}{V} Q_R + \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \right) dt} dt \right)$$

$$C_R(t) = e^{\log\left(\frac{V(0)}{V(t)}\right) - \int_0^t \left( \frac{1-RR}{V(s)} Q_R \right) ds} \cdot \left( C_R(0) + \int_0^t \frac{Q_I C_I}{V(s)} e^{\log\left(\frac{V(0)}{V(s)}\right) - \int_0^s \frac{1-RR}{V(u)} Q_R du} ds \right)$$

$$C_R(t) = \frac{V(0)}{V(t)} e^{-\int_0^t \left( \frac{1-RR}{V(s)} Q_R \right) ds} \cdot \left( C_R(0) + V(0) \int_0^t \frac{Q_I C_I}{V(s)^2} e^{-\int_0^s \frac{1-RR}{V(u)} Q_R du} ds \right)$$

$$e^{-\int_0^s \frac{1-RR}{V(u)} Q_R du} = e^{-\frac{Q_R(1-RR)}{Q_I + (\alpha-1)Q_R} \log(V(u))|_0^s} = \left( \frac{V(s)}{V(0)} \right)^{-\frac{Q_R(1-RR)}{Q_I + (\alpha-1)Q_R}}$$

En el caso de que el volumen se mantenga constante, la solución en régimen permanente nos dará la máxima concentración posible que se puede obtener para un volumen fijo  $V$ :

$$\frac{dV(t)}{dt} = Q_I + (\alpha - 1) Q_R = 0$$

$$V \frac{dC_R(t)}{dt} + (1 - RR) Q_R C_R(t) = Q_I C_I$$

$$(1 - RR) Q_R C_R(\infty) = Q_I C_I \rightarrow C_R(\infty) = \frac{Q_I C_I}{(1 - RR) Q_R} = \frac{(1 - \alpha) C_I}{1 - RR}$$

$$C_R(t) = C_R(\infty) + (C_R(0) - C_R(\infty)) e^{-\frac{(1-RR)Q_R t}{V}}$$

En el caso de que se necesite analizar un mayor caudal o el ratio de separación sea muy bajo, se puede poner varios separadores trabajando en paralelo para aumentar el caudal o varios en serie para aumentar la tasa de recuperación.

El proceso de concentración estará compuesto por 2 fases obligatorias + 1 fase opcional:

1. **Fase inicial de llenado del volumen ( $V$ ):** En esta fase el separador no está en funcionamiento  $Q_R = 0$  y se llena el volumen  $V_0$  con la disolución de la muestra. Esta fase durará un tiempo  $t_1 = \frac{V_0}{Q_I} = 0,085min$ . Dicho tiempo es despreciable frente a la duración del resto de fases, ya que  $V_0$  es muy pequeño y el caudal de entrada no está limitado por el separador.
2. **Fase de concentración a volumen constante ( $\frac{dV(t)}{dt} = 0$ ):** En esta segunda fase se busca concentrar el fluido hasta un valor de concentración que permita el análisis. Para este desarrollo, se asume que el separador tiene una tasa de recuperación  $RR$  de 99,99%, la tasa de recirculación se fija en 20% y el caudal del separador es 16 veces el caudal de una espiral ya que se usan 16 de estas espirales en paralelo  $Q_R = 16 \cdot Q_{espiral} = 627,28 \frac{\mu l}{s}$ . Escogemos usar 16 espirales debido a que no es un número muy alto y por lo tanto, las dimensiones del Lab-on-a-Chip serán adecuadas, además con dicho número de espirales obtenemos un tiempo de procesado ( $\sim t_2$ ) razonable, como se verá a continuación en los siguientes cálculos. La muestra que se analizará corresponde a la fase 3 del protocolo EPA (ver Figura 2.1), por lo que su volumen es de 50 ml y su concentración de patógenos crítica según la normativa es de 0,1670  $\frac{og}{ml}$  (ver Sección 1.2) .

$$C_R(\infty) = \frac{(1 - \alpha) C_I}{1 - RR} = \frac{(1 - 0,2) \cdot 0,000167 \frac{1}{\mu l}}{1 - 0,9999} = 1,333 \frac{og}{\mu l}$$

Se elige un valor del volumen de control que sea factible para el posterior

análisis de  $200 \mu l$ .

$$\tau = \frac{V_0}{(1 - RR) Q_R} = \frac{200 \mu l}{(1 - 0,9999) 627,28 \frac{\mu l}{s}} = 53,14 \text{ min}$$

$$Q_I + (\alpha - 1) Q_R = 0 \rightarrow Q_I = (1 - \alpha) Q_R = 501,82 \frac{\mu l}{s}$$

$$t_2 = \frac{V_I}{Q_I} = \frac{V_I}{(1 - \alpha) Q_R} = \frac{6 \cdot 10^5 \mu l}{(1 - 0,2) 627,28 \frac{\mu l}{s}} = 19,93 \text{ min}$$

$$C_R(t_2) = C_R(\infty) + (C_I - C_R(\infty)) e^{-\frac{1}{\tau} t_2} = 0,417 \frac{oq.}{\mu l}$$

### 3. Fase de concentración sin caudal de entrada ( $Q_I = 0$ ) (OPCIONAL):

En esta fase se conseguirá una mayor concentración por encima del límite antes descrito para volumen constante. Ésto solo será necesario si la concentración obtenida en la fase anterior es insuficiente. En este caso, la concentración obtenida es suficiente ya que el número de patógenos críticos en el volumen de control es de  $N = C_{R2} \cdot V_0 \simeq 83 \text{ oq.}$

$$V(t) = V_0 + (1 - \alpha) Q_R t$$

$$V_F = V_0 - (1 - \alpha) Q_R t_3 \rightarrow t_3 = \frac{V_0 - V_F}{(1 - \alpha) Q_R}$$

Por último, se puede calcular la tasa efectiva de recuperación del sistema completo, la cual refleja el porcentaje de patógenos que son atrapados en el volumen de control frente al número de patógenos que entró en el proceso.

$$RR_{ef} = \frac{V_F \cdot C_R(t_F)}{Q_I C_I t_I} = 83,38 \%$$

En resumen, se han puesto de manifiesto los mecanismos de transporte de partículas que ocurren en el interior de microcanales curvos, que son las fuerzas de sustentación inducidas por los esfuerzos cortantes y la proximidad de la pared, así como la fuerza de arrastre producida por las corrientes secundarias o flujos de Dean. Estos mecanismos se han usado para diseñar un separador de partículas, que separa éstas según su diámetro para atrapar patógenos como el *Cryptosporidium Parvum*. La geometría utilizada para el canal curvo es una espiral de Arquímedes cuyos parámetros  $a$ ,  $N$  y  $b$  fueron calculados para que dicho canal tuviera la curvatura y longitud

necesaria para la correcta separación de los patógenos. Los parámetros geométricos están resumidos en la Tabla 4.1. Por último, se calculó los parámetros de operación del proceso como el tiempo requerido para concentrar la muestra hasta su nivel final, la tasa de recirculación y la tasa de recuperación efectiva del proceso, culminando así el diseño del concentrador.

### 4.3. Diseño de un separador de partículas por IMS

El proceso de concentración de la muestra realizado previamente se diseñó para separar las partículas del tamaño deseado y concentrarlas hasta un tamaño de muestra manejable. Sin embargo, en el agua potable se pueden encontrar una gran diversidad de partículas con tamaño similar a los *Cryptosporidium Parvum*, tanto partículas de índole biológica, como partículas inertes. Por lo tanto será necesario separar los *Cryptosporidium* del resto de partículas y conseguir una concentración aún mayor para disminuir la cantidad de reactivos necesario para las etapas sucesivas. Para ello, se realiza un proceso de separación inmunomagnética que consta de las siguientes fases.

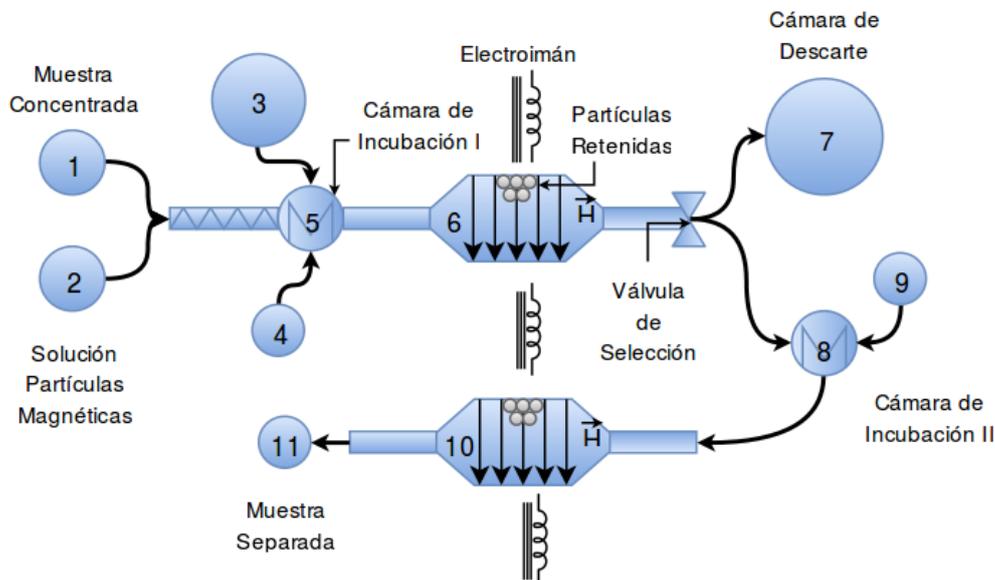


Figura 4.4.: Proceso de separación inmunomagnética

1. **Estabilización del pH:** La muestra concentrada en fases previas puede provenir de fuentes cuyo pH sea más ácido o más básico. Ésto puede influir en pasos

posteriores del proceso de separación inmunomagnético. Por ello la muestra se mezcla con una solución buffer provista por el fabricante ( $SL^{TM} - Buffer$ ). Esta fase no está recogida en el diagrama del proceso (Figura 4.4) por no ser una fase fundamental para el proceso de la separación inmunomagnética. Aunque es similar a la fase 2 de mezclado.

2. **Mezclado:** Una vez se ha estabilizado el pH de la muestra, ésta se mezcla con una solución de partículas magnéticas llamadas *Dynabeads* [38]. Estas partículas de  $5\mu m$  de diámetro están recubiertas de un anticuerpo selectivo que se adhiere sólo al *Cryptosporidium*. La mezcla se lleva a cabo a través de un conducto en forma de serpentin que facilita la mezcla por difusión. Los líquidos son impulsados por sendas cámaras de aire presurizadas.
3. **Asociación de las partículas magnéticas:** La mezcla de la muestra y las partículas magnéticas, *Dynabeads*, se dejan incubar en una cámara con temperatura controlada por 1 hora según indica el fabricante ( $25^{\circ}C$ ) mediante una resistencia eléctrica (Cámara 5, Figura 4.4). Tras esto, los anticuerpos que recubren las partículas magnéticas han tenido suficiente tiempo para asociarse a los *Cryptosporidium* y se encuentran en suspensión en dicha cámara.
4. **Lavado:** La separación se lleva a cabo en dos fases. Durante la primera fase de lavado, la muestra mezclada con las partículas ya asociadas a los patógenos es impulsada a través de un canal (Conducto 6, Figura 4.4). Este canal por el que circulan las partículas tiene en uno de sus márgenes un conductor, el cual crea un campo magnético que puede ser activado o desactivado según sea necesario. Durante la fase de lavado, el electroimán se halla activo y las partículas magnéticas son atraídas hacia una de las paredes del canal donde quedan retenidas. El resto de la muestra sigue el conducto que acaba en una válvula de dos posiciones. La posición actual de la válvula dirige el fluido por un canal que finaliza en una cámara de descarte (Cámara 7, Figura 4.4), en la que se aloja la muestra que contiene el resto de partículas que se desea descartar. La muestra es impulsada por  $200\mu l$  de una solución buffer fosfato salino (PBS) para evitar cambios del pH. Esta solución se encuentra almacenada en una cámara sellada y presurizada (Cámara 3, Figura 4.4), la cual tiene una válvula de un sólo uso que consiste en una pared delgada de plástico la cual es recorrida por una fina pista de cobre que funciona como un fusible eléctrico. Al hacer circular la corriente eléctrica, el rápido aumento de temperatura hace que la

pared se rompa y deje pasar el fluido. [49]

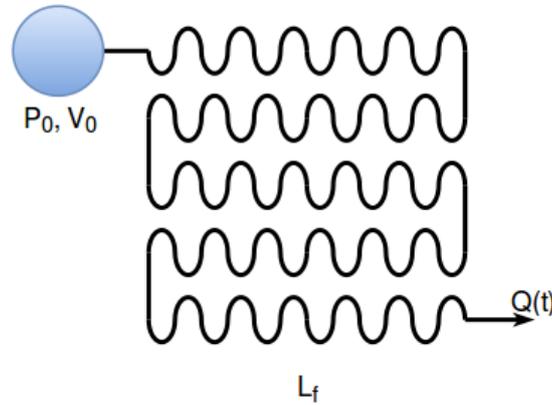
5. **Disociación de las partículas magnéticas:** El siguiente paso consiste en la disociación de las partículas magnéticas de los patógenos. Para ello, se desactivará el solenoide y se hará pasar  $50\ \mu L$  de una solución de  $0,1N\ HCl$  por dicho canal, arrastrando las partículas magnéticas hasta el final de éste donde se encuentra la válvula de selección que esta vez se encuentra en la posición complementaria. Ésto hace que las partículas magnéticas se dirijan hasta una segunda cámara de incubación (Cámara 8, Figura 4.4) en la que las partículas magnéticas se disociarán de los patógenos debido a la disminución del pH producida por el  $HCl$ . Este proceso durará unos  $10\ min$ . La temperatura de esta cámara de incubación también será controlada y se mantendrá a  $25\ ^\circ C$ . La solución usada para la impulsión se almacena en una cámara sellada y presurizada (Cámara 4, Figura 4.4) similar a la cámara que aloja la solución de impulsión usada durante la fase de lavado (Cámara 3, Figura 4.4).
6. **Eliminación de las partículas magnéticas:** Los patógenos ya disociados de las partículas magnéticas deben ser separados de éstas para que no influyan en las fases posteriores de análisis y detención. Para ello, se hace circular la muestra por un canal similar al que se usa en la fase de lavado pero con una única salida (Conducto 10, Figura 4.4) y por lo tanto sin válvula de selección. La muestra es impulsada por  $50\ \mu L$  de una solución  $1N\ NaOH$  contenida en una cámara sellada y presurizada (Cámara 9, Figura 4.4). A diferencia con la fase de lavado, en esta fase el electroimán está activo durante todo el proceso. La muestra pasa por dicho canal y las partículas magnéticas quedan atrapadas en el ensanchamiento donde se encuentra el solenoide. El resto de la muestra puede avanzar sin impedimento arrastrando por tanto los patógenos que ya habían sido disociados de las partículas magnéticas previamente.

#### 4.3.1. Diseño del canal de separación

Para el diseño del canal de separación se debe dimensionar el solenoide necesario para recolectar la partículas magnéticas, así como los volúmenes y presiones de las cámaras de impulsión que lleven el fluido con la velocidad deseada a través del canal de manera que el proceso de separación sea efectivo.

### Cálculo de las cámaras presurizadas

Primero, se diseñará la cámara presurizada la cual consta de un volumen de gas  $V_0$  a una presión  $P_0$ , seguido de un serpentín de longitud  $\frac{V_f}{A}$  donde  $A$  es la sección del conducto y  $V_f$  es el volumen de fluido almacenado en éste.



**Figura 4.5.:** Diagrama de una cámara presurizada

Las ecuaciones de Navier-Stokes se pueden simplificar para este caso suponiendo viscosidad dominante (flujo laminar) y unidimensional, debido a que las dimensiones de las válvulas son muy pequeñas, teniendo así un Reynolds bajo.

$$\rho \frac{\partial u(y, t)}{\partial t} = -\frac{\partial P(x)}{\partial x} + \mu \frac{\partial^2 u(y, t)}{\partial y^2}$$

Simplificando nuevamente ecuación para el caso de que la velocidad media siga la ley de Hagen–Poiseuille (2D), obtenemos la siguiente expresión:

$$\rho \frac{d\bar{U}_f}{dt} = \frac{\Delta P}{L_f} - \frac{12\mu\bar{U}_f}{H^2}$$

$$\rho \frac{d\bar{U}_f}{dt} + \frac{12\mu}{H^2}\bar{U}_f - \frac{\Delta P(t)}{L_f(t)} = 0$$

La presión de la cámara se puede calcular suponiendo que el gas se comporta como un gas ideal y que el proceso de expansión es muy rápido y por lo tanto, se considera adiabático e isentrópico. La presión del gas por tanto se puede calcular como sigue:

$$P_0 \cdot V_0^\gamma = P_1(t) \cdot V_1(t)^\gamma \rightarrow P_1(t) = P_0 \cdot \left( \frac{V_0}{V_0 + s(t) \cdot A_s} \right)^\gamma$$

Siendo  $\gamma$  la constante de dilatación adiabática del gas en cuestión. En este caso, aire seco  $\gamma = 1,4$  a  $20^\circ C$ ,  $s(t)$  es la posición de la columna de líquido con respecto al inicio donde se encuentra la cámara presurizada de gas. El resto de propiedades del aire seco pueden encontrarse anexo en Subsección A.3.2. También, debe tenerse en cuenta la pérdida de carga que se produce a la salida de la cámara debido a la válvula. Ésta se modela como la pérdida de carga que se produce en un orificio, la cual viene dada por la siguiente expresión[50]:

$$Q = A_{val} \frac{C_d}{\sqrt{1 - \beta_{val}^4}} \sqrt{\frac{2\Delta P_L}{\rho_g}}$$

$$\Delta P_{L1} = \frac{\rho_g}{2} \left( \frac{Q \cdot \sqrt{1 - \beta_{val}^4}}{C_d A_{val}} \right)^2 = \frac{\rho_g}{2} \left( \frac{\overline{U}_f \cdot A_s \cdot \sqrt{1 - \beta_{val}^4}}{C_d A_{val}} \right)^2$$

donde  $C_d$  es el coeficiente de descarga, el cual se supone que es aproximadamente 0,6 aunque podría determinarse de manera experimental,  $\beta_{val}$  es el ratio entre el diámetro característico del orificio y el diámetro característico del canal,  $A_{val}$  es el área de paso de la válvula la cual se estima será de  $A_{val} = [200\mu m \times 5\mu m]$ , la pérdida de carga producida por el cambio de sección del canal separador IMS, se puede estimar del mismo modo para un estrechamiento hasta una sección de  $A_c = [50\mu m \times 200\mu m]$ . Siendo las pérdidas totales:

$$\Delta P_{LT} = Q^2 \left( \frac{\rho_g}{2} \left( \frac{\sqrt{1 - \beta_{val}^4}}{C_d A_{val}} \right)^2 + \frac{\rho}{2} \left( \frac{\sqrt{1 - \beta_c^4}}{C_d A_c} \right)^2 \right) = k_L \cdot Q^2$$

Finalmente, la ecuación diferencial del fluido quedará:

$$\rho \frac{d\overline{U}_f}{dt} + \frac{12\mu}{H_s^2} \overline{U}_f - \frac{1}{L_f(t)} \left( P_0 \cdot \left( \frac{V_0}{V_0 + s \cdot A_s} \right)^\gamma - k_L \cdot (\overline{U}_f \cdot A_s)^2 - P_2 \right) = 0$$

Siendo  $P_2$  la presión a la salida del serpentín, la cual se considera constante.

$$\rho \ddot{s} + \frac{12\mu}{H_s^2} \dot{s} - \frac{1}{L_s - s} \left( P_0 \cdot \left( \frac{V_0}{V_0 + s \cdot A_s} \right)^\gamma - k_L \cdot (\dot{s} \cdot A_s)^2 - P_2 \right) = 0$$

Con dicha ecuación, se puede hacer una estimación del caudal máximo:

$$\frac{12\mu}{H_s^2} Q(t) = \frac{A_s}{L_s - s} \left( P_0 \cdot \left( \frac{V_0}{V_0 + s \cdot A_s} \right)^\gamma - k_L \cdot Q(t)^2 - P_2 \right) - \rho A_s \ddot{s}$$

$$\frac{A_s k_L}{L_s - s} \cdot Q(t)^2 + \frac{12\mu}{H_s^2} Q(t) = \frac{A_s}{L_s - s} \left( P_0 \cdot \left( \frac{V_0}{V_0 + s \cdot A_s} \right)^\gamma - P_2 \right) - \rho A_s \ddot{s}$$

$$\frac{A_s k_L}{L_s - s} \cdot Q(t)^2 + \frac{12\mu}{H_s^2} Q(t) - \frac{A_s}{L_s - s} \left( P_0 \cdot \left( \frac{V_0}{V_0 + s \cdot A_s} \right)^\gamma - P_2 \right) \leq 0$$

$$\tilde{Q}(s) \leq \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4 \cdot a \cdot c}}{2 \cdot a}$$

$$Q_{max} = \tilde{Q}(s^*) \quad : \quad \left. \frac{d}{ds} \right|_{s^*} [\tilde{Q}(s)] = 0 \rightarrow$$

$$\rightarrow s^* = 0 \rightarrow Q_{max} = \frac{-\frac{12\mu}{H_s^2} + \sqrt{\left(\frac{12\mu}{H_s^2}\right)^2 + 4 \cdot k_L \left(\frac{A_s}{L_s}\right)^2 (P_0 - P_2)}}{2 \cdot k_L \cdot \frac{A_s}{L_s}}$$

Otra magnitud importante es el volumen de líquido impulsado en régimen permanente, en este caso el proceso de expansión se considera isotermo ya que el gas tiene suficiente tiempo para equilibrar su temperatura con el ambiente, por tanto el gas perfecto sigue la ecuación de Boyle-Mariotte[51].

$$P_0 V_0 = P_1 V_1$$

Cuando las presiones se igualen nos dará el volumen impulsado y el máximo desplazamiento de la columna que debe ser menor que el tamaño del serpentín:

$$V_0 = \frac{P_2 \cdot V_f}{P_0}, \quad L_s \geq s_{max} = \frac{V_f}{A_s}$$

Para una presión de la cámara  $P_0 = 2 \text{ atm}$  y una presión de salida de  $P_2 = 1 \text{ atm}$ , una sección rectangular de  $A_s \equiv [200\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}]$ , el volumen de la cámara de gas es de  $100\mu\text{L}$ . La longitud del serpentín mínima es por tanto de  $2000 \text{ mm}$ , por lo que se elige un diez por ciento más grande  $L_s = 2200 \text{ mm}$ .

Una vez se ha decidido las dimensiones del serpentín se puede calcular el caudal máximo que pasará por éste. Para ello, se utilizarán los siguientes parámetros:

El gas usado es aire a  $2 \text{ atm}$  el cual tiene una densidad de  $\rho_g = 2,58 \text{ kg/m}^3$  y el ratio de estrechamiento  $\beta_{val} = \sqrt{\frac{A_{val}}{A_s}} = 0,1$ .

$$Q_{max} = 1,065 \text{ ml/min}$$

A este ratio de vaciado, se estima que el tiempo necesario para su vaciado, si el caudal se mantuviese constante, sería de 11,27 s.

## Cálculo del solenoide

El cálculo de las dimensiones del solenoide está basado en el campo magnético necesario para hacer que las partículas magnéticas se depositen en una de las paredes del canal. Para ello, se han utilizado las ecuaciones de modelado propuestas en [52]. La fuerza que actúa sobre una partícula magnética, modelada como un pequeño dipolo magnético de momento magnético  $\vec{m}$  sometida a un campo externo  $\vec{B}$ , viene dada por:

$$\vec{F}_m = \vec{m} \times \nabla \times \vec{B}$$

El momento magnético de la partícula viene inducido por el campo magnético externo. En los materiales reales podemos encontrar dos comportamientos claramente diferenciados según la intensidad del gradiente del campo magnético. Si el gradiente del campo magnético es suave, la partícula tiene una magnetización lineal y la fuerza magnética viene dada por la siguiente expresión:

$$\vec{F}_m = \rho_b V_b (\vec{M}_0 \cdot \nabla) \vec{B} + \frac{\chi_b V_b}{\mu_0} (\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B}$$

donde  $\vec{M}_0$  es la magnetización remanente de la partícula,  $\rho_b$  es su densidad,  $V_b$  su volumen y  $\chi_b$  es el coeficiente de susceptibilidad magnética del material del cual está compuesto la partícula. Teniendo en cuenta que siendo la partícula esférica, el vector  $\vec{M}_0$  tenderá a alinearse con el campo magnético externo  $\vec{B}$ , y que el volumen de una esfera es  $V_b = \frac{4}{3}\pi R_b^3$ , se puede calcular la fuerza que ejerce el campo magnético sobre la esfera. En este caso se supone que el campo magnético está producido por un conductor paralelo al microcanal por el que circula una corriente  $I$ . El campo magnético puede calcularse usando la ley de Ampère, obteniendo la siguiente expresión:

$$\vec{B} = \frac{\mu_0 I}{2\pi r} \vec{u}_\theta$$

y por lo tanto la fuerza magnética sobre la partícula:

$$\vec{F}_m = -\frac{2\rho_b M_0 R_b^3 \mu_0 I}{3x^2} - \frac{\chi_b R_b^3 \mu_0 I^2}{3\pi x^3}$$

siendo  $x$  la distancia de la partícula al conductor.

Por último, se debe estudiar la dinámica de la partícula magnética en el transcurso del canal. Como se trata de un canal recto, la partícula sufrirá dos fuerzas, una debida al arrastre del fluido y otra debida al campo magnético. Aplicando la segunda ley de Newton, podemos calcular la trayectoria de la partícula:

$$\frac{4}{3}\pi R_b^3 \rho_b \ddot{x} = \vec{F}_m + \vec{F}_D$$

La fuerza de arrastre se modela con el flujo de Stokes, al igual que se hizo en la Subsección 4.2.1.

$$\vec{F}_D = -6\pi\eta R_b \vec{v}_b$$

donde en este caso se ha llamado  $\eta$  a la viscosidad del fluido para distinguirla de la permeabilidad magnética del medio  $\mu$ .

Simplificando el balance de fuerzas, teniendo en cuenta que la partícula llega rápidamente a su velocidad terminal, el término inicial se anula. La expresión final puede escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{\rho_b M_0 R_b^2 \mu_0 I}{9\pi\eta x^2} - \frac{\chi_b R_b^2 \mu_0 I^2}{18\pi^2 \eta x^3}$$

Se define los coeficientes  $\alpha = -\frac{\rho_b M_0 R_b^2 \mu_0 I}{9\pi\eta}$  y  $\beta = -\frac{\chi_b R_b^2 \mu_0 I^2}{18\pi^2 \eta}$ , se resuelve la ecuación diferencial y se calcula el tiempo necesario para que la partícula se desplace desde una distancia inicial  $a$  al conductor hasta una distancia  $b$ , al que denominaremos tiempo de captura.

$$\frac{dx}{dt} = \alpha x^{-2} + \beta x^{-3}$$

$$t_c = \frac{1}{3\alpha} (b^3 - a^3) - \frac{\beta}{2\alpha^2} (b^2 - a^2) + \frac{\beta^2}{\alpha^3} (b - a) - \frac{\beta^3}{\alpha^4} \log \left( \frac{\alpha b + \beta}{\alpha a + \beta} \right)$$

Finalmente, la longitud del conducto puede calcularse teniendo en cuenta que el tiempo de residencia de la partícula en el microcanal debe ser mayor que el tiempo de captura de la partícula más desfavorable si se quiere obtener un rendimiento de separación del 100% ( $a = W$ ,  $b = R_b$ ).

$$t_r = \frac{L_c}{U_f} \geq t_c \rightarrow L_{min} = \frac{Q_{max}}{A_c} \cdot t_c$$

Para un valor de la corriente de  $800 \text{ mA}$ , una distancia inicial en el caso más desfavorable de  $a = W_c = 100 \mu\text{m}$  y una distancia final de  $b = 5 \mu\text{m}$ , siendo los parámetros de la partícula magnética  $M_0 = 0,05$ ,  $R_b = 2,5 \mu\text{m}$  y  $\chi_b = 0,170$ , el tiempo de captura es de  $t_c = 9 \text{ s}$ . Para lo que se necesita una longitud del canal de separación IMS de:

$$L_{min} = 440,41 \text{ mm}$$

Como la longitud resulta excesiva, se debe disminuir el caudal máximo. Para ello, se realiza una estrechez a la salida del serpentín de la cámara presurizada, aumentando las pérdidas de carga y disminuyendo por tanto el caudal. Se le añade una estrechez de  $3 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ , por lo que el caudal se reduce a  $82,2 \mu\text{L}/\text{min}$ , el tiempo de vaciado sería aproximadamente  $2,43 \text{ min}$  y la longitud del canal sería de  $36,04 \text{ mm}$ .

Parámetro	Valor	Descripción
$H_{s3}$	$200 \mu\text{m}$	Altura del serpentín de la cámara presurizada (3)
$W_{s3}$	$500 \mu\text{m}$	Anchura del serpentín de la cámara presurizada (3)
$R_{s3}$	$12,616 \text{ mm}$	Radio de la cámara presurizada (3)
$L_{s3}$	$2020 \text{ mm}$	Longitud del serpentín de la cámara presurizada (3)
$h_{s3}, w_{s3}$	$3 \times 10 \mu\text{m}$	Estrechez a la salida del serpentín de la cámara (3)
$H_c$	$200 \mu\text{m}$	Altura del canal de separación IMS
$L_c$	$36,04 \text{ mm}$	Longitud del canal de separación IMS
$W_c$	$50 \mu\text{m}$	Anchura del canal de separación IMS
$H_{s4}$	$200 \mu\text{m}$	Altura del serpentín de la cámara presurizada (4,9)
$W_{s4}$	$500 \mu\text{m}$	Anchura del serpentín de la cámara presurizada (4,9)
$R_{s4}$	$6,308 \text{ mm}$	Radio de la cámara presurizada (4,9)
$L_{s4}$	$505 \text{ mm}$	Longitud del serpentín de la cámara presurizada (4,9)

**Tabla 4.2.:** Parámetros geométricos del separador IMS

## 4.4. Diseño del analizador de partículas mediante inmunofluorescencia

El último paso a realizar en el proceso de detección de *Cryptosporidium* en el agua potable es, la detección de éstos mediante el uso de la inmunofluorescencia. El concentrador espiral y el separador IMS diseñado anteriormente nos permite obtener una muestra de  $50\mu l$  de agua con una alta concentración de *Cryptosporidium Parvum*, la cual solamente contiene este tipo de partículas en suspensión ya que el resto fueron descartadas. El pequeño tamaño de la muestra permite la detección por inmunofluorescencia.

El proceso de inmunofluorescencia tradicional, usando el reactivo *Crypto – a – Glo<sup>TM</sup>*, consiste en los siguientes pasos (según el fabricante del producto [53]):

### 1. Preparación de la muestra y secado

Se toma una muestra de agua a analizar de  $50\mu l$  y se le somete a un proceso de secado, quedando únicamente las partículas sobre un portaobjetos. El proceso de secado se puede hacer bien al aire o usando un calentador de portaobjetos, en este caso se debe evitar que el portaobjetos se caliente demasiado. Acto seguido, se puede aplicar un paso de fijación de los patógenos por metanol, aunque este paso no es necesario para que los anticuerpos se fijen correctamente a los patógenos de la muestra.

### 2. Mezcla con *Crypto – a – Glo<sup>TM</sup>*

Acto seguido, se aplica una gota de  $45\mu l$  de *Crypto–a–Glo<sup>TM</sup>* sobre la muestra de las partículas que quedan tras el secado. Dicho reactivo, está compuesto por un anticuerpo que hará que los *Cryptosporidium* sean fluorescentes al ser observados con el microscopio (ver Subsección 3.2.2).

### 3. Incubación

La mezcla obtenida en el paso anterior, es incubada en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante  $40\text{ min}$ , o  $30\text{ min}$  si la temperatura se mantiene controlada a  $37^{\circ}C$ . El uso de tiempos de incubación más largos no tienen efectos perjudiciales sobre el proceso.

### 4. Lavado

Tras la incubación, la muestra es sometida a lavado con una solución salina de

PBS. Para ello, se sumerge el portaobjetos en un vaso de Coplin durante unos 60 s.

##### 5. Mejora del contraste mediante *No – Fade*

Por último, se añade una gota  $45\mu\text{l}$  de *No – Fade* a la muestra, para aumentar el contraste con el fondo, dado que éste brillará menos. Se deja incubar durante un minuto y se vuelve a realizar un lavado en una solución de PBS por un minuto. Este proceso no es necesario, pero es recomendable para aumentar el contraste y hacer más fácil la visualización los patógenos al microscopio fluorescente.

##### 6. Secado

La muestra se vuelve a secar al aire, quedando únicamente de nuevo las partículas.

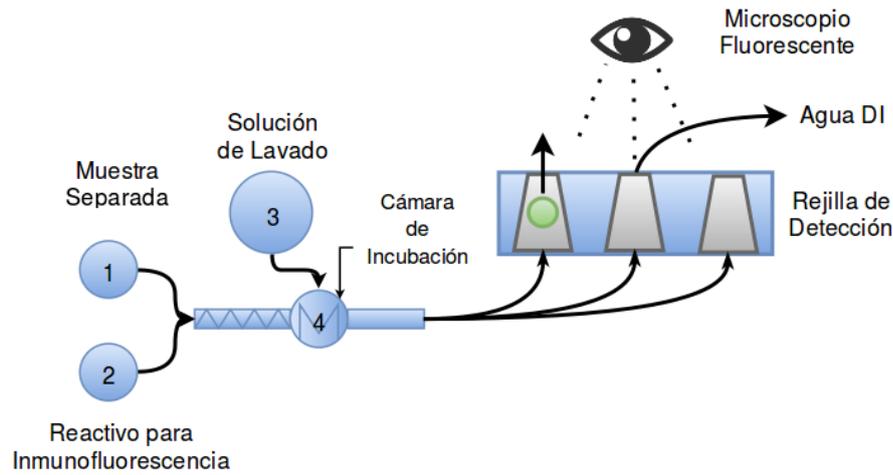
##### 7. Recuento

Se prepara el portaobjetos y el número de ooquistes es contado mediante el uso de un software, usando el microscopio fluorescente para ver los patógenos adheridos al portaobjeto.

Sin embargo en nuestro analizador, el cuál se diseña para que sea automático, sólo se realizarán los pasos de mezclado con *Crypto – a – Glo<sup>TM</sup>* y el posterior incubado y lavado. El resto de pasos no se realizan debido a que anteriormente a la detección se le realiza un proceso de inmunomagnetismo, la muestra está muy concentrada y no existe otro tipo de partículas en suspensión, por lo que no serán necesarios.

El analizador constará de dos cámaras iniciales, una con un volumen de  $45\mu\text{l}$  de *Crypto – a – Glo<sup>TM</sup>* y otra cámara con la muestra de agua concentrada con *Cryptosporidium* ( $50\mu\text{l}$ ) resultante del proceso de inmunomagnetismo. Ambos líquidos al salir de sus respectivas cámaras, se mezclarán en un serpentín hasta acabar en otra cámara en la cual se dejará dicha mezcla incubar durante  $30\text{min}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ . Este flujo sera impulsado por la diferencia de presiones entre la cámara destino y las cámaras iniciales. La cámara destino estará inicialmente al vacío[54] lo que propiciará la entrada de los líquidos tras la rotura de una válvula de un solo uso.

Tras la incubación, se expulsará el líquido de dicha cámara impulsándolo mediante una solución salina PBS de  $200\mu\text{l}$  para realizar la fase de lavado. Esta fase de lavado, trata de hacer pasar dicha mezcla de líquidos resultantes, tras la apertura de la cámara, a través de una rejilla formada por agujeros cónicos. Dichos agujeros tienen



**Figura 4.6.:** Proceso de detección por inmunofluorescencia en un Lab-on-a-Chip

de diámetro de entrada  $10\mu m$  y de diámetro de salida  $2\mu m$ , quedando los Cryptos atrapados y dejando pasar el agua a través de dicho agujero. Ver Figura 4.6.

La rejilla por la que se verán atrapados los Cryptos, constarán de 100 agujeros cónicos dispuestos ( $10 \times 10$ ) en una placa de  $SU-8$  de dimensiones  $10mm \times 20mm \times 5\mu m$ . La distancia entre cada cavidad es de  $30\mu m$ . Ver Figura 4.7.

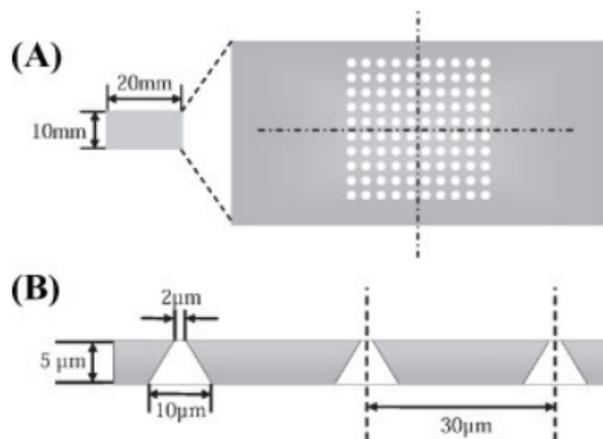
El diseño de dicho circuito microfluídico se realiza del mismo modo que el separador IMS usando la siguiente expresión derivada de la ecuación de los gases de Boyle-Mariotte.

$$V_0 = \frac{P_2 \cdot V_f}{P_0}, \quad L_s \geq s_{max} = \frac{V_f}{A_s}$$

Acto seguido, un microscopio fluorescente se usará para observar la rejilla a través de una pared transparente del Lab-on-a-Chip y un software realizará el recuento de las partículas atrapadas. Como se vio en el apartado anterior, un recuento superior a 81 ooquistes en la muestra concentrada implica un riesgo para la salud pública, por lo que se generará la alerta pertinente dado el caso.

Recopilación de las técnicas utilizadas para la detección de *Cryptosporidium*.

- Diseño de un separador de partículas según su tamaño, integrado en un Lab-on-a-Chip.
- Diseño de un separador de *Cryptosporidium* por IMS, integrado en un Lab-on-a-Chip.



**Figura 4.7.:** Representación de la rejilla de SU-8. A) Dimensiones de la placa de SU-8 y distribución de los orificios. B) Dimensiones y forma de los orificios.

- Diseño de un analizador de *Cryptosporidium*, integrado en un Lab-on-a-Chip.
- Diseño de las correspondientes máscaras fotolitográficas asociadas a los dos separadores y al analizador diseñado.

Parámetro	Valor	Descripción
$H_{s3}$	$200 \mu m$	Altura del serpentín de la cámara presurizada (3)
$W_{s3}$	$500 \mu m$	Anchura del serpentín de la cámara presurizada (3)
$R_{s3}$	$12,616 mm$	Radio de la cámara presurizada (3)
$L_{s3}$	$2020 mm$	Longitud del serpentín de la cámara presurizada (3)
$N_a$	100	Número de agujeros de la rejilla detectora
$d_{cav}$	$30 \mu m$	Distancia entre agujeros de la rejilla detectora
$H_a$	$5 \mu m$	Altura de los agujeros de la rejilla detectora
$D_e$	$10 \mu m$	Diámetro de entrada de los agujeros de la rejilla detectora
$D_s$	$2 \mu m$	Diámetro de salida de los agujeros de la rejilla detectora
$W_r$	$10 mm$	Anchura de la rejilla detectora
$L_r$	$20 mm$	Longitud de la rejilla detectora

**Tabla 4.3.:** Parámetros geométricos del analizador

## 4.5. Integración

En este capítulo se ha diseñado la geometría de un analizador de *Cryptosporidium Parvum* en un Lab-on-a-Chip, el cual cuenta de tres etapas bien diferenciadas: la concentración de partículas, la separación de los patógenos y la detección de éstos.

En esta sección se discutirá la interacción entre cada subsistema y como se integran para formar el sistema de análisis completo del agua potable.

Debido a que la etapa de concentración no usa ningún tipo de reactivo y por lo tanto ningún sistema de cámaras presurizadas, este subsistema es completamente pasivo y por lo tanto reutilizable. Tiene sentido pensar que por lo tanto, el concentrador de partículas se producirá usando un microsistema independiente al analítico para reducir el coste por muestra de cada análisis, ya que este último si es desechable. Además, el proceso de separación espiral necesita de una presión y unos valores del número de Reynolds elevados por lo que necesitará de materiales más resistentes que el sistema de análisis (ej: PMMA).

Durante el diseño se seleccionó 16 separadores espirales para disminuir el tiempo de concentración. Éstos serán integrados en grupos de 4 espirales por placa. Las placas se diseñaran de manera que se puedan apilar unas encima de otras interconectando las salidas y las entradas del separador verticalmente mediante orificios circulares producidos por un taladro. Las conexiones con el resto de subsistemas, como el volumen de entrada de la muestra o el sistema de análisis se hacen mediante tubos semirrígidos.

El sistema de análisis compuesto por el separador IMS y el sistema de detección por inmunofluorescencia se integrarán en un mismo microsistema desechable. Ésto se debe a que los reactivos se encuentran en cámaras presurizadas de un sólo uso y además la rejilla de detección con agujeros cónicos solo puede ser usada una sola vez ya que los patógenos quedan atrapados en ella y son difíciles de eliminar. Ésto podría producir falsos positivos en pruebas posteriores si se reutilizara. Cada análisis por tanto, se realiza con un microsistema nuevo el cual puede ser integrado en una tarjeta de análisis, las cuales se irán desechando y reponiendo a medida que vayan gastándose.

Finalmente, se realizaron un conjunto de máscaras en las que se detallan las dimensiones de cada una de las partes del sistema. Estas máscaras aunque están muy cercanas a poder ser utilizadas para la fabricación deberán ser modificadas según el tipo de tecnología usada para la fabricación (SU-8, PMMA,...). Su objetivo es por tanto, almacenar las dimensiones de cada una de las partes del sistema y no tanto el poder producir el sistema a partir de ellas. Los detalles de las máscaras pueden ser consultados en Sección A.2 y en los archivos adjuntos a este proyecto en formato de *LEdit(v8,30)*.

## 5. Conclusiones

El desarrollo de un Lab-on-a-Chip completo es una tarea multidisciplinar exigente que implica el diseño en distintos campos, hasta completar el dispositivo completo. En este caso, se trata de la miniaturización de un protocolo de laboratorio. Este desarrollo contempla, entre otros, áreas de mecánica (microfluídica), tecnologías de fabricación, integración de sensores y actuadores, así como electrónica y control. Dependiendo de Lab-on-a-Chip puede haber implicado más campos, como por ejemplo, diseño de dispositivos magnéticos u ópticos. En general, se trata de un trabajo de ingeniería completo que relaciona muchos conceptos.

Con este proyecto se ha querido llevar a cabo una mejora del método de detección de *Cryptosporidium* en el agua potable, y una posible sustitución del método tradicional por el descrito en este proyecto debido a que se conseguiría ahorrar de tiempo y dinero. Estas ventajas son conseguidas por el uso de técnicas basadas en microsistemas. A continuación, se exponen dichas ventajas:

- **Tiempo de análisis:** El proceso completo de análisis según se ha diseñado tardaría aproximadamente:  $2h\ 5min = 22min + 1h\ 13min + 30min$ , frente a las  $9h\ 45min$  del proceso tradicional. Ésto no sólo disminuye el costo del proceso sino que lo hace más eficaz a la hora de prevenir posibles daños que la presencia de estos patógenos acarrea en la salud pública. Al ser el tiempo de análisis menor, el tiempo de actuación de las autoridades competentes del abastecimiento de agua se verá reducido también, pudiendo poner en marcha un plan de contingencia más rápidamente.
- **Automatización:** El proceso diseñado está pensado para funcionar de manera autónoma. Sólo será necesario la carga de la muestra inicial de  $900\ ml$  en el analizador (lo cual se puede automatizar también). Acto seguido, el proceso dará comienzo y pasado el tiempo necesario para el análisis, el sistema de control dará la concentración final de patógenos en el agua, pudiendo incluso mandarse alertas a los puntos donde sea requerido. Ésto supone una

gran ventaja sobre el método usado actualmente, el cual necesita de costoso equipamiento (microscopio fluorescente, centrifugadora, laboratorio biológico de nivel de contención 2,...) y de mano de obra especializada.

- **Costo de los reactivos:** El proceso tradicional utiliza unos tamaños de muestra mucho mayores que el proceso diseñado en este proyecto, por lo que el precio unitario por análisis debido a los reactivos es mayor.

Al inicio de este proyecto se definió un conjunto de objetivos los cuales se han ido abordando durante el desarrollo de éste. A continuación, se detallan dichos objetivos y las partes del trabajo donde se desarrollan:

- Recopilación de las técnicas utilizadas para la detección de *Cryptosporidium* (Capítulo 2).
- Diseño de un separador de partículas según su tamaño, integrado en un Lab-on-a-Chip (Sección 4.2).
- Diseño de un separador de *Cryptosporidium* por IMS, integrado en un Lab-on-a-Chip (Sección 4.3).
- Diseño de un analizador de *Cryptosporidium*, integrado en un Lab-on-a-Chip (Sección 4.4).
- Diseño de las correspondientes máscaras fotolitográficas asociadas a los dos separadores y al analizador diseñado (Sección A.2).

## 6. Trabajos futuros

Aunque el trabajo de diseño del sistema completo es extenso, aún queda un largo trabajo hasta el diseño del proceso de fabricación y su comercialización. A continuación, se enumeran los puntos más importantes:

- Integración de un sistema de bombeo microfluídico en el microsistema de concentrador espiral. Las microbombas mejorarán el rendimiento del concentrador, ya que poseen un volumen muerto mucho menor que una bomba convencional.
- Realizar simulaciones mediante elementos finitos tanto del concentrador espiral como del separador IMS para validar el diseño, mejorar sus prestaciones o poder optimizar sus dimensiones.
- Realizar una serie de experimentos para determinar los valores del coeficiente de descarga de las válvulas de las cámaras presurizadas, así como otros parámetros que afectan al diseño.
- Fabricación con técnicas de microsistemas basadas en polímeros como SU-8 o PMMA de los subsistemas que componen el proyecto.
- Elección de la tecnología de fabricación para el desarrollo del Lab-on-a-Chip.
- Pruebas de laboratorio: Caracterización experimental para comparación con la teoría.
- Diseño de un proceso de fabricación a media o gran escala para su puesta en comercialización.
- Diseño de circuito electrónico de control de apertura de válvulas y de sensado.



# A. Apéndice

## A.1. Régimen de Hagen–Poiseuille ( $2D$ )

El régimen de Hagen–Poiseuille se caracteriza por ser un régimen de flujo estacionario donde las fuerzas producidas por la viscosidad son dominantes frente a las fuerzas convectivas. El flujo se produce, en el caso  $2D$ , entre dos planos infinitos en reposo frente al marco de referencia inercial. La ecuaciones de Navier-Stokes para este caso se simplifica como sigue:

$$0 = -\frac{dP(x)}{dx} + \mu \frac{d^2u(y)}{d^2y}$$

Integrando la ecuación entre  $x = 0$  e  $x = L$  y sabiendo que las condiciones de contorno a la entrada y a la salida son  $P(0) = P_0$ ,  $P(L) = P_1$ . Obtenemos:

$$\int_0^L \frac{dP(x)}{dx} dx = \int_0^L \mu \frac{d^2u(y)}{d^2y} dx$$

$$P_1 - P_0 = \mu \frac{d^2u(y)}{d^2y} L$$

$$-\frac{\Delta P}{L} = \mu \frac{d^2u(y)}{d^2y}$$

Acto seguido, se integra con respecto a  $y$  teniendo en cuenta que los planos que contienen al fluido imponen unas condiciones de contorno  $v\left(\frac{H}{2}\right) = 0, v\left(-\frac{H}{2}\right) = 0$ , llegando a la siguiente expresión:

$$-\frac{\Delta P}{L} = \mu \frac{d^2u(y)}{d^2y}$$

$$u(y) = -\frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} y^2 + c_1 \cdot y + c_2$$

$$u\left(\frac{H}{2}\right) = -\frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left(\frac{H}{2}\right)^2 + c_1 \cdot \frac{H}{2} + c_2 = 0$$

$$u\left(-\frac{H}{2}\right) = -\frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left(\frac{H}{2}\right)^2 - c_1 \cdot \frac{H}{2} + c_2 = 0$$

restando la segunda expresión a la primera, obtenemos la expresión para  $c_1$ :

$$2 \cdot c_1 \cdot \frac{H}{2} = 0 \rightarrow c_1 = 0$$

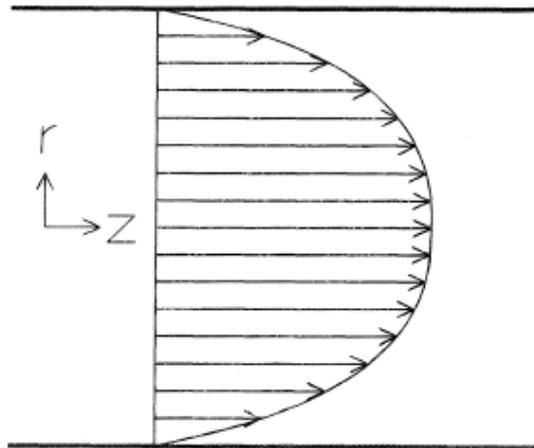
y por lo tanto:

$$-\frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left(\frac{H}{2}\right)^2 + c_2 = 0 \rightarrow c_2 = \frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left(\frac{H}{2}\right)^2$$

Finalmente, podemos obtener una expresión para el perfil de velocidades (ver Figura A.1):

$$u(y) = -\frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} y^2 + \frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left(\frac{H}{2}\right)^2$$

$$u(y) = \frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left( \left(\frac{H}{2}\right)^2 - y^2 \right)$$



**Figura A.1.:** Perfil de velocidades en un régimen de Hagen–Poiseuille ( $2D$ )

El perfil de velocidades es un perfil parabólico que se anula en los extremos debido

a las condiciones de contorno, teniendo su máximo en el centro del canal  $y = 0$ .

$$u_{max} = \frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left(\frac{H}{2}\right)^2 = \frac{\Delta P \cdot H^2}{8\mu L}$$

Otra expresión importante es la de la velocidad media. La cual se puede calcular como sigue:

$$\begin{aligned} U_f &= \frac{1}{H} \int_{-\frac{H}{2}}^{\frac{H}{2}} u(y) dy = \frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left( \left(\frac{H}{2}\right)^2 - \frac{1}{H} \int_{-\frac{H}{2}}^{\frac{H}{2}} y^2 dy \right) = \\ &= \frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left( \left(\frac{H}{2}\right)^2 - \frac{1}{H} \left[ \frac{y^3}{3} \right]_{-\frac{H}{2}}^{\frac{H}{2}} \right) = \frac{1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left( \frac{3H^2}{12} - \frac{H^2}{12} \right) = \\ &= \frac{H^2}{12\mu} \frac{\Delta P}{L} \end{aligned}$$

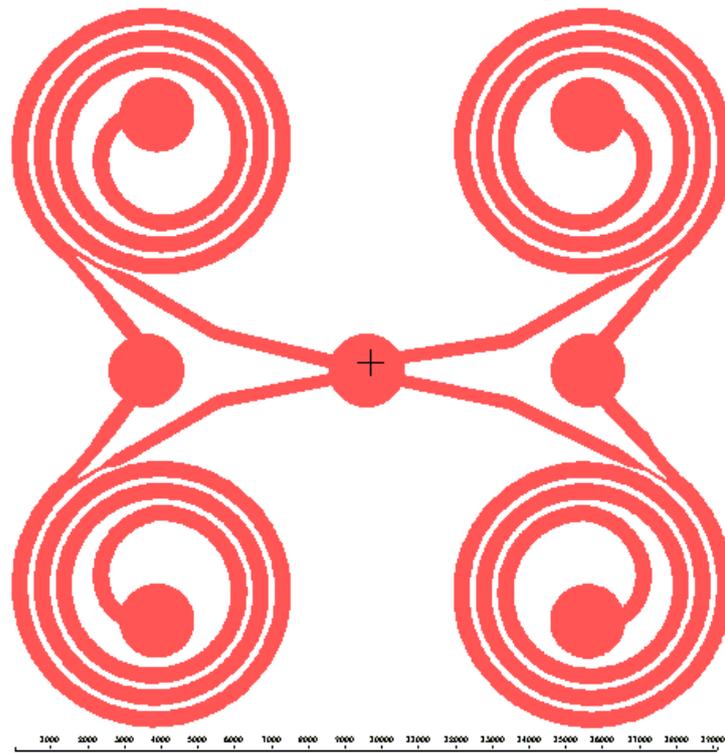
y por lo tanto, el caudal se puede calcular simplemente multiplicando el flujo medio por el área.

## A.2. Máscaras (LEdit)

### A.2.1. Microsistema de concentración



Figura A.2.: Máscara de un separador espiral ( $\mu m$ )



**Figura A.3.:** Máscara de un grupo de 4 separadores espirales ( $\mu m$ )

### A.2.2. Microsistema de análisis

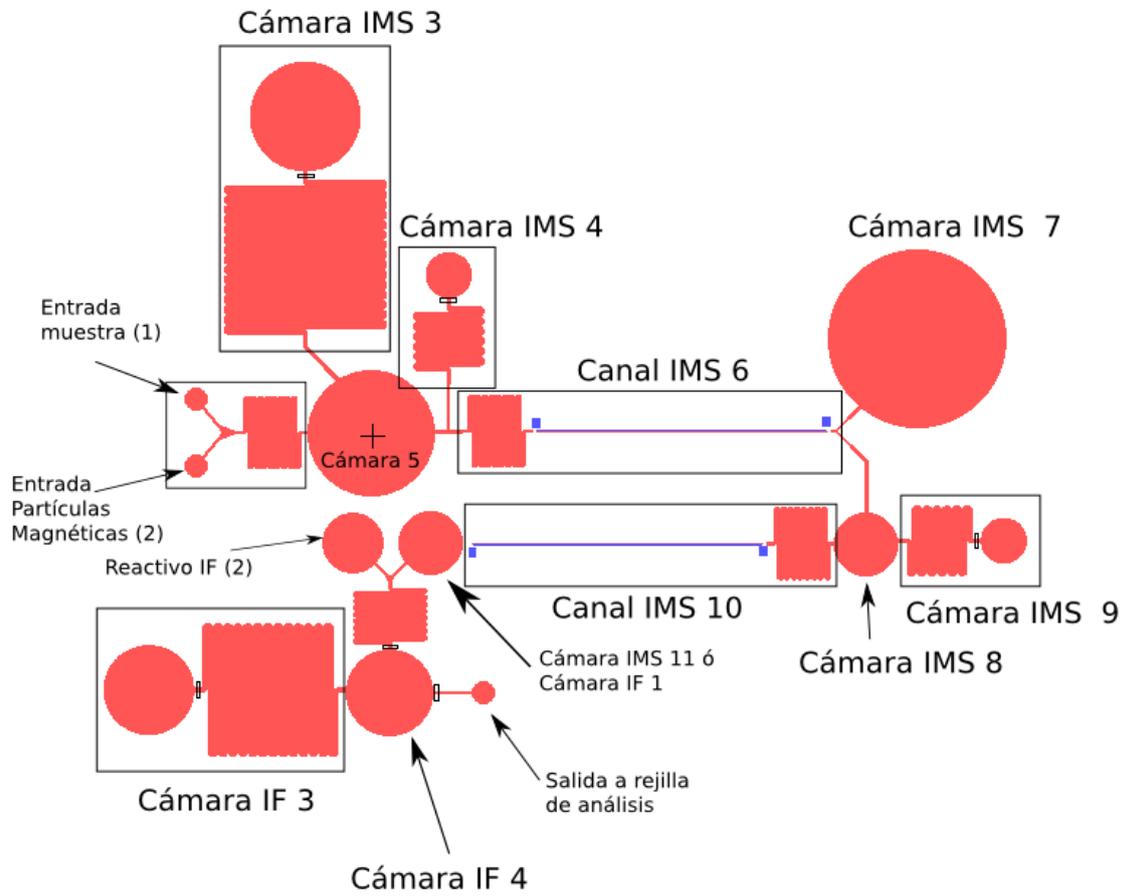


Figura A.4.: Máscara del sistema completo ( $\mu m$ )

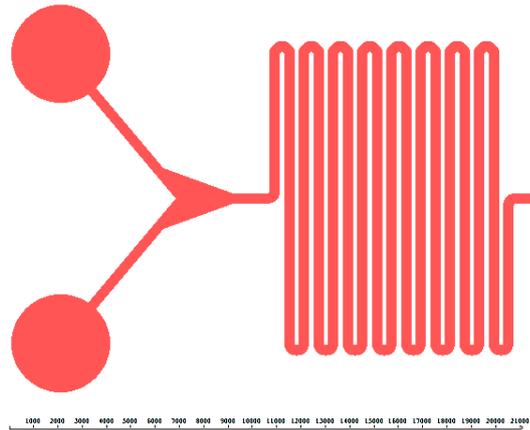


Figura A.5.: Máscara de un mezclador en serpentin ( $\mu m$ )

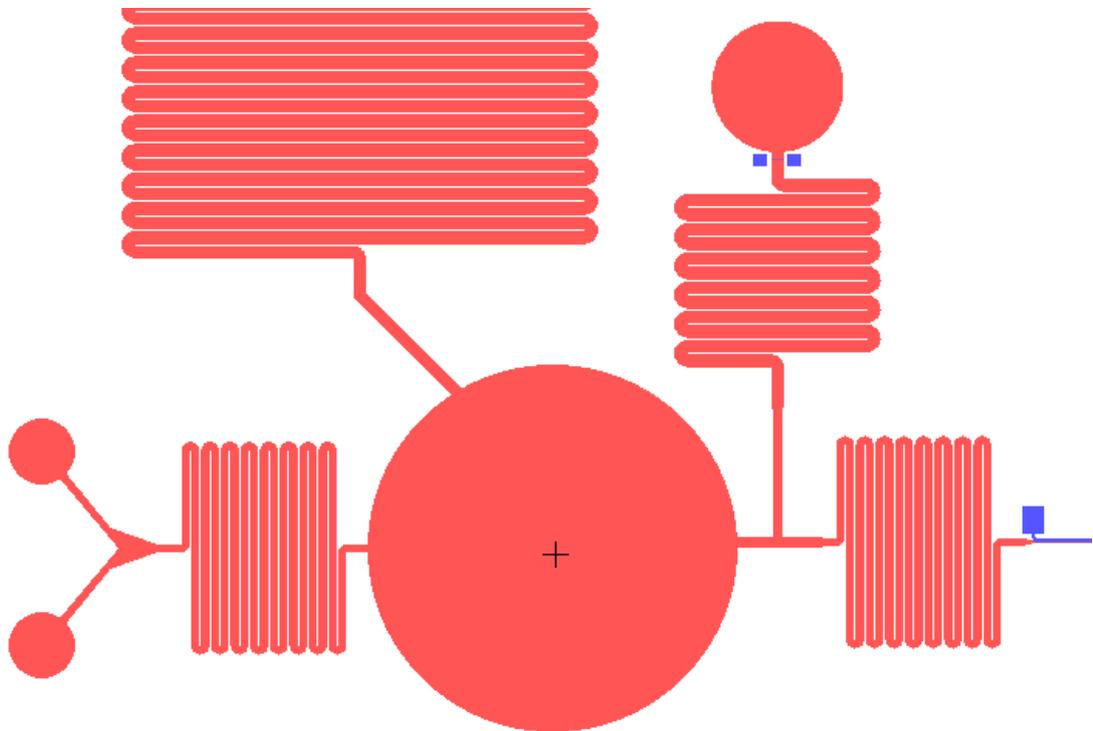
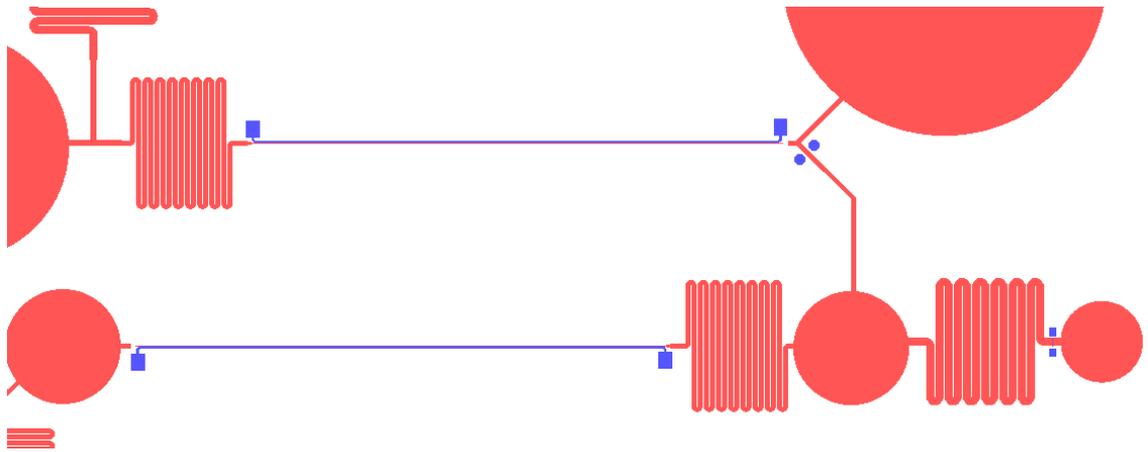


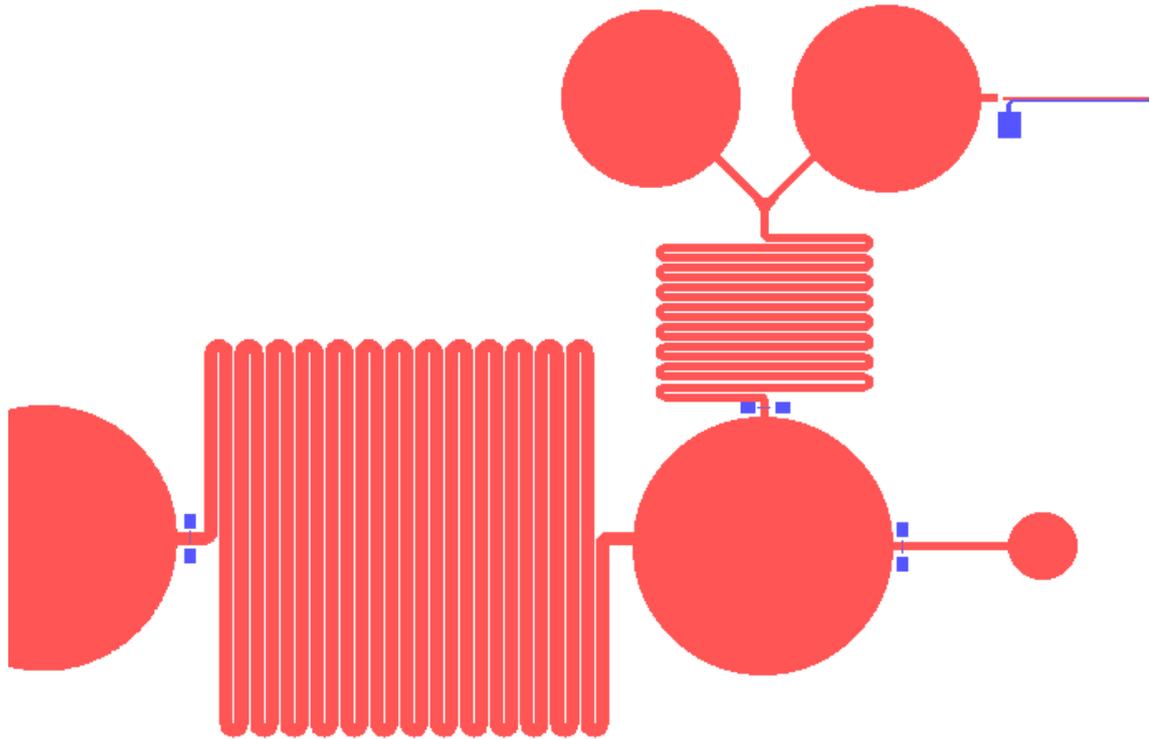
Figura A.6.: Máscara de la primera etapa de IMS ( $\mu m$ )



**Figura A.7.:** Máscara de la primera etapa IMS (II) ( $\mu m$ )



**Figura A.8.:** Máscara de la segunda etapa IMS ( $\mu m$ )



**Figura A.9.:** Máscara de la etapa de inmunofluorescencia ( $\mu m$ )

## A.3. Propiedades termodinámicas

### A.3.1. Propiedades del agua

$T$ (°C)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$c_p$ (kJ/kg·K)	$\mu \cdot 10^6$ (N·s/m <sup>2</sup> )	$\nu \cdot 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	$k \cdot 10^3$ (W/m·K)	$\alpha \cdot 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	$\beta \cdot 10^3$ (1/K)	$Pr$
0	1005.0	4213	1766.0	1.7570	567.2	0.1339	-0.08021	13120
5	1004.0	4201	1506.0	1.5000	574.8	0.1363	0.01135	11000
10	1003.0	4191	1300.0	1.2970	583.0	0.1387	0.08744	9348
15	1001.0	4184	1135.0	1.1340	591.4	0.1412	0.15230	8033
20	999.5	4180	1001.0	1.0010	599.8	0.1436	0.20900	6975
25	997.9	4176	890.1	0.8920	608.0	0.1459	0.25940	6114
30	996.2	4175	797.6	0.8007	616.0	0.1481	0.30510	5406
35	994.3	4174	719.6	0.7238	623.6	0.1503	0.34700	4817
40	992.4	4174	653.3	0.6583	630.7	0.1523	0.38590	4323
45	990.3	4175	596.3	0.6022	637.4	0.1542	0.42250	3906
50	988.1	4177	547.1	0.5537	643.6	0.1559	0.45720	3551
55	985.7	4179	504.2	0.5115	649.3	0.1576	0.49030	3245
60	983.2	4182	466.6	0.4746	654.4	0.1592	0.52210	2981
65	980.6	4184	433.5	0.4420	659.1	0.1606	0.55280	2752
70	977.9	4188	404.1	0.4132	663.2	0.1620	0.58270	2551
75	975.0	4191	378.0	0.3877	666.9	0.1632	0.61180	2375
80	971.9	4195	354.6	0.3648	670.2	0.1644	0.64020	2219
85	968.8	4199	333.6	0.3443	673.0	0.1654	0.66820	2081
90	965.5	4204	314.6	0.3259	675.5	0.1664	0.69580	1958
95	962.1	4209	297.5	0.3092	677.5	0.1673	0.72300	1848
100	958.5	4214	281.9	0.2941	679.3	0.1682	0.75010	1749

**Tabla A.1.:** Propiedades del agua líquida a presión atmosférica

### A.3.2. Propiedades del aire seco

$T$ (°C)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$c_p$ (kJ/kg·K)	$\mu \cdot 10^6$ (N·s/m <sup>2</sup> )	$\nu \cdot 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	$k \cdot 10^3$ (W/m·K)	$\alpha \cdot 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	$Pr$
-150	2.8670	982	8.64	3.01	11.71	4.16	0.7246
-100	2.0390	965	11.90	5.83	15.82	8.03	0.7263
-90	1.9270	975	12.49	6.48	16.62	8.84	0.7330
-80	1.8280	983	13.07	7.15	17.42	9.69	0.7381
-70	1.7380	990	13.64	7.85	18.22	10.59	0.7414
-60	1.6560	995	14.20	8.57	19.01	11.53	0.7433
-50	1.5820	999	14.74	9.32	19.79	12.52	0.7440
-40	1.5140	1002	15.27	10.08	20.57	13.56	0.7436
-30	1.4520	1004	15.79	10.88	21.34	14.65	0.7425
-20	1.3940	1005	16.30	11.69	22.11	15.78	0.7408
-10	1.3410	1006	16.80	12.52	22.88	16.96	0.7387
0	1.2920	1006	17.29	13.38	23.64	18.17	0.7362
5	1.2690	1006	17.54	13.82	24.01	18.80	0.7350
10	1.2470	1006	17.78	14.26	24.39	19.44	0.7336
15	1.2250	1007	18.02	14.71	24.76	20.08	0.7323
20	1.2040	1007	18.25	15.16	25.14	20.74	0.7309
25	1.1840	1007	18.49	15.61	25.51	21.40	0.7296
30	1.1640	1007	18.72	16.08	25.88	22.08	0.7282
35	1.1460	1007	18.95	16.54	26.25	22.76	0.7268
40	1.1170	1007	19.18	17.02	26.62	23.45	0.7255
45	1.1100	1007	19.41	17.49	26.99	24.16	0.7241
50	1.0920	1007	19.63	17.97	27.35	24.87	0.7228
55	1.0760	1007	19.86	18.46	27.72	25.59	0.7215
60	1.0600	1007	20.08	18.95	28.08	26.31	0.7202
65	1.0440	1007	20.30	19.45	28.45	27.05	0.7190
70	1.0290	1007	20.52	19.95	28.81	27.79	0.7177
75	1.0140	1008	20.74	20.45	29.17	28.55	0.7166
80	0.9990	1008	20.96	20.97	29.53	29.31	0.7154
85	0.9860	1008	21.17	21.48	29.88	30.07	0.7143
90	0.9720	1008	21.39	22.00	30.24	30.85	0.7132
95	0.9590	1009	21.60	22.52	30.60	31.63	0.7121
100	0.9460	1009	21.81	23.05	30.95	32.42	0.7111

Tabla A.2.: Propiedades del aire seco a presión atmosférica

### A.3 Propiedades termodinámicas

$T$ (°C)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$c_p$ (kJ/kg·K)	$\mu \cdot 10^6$ (N·s/m <sup>2</sup> )	$\nu \cdot 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	$k \cdot 10^3$ (W/m·K)	$\alpha \cdot 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	$Pr$
100	0.9460	1009	21.81	23.05	30.95	32.42	0.7111
110	0.9210	1010	22.23	24.12	31.65	34.02	0.7092
120	0.8980	1011	22.64	25.21	32.35	35.64	0.7073
130	0.8760	1012	23.05	26.32	33.05	37.30	0.7057
140	0.8540	1013	23.45	27.44	33.74	38.98	0.7041
150	0.8340	1014	23.85	28.59	34.43	40.68	0.7027
160	0.8150	1016	24.24	29.74	35.11	42.40	0.7014
170	0.7970	1017	24.63	30.92	35.79	44.15	0.7003
180	0.7790	1019	25.01	32.11	36.46	45.92	0.6992
190	0.7620	1021	25.39	33.32	37.13	47.71	0.6983
200	0.7460	1023	25.77	34.54	37.79	49.53	0.6974
210	0.7306	1025	26.14	35.78	38.45	51.36	0.6967
220	0.7158	1027	26.51	37.04	39.10	53.21	0.6960
230	0.7016	1029	26.88	38.31	39.75	55.08	0.6955
240	0.6879	1031	27.24	39.60	40.40	56.97	0.6950
250	0.6748	1033	27.60	40.90	41.04	58.88	0.6946
260	0.6621	1035	27.95	42.22	41.67	60.81	0.6942
270	0.6499	1037	28.30	43.55	42.31	62.75	0.6940
280	0.6382	1040	28.65	44.90	42.93	64.72	0.6938
290	0.6269	1042	29.00	46.26	43.56	66.69	0.6936
300	0.6159	1044	29.34	47.64	44.18	68.69	0.6935
310	0.6054	1047	29.68	49.03	44.79	70.70	0.6934
320	0.5951	1049	30.01	50.43	45.40	72.73	0.6934
330	0.5853	1051	30.35	51.85	46.01	74.77	0.6935
340	0.5757	1054	30.68	53.29	46.61	76.83	0.6936
350	0.5665	1056	31.01	54.73	47.21	78.90	0.6937
360	0.5576	1059	31.33	56.19	47.81	80.99	0.6938
370	0.5489	1061	31.65	57.67	48.40	83.09	0.6940
380	0.5405	1064	31.97	59.16	48.99	85.21	0.6943
390	0.5323	1066	32.29	60.66	49.57	87.34	0.6945

**Tabla A.3.:** Propiedades del aire seco a presión atmosférica (continuación 1)

$T$ (°C)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$c_p$ (kJ/kg·K)	$\mu \cdot 10^6$ (N·s/m <sup>2</sup> )	$\nu \cdot 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	$k \cdot 10^3$ (W/m·K)	$\alpha \cdot 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	$Pr$
400	0.5244	1069	32.61	62.18	50.15	89.49	0.6948
410	0.5167	1071	32.92	63.71	50.72	91.65	0.6951
420	0.5093	1073	33.23	65.25	51.29	93.83	0.6954
430	0.5020	1076	33.54	66.80	51.86	96.02	0.6957
440	0.4950	1078	33.84	68.37	52.42	98.22	0.6961
450	0.4882	1081	34.15	69.95	52.98	100.4	0.6965
460	0.4815	1083	34.45	71.54	53.54	102.7	0.6969
470	0.4750	1085	34.75	73.15	54.09	104.9	0.6973
480	0.4687	1088	35.04	74.77	54.64	107.2	0.6977
490	0.4626	1090	35.34	76.40	55.18	109.4	0.6982
500	0.4566	1093	35.63	78.04	55.72	111.7	0.6986
550	0.4289	1104	37.07	86.44	58.37	123.3	0.7011
600	0.4043	1115	38.46	95.12	60.93	135.2	0.7037
650	0.3824	1125	39.81	104.1	63.41	147.4	0.7064
700	0.3628	1135	41.11	113.3	65.81	159.8	0.7092
750	0.3450	1145	42.39	122.8	68.12	172.5	0.7121
800	0.3290	1153	43.62	132.6	70.37	185.5	0.7149
850	0.3143	1162	44.83	142.6	72.54	198.7	0.7178
900	0.3009	1169	46.00	152.9	74.65	212.2	0.7206
950	0.2886	1177	47.15	163.4	76.70	225.8	0.7233
1000	0.2773	1184	48.26	174.1	78.68	239.8	0.7260
1100	0.2571	1196	50.42	196.1	82.48	268.2	0.7312
1200	0.2396	1207	52.48	219.0	86.09	297.6	0.7360
1400	0.2110	1226	56.35	267.1	92.81	358.8	0.7444
1600	0.1885	1241	59.92	317.9	99.08	423.6	0.7506
1800	0.1703	1253	63.22	371.3	105.10	492.5	0.7539
2000	0.1553	1264	66.30	426.9	111.10	566.2	0.7539

**Tabla A.4.:** Propiedades del aire seco a presión atmosférica (Continuación 2)

## A.4. Código Matlab

### A.4.1. Diseño del separador de partículas en espiral

```

1 close all; clear all; clc
2
3 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
4 % Diseño dimensional
5 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
6
7 ap = 5e-6;           % Diametro de la particula
8 mu = 8.91e-4;       % Viscosidad del agua
9 rho = 999.97;       % Densidad del agua
10 Cl = 0.5;           %
11 De = 10;            % Numero de Dean
12 Re = 110;           % Numero de Reynolds
13 Pmax = 2.2*101.325e3; % Presion de impulsion
14
15 H = 68e-6;          % Altura del canal espiral
16 W = 400e-6;         % Anchura del canal espiral
17 L = 66e-3;          % Longitud del canal espiral
18
19 Hmax = ap/0.07;     % Altura maxima del canal
20 uf = mu*Re/(rho*H); % Velocidad media del flujo
21 R = 0.5*H*(Re/De)^2; % Radio de curvatura deseado
22 Wmax = (rho*Cl*Pmax*ap^3/(9*pi*mu^2)); % Anchura maxima del canal
23 Lmax = (Pmax*H^2/(12*mu*uf)); % Logitud maxima del canal
24 Lmin = 3*pi*W*mu*(H)^2/(4*rho*Cl*uf*ap^3); % Longitud minima del canal
25 Q = W*H*uf;        % Caudal
26
27 fprintf('H: %f < %f um',H*1e6,Hmax*1e6);
28 if H>Hmax
29     fprintf(' - ERROR!\n');
30 else
31     fprintf(' - OK!\n');
32 end
33 fprintf('Uf: %f m/s\n',uf);
34 fprintf('R: %f mm\n',R*1e3);
35 fprintf('W: %f < %f um',W*1e6,Wmax*1e6);
36 if W>Wmax

```

```

37     fprintf(' - ERROR!\n');
38 else
39     fprintf(' - OK!\n');
40 end
41 fprintf('L: %f < %f < %f mm',Lmin*1e3,L*1e3,Lmax*1e3);
42 if L>Lmax || L<Lmin
43     fprintf(' - ERROR!\n');
44 else
45     fprintf(' - OK!\n');
46 end
47 fprintf('Q: %f uL/s\n',Q*1e3*1e6);
48 fprintf('\n');
49
50 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
51 % Diseno geométrico
52 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
53
54 rin = 1e-3;
55
56 t = 200e-6;
57 b = (W + t)/(2*pi);
58 % Paso 1
59 tmax = (2*pi*R^2/2/L-W);
60
61 a1 = R;
62 N1 = (-a1+sqrt(a1^2+2*b*L))/(2*pi*b);
63 Rc1 = ((a1+2*pi*N1*b)^2+b^2)^1.5/(2*b^2+(a1+2*pi*N1*b)^2);
64 % Paso 2
65 a2 = sqrt(R^2 - 2*b*L);
66 N2 = (-a2+sqrt(a2^2+2*b*L))/(2*pi*b);
67 Rc2 = ((a2+2*pi*N2*b)^2+b^2)^1.5/(2*b^2+(a2+2*pi*N2*b)^2);
68 De_ex = Re*sqrt(H/2/Rc2);
69
70 fprintf('t: %f < %f um\n',t*1e6,tmax*1e6);
71 fprintf('b: %f um/rad\n',b*1e6);
72 fprintf('a1: %f mm\n',a1*1e3);
73 fprintf('N1: %f\n',N1);
74 fprintf('Rc1: %f mm\n',Rc1*1e3);
75 fprintf('a2: %f mm\n',a2*1e3);
76 fprintf('N2: %f\n',N2);
77 fprintf('Rc2: %f mm\n',Rc2*1e3);
78 fprintf('De_ex: %f\n',De_ex);

```

```

79 fprintf('\n');
80
81 plotSpiral('./LEdit/spiral/cmdspiral.tco',N2,a2,b,0,W,rin,pi,0.2);
82
83 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
84 % Diseño de la recirculacion
85 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
86
87 V0 = 200*1e-9; %ul % Volumen final deseado
88 Vi = 600*1e-6; %ml % Volumen inicial a analizar
89 n = 16; % Numero de separadores en paralelo
90 Qr = n*Q; % Caudal total por los separadores
91 Qi1 = Q;
92 alpha = 0.2; % Ratio de recirculacion
93 RR = 0.9999; % Ratio de recuperacion
94 Ci = 100/Vi;
95
96 t1 = V0/Qi1;
97 Cr2max = (1-alpha)*Ci/(1-RR);
98 tau = V0/(1-RR)/Qr;
99 Qi2 = (1-alpha)*Qr;
100 t2min = Vi/Qi2;
101 t2 = t2min;
102 Cr2 = Cr2max + (Ci-Cr2max)*exp(-t2/tau);
103 N2 = Cr2*V0;
104 RRef2 = (V0*Cr2)/((V0 + t2*Qi2)*Ci);
105
106 fprintf('Ci: %f 1/ul\n',Ci*1e-9);
107 fprintf('t1: %f min\n',t1/60);
108 fprintf('Qi2 %f ul/s\n',Qi2*1e9);
109 fprintf('Cr2(inf): %f 1/ul\n',Cr2max*1e-9);
110 fprintf('tau: %f min\n',tau/60)
111 fprintf('t2: [%f, %f] < %f min',t2min/60,3*tau/60,t2/60)
112 if ~(t2 >= t2min && t2 <= 3*tau)
113     fprintf(' - ERROR!\n');
114 else
115     fprintf(' - OK!\n');
116 end
117 fprintf('Cr2: %f 1/ul\n',Cr2*1e-9);
118 fprintf('N2: %f\n',N2);
119 fprintf('RRef2: %f %%\n',RRef2*100);
120 fprintf('\n');

```

## A.4.2. Diseño del separador por inmunomagnetismo

```

1 close all; clear all; clc
2
3 %%%%%%%%%%%
4 % Diseño del sistema de separacion IMS
5 %%%%%%%%%%%
6
7 muf = 8.91e-4;           % Viscosidad del agua
8 rhof = 1000;           % Densidad del agua
9 mu0 = 4*pi*1e-7;       % Permeabilidad del vaio
10 gamma = 1.4;          % Coeficiente de expansion adibatico del aire
11 P2 = 1*101.325e3;      % Presion ambiente
12 rhob = 1089;           % Densidad de las particulas magneticas
13 xib = 0.170;          % Permeabilidad realtiva de las particulas magneticas
14 M0 = 0.05;            % Magnetizacion remanente de las particulas magneticas
15 Rb = 2.5e-6; %um      % Radio de las particulas magneticas D = 4um
16
17 I = 800e-3; % mA       % Corriente por el electroiman
18 Hs = 500e-6; % um     % Altura del serpentín
19 Ws = 700e-6; % um     % Anchura del serpentín
20 Vf = 300e-9; % uL     % Volumen de liquido en el serpentín
21 Ls = 1.01*Vf/(Hs*Ws); % Longitud del serpentín
22 P0 = 2*101.325e3; % atm % Presion de la camara presurizada
23 As = Hs*Ws;           % Seccion del serpentín
24 V0 = P2/P0*Vf;        % Volumen de la camara presurizada
25 Rs = sqrt(V0/pi/Hs);  % Radio de la camara presuirzada
26
27 Hc = 500e-6; % um     % Altura del canal IMS
28 Wc = 50e-6; % um     % Anchura del canal IMS
29 Ac = Hc*Wc;           % Seccion del canal IMS
30
31 Aval = 5e-6*200e-6;   % Area de paso de la valvula presurizada
32 Cd = 0.4;             % Coeficiente de descarga
33 rhog = 1.29*2;        % Densidad del aire a 2 atm
34
35 %%%%%%%%%%%
36 % Calculo del tiempo de captura
37 %%%%%%%%%%%
38 alpha = -rhob*M0*Rb^2*mu0*I/(9*pi*muf);
39 beta = -xib*Rb^2*mu0*I^2/(18*pi^2*muf);

```

```

40 a = Wc;
41 b = Rb;
42 tc = 1/(3*alpha)*(b^3-a^3) - ...
43     beta/2/alpha^2*(b^2-a^2) + beta^2/alpha^3*(b-a) - ...
44     beta^3/alpha^4*log((alpha*b+beta)/(alpha*a+beta));
45
46 beta_val = sqrt(Aval/As);
47 beta_c = sqrt(Ac/As);
48 beta_rr = 0.05;
49 Arr = As*beta_rr^2;
50 Wrr = Arr/100e-6;
51
52 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
53 % Calculo de la longitud del canal IMS
54 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
55 Kl = rhog/2*(sqrt(1-beta_val^4)/Cd/Aval)^2 +...
56     rhof/2*(sqrt(1-beta_c^4)/Cd/Ac)^2 + ...
57     rhof/2*(sqrt(1-beta_rr^4)/Cd/Arr)^2;
58 Qmax = (-12*muf/Hs^2+sqrt((12*muf/Hs^2)^2+4*Kl*(As/Ls)^2*(P0-P2)))...
59     / (2*Kl*As/Ls);
60
61 Lc = Qmax/Ac*tc;
62
63 fprintf('alpha: %e um^3/s\n',alpha*1e18);
64 fprintf('beta: %e um^4/s\n',beta*1e24);
65 fprintf('V0: %f ul\n',V0*1e9);
66 fprintf('Lc: %f mm\n',Lc*1e3);
67 fprintf('Ls: %f mm\n',Ls*1e3);
68 fprintf('Rs: %f mm\n',Rs*1e3);
69 fprintf('Rinc1: %f mm\n',(sqrt(200e-9/Hs/pi))*1e3);
70 fprintf('Rdes: %f mm\n',(sqrt(400e-9/Hs/pi))*1e3);
71 fprintf('Rinc2: %f mm\n',(sqrt(50e-9/Hs/pi))*1e3);
72 fprintf('Qmax: %f uL/min\n',Qmax*1e3*1e6*60);
73 fprintf('T total: %f min\n',Vf/Qmax/60);
74 fprintf('Wrr: %f um\n',Wrr*1e6);
75
76 figure(1);
77 plotChamber('./LEdit/analisis/cmdcam.tco',Ls,Ws,200e-6,Rs)
78 figure(2);
79 plotMixer('./LEdit/analisis/cmdmix.tco',400e-6,200e-3,200e-6,12e-3);

```

### A.4.3. Exportación de la geometría completa de una cámara presurizada a L-Edit

```

1 function plotChamber(filename,L,W,t,Rs)
2
3 % Calculo completo de la camara presurizada
4
5 cx = 2*W + 2*t;
6 a = max(roots([2 cx -L*cx]));
7
8 R = 0.5*(t+W);
9 N = ceil(L/(2*a+2*pi*R));
10
11 Nop = 30;
12 Nop1 = round(Nop/2);
13 Nop2 = Nop - Nop1;
14
15 op = zeros(2+Nop,2);
16 op(1,:) = [0 0];
17 op(end,:) = [2*(t+W) 0];
18 opext = zeros(2+Nop,2);
19 opext(1,:) = [-W/2 0];
20 opext(end,:) = [2*(t+W)-W/2 0];
21 opint = zeros(2+Nop,2);
22 opint(1,:) = [W/2 0];
23 opint(end,:) = [2*(t+W)+W/2 0];
24 for i = 1:Nop1
25     theta = pi*(1-(i-1)/(Nop1-1));
26     op(i+1,:) = [R+R*cos(theta) a/2+R*sin(theta)];
27     opext(i+1,:) = [R+(R+W/2)*cos(theta) a/2+(R+W/2)*sin(theta)];
28     opint(i+1,:) = [R+(R-W/2)*cos(theta) a/2+(R-W/2)*sin(theta)];
29 end
30 for i = 1:Nop2
31     theta = pi*(1+(i-1)/(Nop2-1));
32     op(i+Nop1+1,:) = [3*R+R*cos(theta) -a/2+R*sin(theta)];
33     opext(i+Nop1+1,:) = [3*R+(R-W/2)*cos(theta) -a/2+(R-W/2)*sin(theta)];
34     opint(i+Nop1+1,:) = [3*R+(R+W/2)*cos(theta) -a/2+(R+W/2)*sin(theta)];
35 end
36
37 nop = size(op,1);
38 ops = zeros(Nop+N*nop,2);

```

```

39 opsext = zeros (Nop+N*nop,2);
40 opsint = zeros (Nop+N*nop,2);
41 for i = 1:N
42     org = [2*(t+W)*(i-1) 0];
43     ops((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop), :) = op + repmat(org, [nop 1]);
44     opsext((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop), :) = opext + repmat(org, [nop 1]);
45     opsint((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop), :) = opint + repmat(org, [nop 1]);
46 end
47 for i = 1:Nop1+1
48     theta = 3*pi/2 + pi/2*(i-1)/Nop1;
49     ops(i, :) = [-R+R*cos(theta) R+R*sin(theta)];
50     opsext(i, :) = ...
51     [-R+(R-W/2)*cos(theta) R+(R-W/2)*sin(theta)];
52     opsint(i, :) = ...
53     [-R+(R+W/2)*cos(theta) R+(R+W/2)*sin(theta)];
54 end
55 for i = 1:Nop2+1
56     theta = pi - pi/2*(i-1)/Nop2;
57     ops(Nop1+N*nop+i-1, :) = [N*2*(t+W)+R+R*cos(theta) -R+R*sin(theta)];
58     opsext(Nop1+N*nop+i-1, :) = ...
59     [N*2*(t+W)+R+(R+W/2)*cos(theta) -R+(R+W/2)*sin(theta)];
60     opsint(Nop1+N*nop+i-1, :) = ...
61     [N*2*(t+W)+R+(R-W/2)*cos(theta) -R+(R-W/2)*sin(theta)];
62 end
63
64 ops = [-R-2*W 0;ops;ops(end, :)+[R+2*W 0]];
65
66 N = 1000;
67 opspoly = zeros (N,2);
68 for i = 1:N
69     theta = 2*pi*(i-1)/(N-1);
70     opspoly(i, :) = [Rs*cos(theta)-3*W-Rs Rs*sin(theta)];
71 end
72
73 % Escribe los comandos al archivo
74 file = fopen(filename, 'w');
75 fprintf(file, ['width ' num2str(round(W*1e6)) '\n']);
76 fprintf(file, 'path -! ');
77 for i = 1:size(ops,1)
78     fprintf(file, [num2str(round(ops(i,1)*1e6)) ' ' ...
79     num2str(round(ops(i,2)*1e6)) ' ']);
80 end

```

```

81 fprintf(file, '\n');
82 fprintf(file, 'polygon -! ');
83 for i = 1:size(opspoly,1)
84     fprintf(file, [num2str(round(opspoly(i,1)*1e6)) ' ' ...
85                 num2str(round(opspoly(i,2)*1e6)) ' ']);
86 end
87 fclose(file);
88
89 % PLOT
90 plot(1e3*ops(:,1),1e3*ops(:,2),'b',...
91      1e3*opsext(:,1),1e3*opsext(:,2),'r',...
92      1e3*opsint(:,1),1e3*opsint(:,2),'r');
93 hold on;
94 plot(1e3*opspoly(:,1),1e3*opspoly(:,2),'b');
95 hold off;
96 title('Camara presurizada')
97 xlabel('mm');
98 ylabel('mm');
99 axis equal;
100 grid
101
102 end

```

#### A.4.4. Exportación de la geometría de una separador espiral a L-Edit

```

1 function plotChamber(filename,L,W,t,Rs)
2
3 % Calculo completo de la camara presurizada
4
5 cx = 2*W + 2*t;
6 a = max(roots([2 cx -L*cx]));
7
8 R = 0.5*(t+W);
9 N = ceil(L/(2*a+2*pi*R));
10
11 Nop = 30;
12 Nop1 = round(Nop/2);
13 Nop2 = Nop - Nop1;
14

```

```

15 op = zeros(2+Nop,2);
16 op(1,:) = [0 0];
17 op(end,:) = [2*(t+W) 0];
18 opext = zeros(2+Nop,2);
19 opext(1,:) = [-W/2 0];
20 opext(end,:) = [2*(t+W)-W/2 0];
21 opint = zeros(2+Nop,2);
22 opint(1,:) = [W/2 0];
23 opint(end,:) = [2*(t+W)+W/2 0];
24 for i = 1:Nop1
25     theta = pi*(1-(i-1)/(Nop1-1));
26     op(i+1,:) = [R+R*cos(theta) a/2+R*sin(theta)];
27     opext(i+1,:) = [R+(R+W/2)*cos(theta) a/2+(R+W/2)*sin(theta)];
28     opint(i+1,:) = [R+(R-W/2)*cos(theta) a/2+(R-W/2)*sin(theta)];
29 end
30 for i = 1:Nop2
31     theta = pi*(1+(i-1)/(Nop2-1));
32     op(i+Nop1+1,:) = [3*R+R*cos(theta) -a/2+R*sin(theta)];
33     opext(i+Nop1+1,:) = [3*R+(R-W/2)*cos(theta) -a/2+(R-W/2)*sin(theta)];
34     opint(i+Nop1+1,:) = [3*R+(R+W/2)*cos(theta) -a/2+(R+W/2)*sin(theta)];
35 end
36
37 nop = size(op,1);
38 ops = zeros(Nop+N*nop,2);
39 opsext = zeros(Nop+N*nop,2);
40 opsint = zeros(Nop+N*nop,2);
41 for i = 1:N
42     org = [2*(t+W)*(i-1) 0];
43     ops((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop),:) = op + repmat(org,[nop 1]);
44     opsext((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop),:) = opext + repmat(org,[nop 1]);
45     opsint((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop),:) = opint + repmat(org,[nop 1]);
46 end
47 for i = 1:Nop1+1
48     theta = 3*pi/2 + pi/2*(i-1)/Nop1;
49     ops(i,:) = [-R+R*cos(theta) R+R*sin(theta)];
50     opsext(i,:) = ...
51     [-R+(R-W/2)*cos(theta) R+(R-W/2)*sin(theta)];
52     opsint(i,:) = ...
53     [-R+(R+W/2)*cos(theta) R+(R+W/2)*sin(theta)];
54 end
55 for i = 1:Nop2+1
56     theta = pi - pi/2*(i-1)/Nop2;

```

```

57     ops(Nop1+N*nop+i-1,:) = [N*2*(t+W)+R+R*cos(theta) -R+R*sin(theta)];
58     opsext(Nop1+N*nop+i-1,:) = ...
59         [N*2*(t+W)+R+(R+W/2)*cos(theta) -R+(R+W/2)*sin(theta)];
60     opsint(Nop1+N*nop+i-1,:) = ...
61         [N*2*(t+W)+R+(R-W/2)*cos(theta) -R+(R-W/2)*sin(theta)];
62 end
63
64 ops = [-R-2*W 0;ops;ops(end,:)+[R+2*W 0]];
65
66 N = 1000;
67 opspoly = zeros(N,2);
68 for i = 1:N
69     theta = 2*pi*(i-1)/(N-1);
70     opspoly(i,:) = [Rs*cos(theta)-3*W-Rs Rs*sin(theta)];
71 end
72
73 % Escribe los comandos al archivo
74 file = fopen(filename,'w');
75 fprintf(file,['width ' num2str(round(W*1e6)) '\n']);
76 fprintf(file,'path -! ');
77 for i = 1:size(ops,1)
78     fprintf(file,[num2str(round(ops(i,1)*1e6)) ' ' ...
79                 num2str(round(ops(i,2)*1e6)) ' ']);
80 end
81 fprintf(file,'\n');
82 fprintf(file,'polygon -! ');
83 for i = 1:size(opspoly,1)
84     fprintf(file,[num2str(round(opspoly(i,1)*1e6)) ' ' ...
85                 num2str(round(opspoly(i,2)*1e6)) ' ']);
86 end
87 fclose(file);
88
89 % PLOT
90 plot(1e3*ops(:,1),1e3*ops(:,2),'b',...
91      1e3*opsext(:,1),1e3*opsext(:,2),'r',...
92      1e3*opsint(:,1),1e3*opsint(:,2),'r');
93 hold on;
94 plot(1e3*opspoly(:,1),1e3*opspoly(:,2),'b');
95 hold off;
96 title('Camara presurizada');
97 xlabel('mm');
98 ylabel('mm');

```

```
99 axis equal;
100 grid
101
102 end
```

### A.4.5. Exportación de la geometría de un mezclador a L-Edit

```
1 function plotMixer(filename,W,L,t,a)
2 %PLOTMIXER Summary of this function goes here
3 % Detailed explanation goes here
4
5 R = 0.5*(t+W);
6 N = ceil(L/(2*a+2*pi*R));
7
8 Nop = 30;
9 Nop1 = round(Nop/2);
10 Nop2 = Nop - Nop1;
11
12 op = zeros(2+Nop,2);
13 op(1,:) = [0 0];
14 op(end,:) = [2*(t+W) 0];
15 opext = zeros(2+Nop,2);
16 opext(1,:) = [-W/2 0];
17 opext(end,:) = [2*(t+W)-W/2 0];
18 opint = zeros(2+Nop,2);
19 opint(1,:) = [W/2 0];
20 opint(end,:) = [2*(t+W)+W/2 0];
21 for i = 1:Nop1
22     theta = pi*(1-(i-1)/(Nop1-1));
23     op(i+1,:) = [R+R*cos(theta) a/2+R*sin(theta)];
24     opext(i+1,:) = ...
25     [R+(R+W/2)*cos(theta) a/2+(R+W/2)*sin(theta)];
26     opint(i+1,:) = ...
27     [R+(R-W/2)*cos(theta) a/2+(R-W/2)*sin(theta)];
28 end
29 for i = 1:Nop2
30     theta = pi*(1+(i-1)/(Nop2-1));
31     op(i+Nop1+1,:) = [3*R+R*cos(theta) -a/2+R*sin(theta)];
32     opext(i+Nop1+1,:) = ...
33     [3*R+(R-W/2)*cos(theta) -a/2+(R-W/2)*sin(theta)];
34     opint(i+Nop1+1,:) = ...
```

```

35     [3*R+(R+W/2)*cos(theta) -a/2+(R+W/2)*sin(theta)];
36 end
37
38 nop = size(op,1);
39 ops = zeros(Nop+N*nop,2);
40 opsext = zeros(Nop+N*nop,2);
41 opsint = zeros(Nop+N*nop,2);
42 for i = 1:N
43     org = [2*(t+W)*(i-1) 0];
44     ops((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop),:) = op + repmat(org,[nop 1]);
45     opsext((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop),:) = opext + repmat(org,[nop 1]);
46     opsint((Nop1+(i-1)*nop+1):(Nop1+i*nop),:) = opint + repmat(org,[nop 1]);
47 end
48 for i = 1:Nop1+1
49     theta = 3*pi/2 + pi/2*(i-1)/Nop1;
50     ops(i,:) = [-R+R*cos(theta) R+R*sin(theta)];
51     opsext(i,:) = [-R+(R-W/2)*cos(theta) R+(R-W/2)*sin(theta)];
52     opsint(i,:) = [-R+(R+W/2)*cos(theta) R+(R+W/2)*sin(theta)];
53 end
54 for i = 1:Nop2+1
55     theta = pi - pi/2*(i-1)/Nop2;
56     ops(Nop1+N*nop+i-1,:) = [N*2*(t+W)+R+R*cos(theta) -R+R*sin(theta)];
57     opsext(Nop1+N*nop+i-1,:) = ...
58     [N*2*(t+W)+R+(R+W/2)*cos(theta) -R+(R+W/2)*sin(theta)];
59     opsint(Nop1+N*nop+i-1,:) = ...
60     [N*2*(t+W)+R+(R-W/2)*cos(theta) -R+(R-W/2)*sin(theta)];
61 end
62
63 ops = [-R-3*W 0;ops;ops(end,:)+[R+2*W 0]];
64
65 % Escribe los comandos al archivo
66 file = fopen(filename,'w');
67 fprintf(file,['width ' num2str(round(W*1e6)) '\n']);
68 fprintf(file,'path -! ');
69 for i = 1:size(ops,1)
70     fprintf(file,[num2str(round(ops(i,1)*1e6)) ' ' ...
71     num2str(round(ops(i,2)*1e6)) ' ']);
72 end
73 fclose(file);
74
75 % PLOT
76 plot(1e3*ops(:,1),1e3*ops(:,2),'b',...

```

```
77     1e3*opsext(:,1),1e3*opsext(:,2),'r',...
78     1e3*opsint(:,1),1e3*opsint(:,2),'r');
79 title('Mezclador')
80 xlabel('mm');
81 ylabel('mm');
82 axis equal;
83 grid
84
85 end
```



# Bibliografía

- [1] Lenntech B.V., “Necesidad desinfección del agua potable.” [Online]. Available: <http://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/necesidad/necesidad-desinfeccion-agua.htm>
- [2] Elika, “Cryptosporidium parvum,” Tech. Rep. March, 2004. [Online]. Available: <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo19/Criptosporidium%5Fcast.pdf>
- [3] P. Pavli, S. Venkateswaran, M. Bradley, and H. Bridle, “Enhancing Cryptosporidium parvum recovery rates for improved water monitoring,” *Chemosphere*, vol. 143, pp. 57–63, 2015. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515004841>
- [4] H. Bridle, M. Kersaudy-Kerhoas, B. Miller, D. Gavriilidou, F. Katzer, E. a. Innes, and M. P. Y. Desmulliez, “Detection of Cryptosporidium in miniaturised fluidic devices,” *Water Research*, vol. 46, no. 6, pp. 1641–1661, 2012.
- [5] G. D. Sanidad, “Real Decreto 140 / 2003 , de 7 de febrero , por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano . TEXTO CONSOLIDADO,” *Boe*, pp. 1–38, 2013.
- [6] E. L. P. Europeo, E. L. Consejo, D. E. L. A. Uni, P. Europeo, and D. Oficial, “Directiva 2003/99/CE: Vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos,” vol. 7, no. 6, pp. 34–44, 2001.
- [7] H. V. Smith and R. A. Nichols, “Cryptosporidium: Detection in water and food,” *Experimental Parasitology*, vol. 124, no. 1, pp. 61–79, 2010. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489409001520>
- [8] EPA, “Method 1623.1: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA,” p. 83.
- [9] C. d. V. S. V. (VISAVET), “Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria,” 2008. [Online]. Available: <http://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2008/02/08/84070>

- [10] A. Kerrouche, M. P. Desmulliez, and H. Bridle, “Megasonic sonication for cost-effective and automatable elution of *Cryptosporidium* from filters and membranes,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 118, pp. 123–127, 2015. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701215300580>
- [11] S. I. Gundersen and A. F. Palmer, “Conjugation of Methoxypolyethylene Glycol to the Surface of Bovine Red Blood Cells,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 96, no. 6, pp. 1199–1210, 2007.
- [12] Wikipedia, “Analito,” 2015. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Analito>
- [13] A. Arnau and T. Sogorb, “Cristales piezoeléctricos de cuarzo en aplicación como Microbalanza QCM,” *Revista CES Medicina*, vol. 16, no. 2, pp. 27–37, 2002.
- [14] Wikipedia, “Plasmón.” [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Plasm%C3%B3n>
- [15] F. Vidal and L. Moreno, “Plasmones superficiales,” *Investigación y ciencia*, pp. 66–76, 2008. [Online]. Available: <http://iyc.whads.com/files/8619.pdf>
- [16] C. Monterrey, “Dielectroforesis para sistemas,” no. figura 1, pp. 227–230, 2013.
- [17] X. Oliver Olivella and C. Agelet de Saracibar Bosch, *Mecánica de medios continuos para ingenieros*, 2000.
- [18] Tangient LLC, “Física para todos - Principio de Pascal,” 2016. [Online]. Available: <https://lafisicaparatodos.wikispaces.com/PRINCIPIO+DE+PASCAL>
- [19] Wikipedia, “Ley de Laplace,” 2016. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Ley%5Fde%5FLaplace>
- [20] Hertz, “Física general de fluidos.” [Online]. Available: <http://www.lawebdefisica.com/apuntsfis/fluidosge/>
- [21] Wikipedia, “Flujo laminar,” 2015. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Flujo%5Flaminar>
- [22] —, “Flujo turbulento,” 2015. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Flujo%5Fturbulento>
- [23] —, “Ecuaciones de Navier-Stokes,” 2015. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Ecuaciones%5Fde%5FNavier-Stokes>

- [24] —, “Sustentación,” 2016. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Sustentaci%C3%B3n>
- [25] —, “Número adimensional,” 2014. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/N%C3%BAmero%5Fadimensional>
- [26] —, “Número de Eötvös,” 2015. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=N%C3%BAmero%5Fde%5FE%C3%B6tv%C3%B6s>
- [27] —, “Número de Dean,” 2014. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/N%C3%BAmero%5Fde%5FDean>
- [28] —, “Número de Grashof,” 2016. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/N%C3%BAmero%5Fde%5FGrashof>
- [29] —, “Número de Nusselt,” 2015. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/N%C3%BAmero%5Fde%5FNusselt>
- [30] —, “Número de Reynolds,” 2016. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/N%FAmero%5Fde%5FReynolds>
- [31] —, “Número de Prandtl,” 2014. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/N%C3%BAmero%5Fde%5FPrandtl>
- [32] —, “Número de Rayleigh,” 2015. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/N%C3%BAmero%5Fde%5FRayleigh>
- [33] J. L. O. Quiroga, “Estudio preliminar de microfluidos y microrreactores para la degradación catalítica tipo fenton del Direct blue 71,” Ph.D. dissertation, Universidad de Bogota Jorge Tadeo Lozano, 2014.
- [34] U. S. Susan A. Brooks, *Metastasis Research Protocols*, 2001, vol. Volume II:.
- [35] H. A. Micucci and E. Camps, “Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades,” vol. 6, pp. 35–54, 1987.
- [36] RapidChek CONFIRM, “Immunomagnetic Separation (IMS),” 2012. [Online]. Available: <http://www.romerlabs.com/en/products/food-pathogen-testing/e-coli/>
- [37] K. Dyas, “Immunomagnetic Separation (IMS) for the detection of Legionella,” *Waterline Management Society*, p. 1, 2014.
- [38] ThermoFisher Scientific, “Dynabeads anti-Cryptosporidium,” pp. 2–3, 2015.

- [39] Wikipedia, “Inmunofluorescencia,” 2015. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Inmunofluorescencia>
- [40] CDC (Centers for Disease Control and Prevention), “Cryptosporidiosis,” 2013. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/dpdx/Cryptosporidiosis/index.html>
- [41] J. A. T. Franco, “Programa de Postgrado Cursos básicos-Microscopia de inmunofluorescencia.” 2003. [Online]. Available: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/minmuflures.htm>
- [42] Nitzipper, “Inmunofluorescencia,” 2015. [Online]. Available: <http://www.nitzipper.com/es/nitzipper-aplicaciones-bioconjugacion/inmunofluorescencia.html>
- [43] I. D. Odell and D. Cook, “Immunofluorescence Techniques,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, pp. 1–4, 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.455>
- [44] U. States, “Method 1622 : Cryptosporidium in Water by Filtration / IMS / FA,” *Environmental Protection*, no. April, 2001.
- [45] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, and I. Papautsky, “Continuous particle separation in spiral microchannels using Dean flows and differential migration.” *Lab on a chip*, vol. 8, no. 11, pp. 1906–1914, 2008.
- [46] S. Ookawara, R. Higashi, D. Street, and K. Ogawa, “Feasibility study on concentration of slurry and classification of contained particles by microchannel,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 101, no. 1-3, pp. 171–178, 2004.
- [47] M. Jimenez, B. Miller, and H. L. Bridle, “Efficient separation of small micro particles at high flowrates using spiral channels: application to waterborne pathogens,” *Chemical Engineering Science*, 2015. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009250915006089>
- [48] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, “Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 48, pp. 18 892–18 897, 2007.
- [49] G. Flores, C. Aracil, F. Perdigones, and J. M. Quero, “Low consumption single-use microvalve for microfluidic PCB-based platforms,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 24, no. 6, p. 65013, 2014.

- [50] Wikipedia, “Orifice plate,” 2015. [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Orifice%5Fplate>
- [51] J. G. Flores, F. Perdigones, C. Aracil, “Pressurization method for controllable impulsion of liquids in microfluidic platforms,” *Elsevier*, 2015.
- [52] S. S. Shevkoplyas, A. C. Siegel, R. M. Westervelt, M. G. Prentiss, and G. M. Whitesides, “The force acting on a superparamagnetic bead due to an applied magnetic field.” *Lab on a chip*, vol. 7, no. 10, pp. 1294–1302, 2007.
- [53] Waterborne, “A400FLK. Crypt-a-Glo Comprehensive Kit,” p. 400.
- [54] C. Aracil, F. A. Perdigones, J. M. Moreno, A. Luque, G. Flores, and J. M. Quero, “Depressurised reservoirs for portable fluid extraction in SU-8-based microfluidic systems,” *Micro & Nano Letters, IET*, vol. 9, no. 11, pp. 821–824, 2014.



# Nomenclatura

C. Parvum	Cryptosporidium Parvum
Cryptos	Cryptosporidium
Cryptos	Cryptosporidium
EPA	Acuerdo de Asociación Económica
IMS	InmunoMagnetic Separation
IMS	Separación Inmunomagnética
PBS	Phosphate Buffered Saline
QCM	Quartz crystal microbalance
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana