

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

PROYECTO FIN DE CARRERA

INGENIERO INDUSTRIAL

---

**Sistema robótico de  
micromanipulación basado en CNC**

---

*Autor:*

Daniel CASARES  
PALOMEQUE

*Director:*

Dr. J.M.GÓMEZ DE  
GABRIEL

2 de diciembre de 2015





# Resumen

En este PFC se ha diseñado, construido y probado un sistema de micromanipulación de muestras microscópicas. Este dispositivo posiciona de forma precisa un microscopio digital e instrumentos de micromanipulación. Para su implementación se ha utilizado tecnologías de código abierto y elementos de CNC de bajo coste. Se han realizado experimentos con diferentes tipos de muestras para comprobar el cumplimiento de los requerimientos. El sistema resultante es compacto, de bajo coste y fácilmente reproducible.







# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Necesidades de los laboratorios . . . . .	1
1.2. Objetivos . . . . .	3
1.3. Diseño preliminar del sistema . . . . .	5
1.4. Estructura de la memoria . . . . .	6
<b>2. Antecedentes</b>	<b>9</b>
2.1. Micromanipuladores comerciales . . . . .	9
2.1.1. Leica . . . . .	10
2.1.2. Nikon . . . . .	14
2.1.3. Carl Zeiss . . . . .	19
2.1.4. Olympus . . . . .	20
2.1.5. Suministradores de micromanipuladores . . . . .	22
2.2. Introducción a las máquinas CNC . . . . .	26
2.3. Los paradigma de Open Source y tecnología apropiada . . . . .	28
2.3.1. Principales proyectos recientes Open Source . . . . .	29
<b>3. Diseño e implementación del sistema mecánico</b>	<b>33</b>
3.1. Sistema motorizado de posicionamiento cartesiano . . . . .	34
3.1.1. Elección del modelo . . . . .	34
3.1.2. Especificaciones técnicas . . . . .	39
3.1.3. Motor paso a paso . . . . .	40
3.1.4. Paso del Husillo . . . . .	41
3.2. Subsistema de orientación . . . . .	43
3.2.1. Diseño de los movimientos angulares . . . . .	44
3.2.2. Sistema de posicionamiento angular V1 . . . . .	49
3.2.3. Sistema de posicionamiento angular V2 . . . . .	55
3.3. Diseño y construcción de las piezas . . . . .	61
3.3.1. Pletina base . . . . .	62
3.3.2. Pletina vertical . . . . .	63
3.3.3. Escuadras . . . . .	64
3.3.4. Plataforma giratoria . . . . .	66
3.3.5. Engranaje conductor . . . . .	67
3.3.6. Pieza de sujeción del motor posicionador angular . . . . .	69

3.3.7. Pieza de sujeción de la plataforma al rodamiento . . . . .	71
3.3.8. Pieza de sujeción del microscopio digital . . . . .	72
3.3.9. Pieza de sujeción del motor de la herramienta . . . . .	74
3.3.10. Adaptador de la herramienta . . . . .	75
3.3.11. Caja para la electrónica . . . . .	76
3.3.12. Piezas compradas . . . . .	78
3.4. Proceso de ensamblaje . . . . .	79
<b>4. Diseño e implementación del sistema de control</b>	<b>89</b>
4.1. La unidad de control . . . . .	90
4.1.1. Electrónica de control por defecto . . . . .	90
4.1.2. Elección de la placa controladora . . . . .	93
4.1.3. Fuente de alimentación . . . . .	98
4.1.4. Cableado . . . . .	101
4.2. Firmware . . . . .	102
4.2.1. Elección del firmware . . . . .	102
4.2.2. Configuración principal . . . . .	104
4.2.3. Configuración de los sensores de temperaturas . . . . .	105
4.2.4. Configuración mecánica . . . . .	106
4.3. Drivers . . . . .	108
4.3.1. Arquitectura del driver y microstepping . . . . .	108
4.3.2. Elección del driver . . . . .	109
4.3.3. Configuración del driver . . . . .	111
4.4. Microscopio digital . . . . .	112
<b>5. Diseño e implementación de la interfaz de usuario</b>	<b>115</b>
5.1. La interface de usuario: Host . . . . .	115
5.1.1. Las diferentes alternativas . . . . .	116
5.1.2. Creación del logo . . . . .	120
5.1.3. Configuración de Printrun . . . . .	120
5.2. Procesado y análisis de imágenes . . . . .	127
5.2.1. Instalando la extensión del camara web . . . . .	128
<b>6. Experimentos</b>	<b>131</b>
6.1. Experimento de visión y movimiento del microscopio . . . . .	131
6.2. Experimento del uso de la herramienta . . . . .	136
6.3. Experimento de manipulación de embriones de ratones . . . . .	139
6.4. Experimento manipulación con embriones de pollo . . . . .	141
<b>7. Conclusiones y líneas de desarrollo futuras</b>	<b>149</b>
7.1. Conclusiones . . . . .	149
7.2. Líneas de desarrollo futuras . . . . .	150
<b>A. Especificaciones</b>	<b>153</b>
<b>B. Lista de materiales</b>	<b>155</b>

*ÍNDICE GENERAL*

III

<b>Bibliografía</b>	<b>156</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>164</b>



# Índice de figuras

1.1.	Partes de un embrión de pollo. Fuente: [1] . . . . .	2
1.2.	Técnica ICSI (Intracytoplasmatic sperm injection), variante de la fecundación in vitro. Fuente: [2] . . . . .	3
1.3.	Esquema de todos los sistemas. . . . .	6
2.1.	Leica DMS1000B. Fuente:[3] . . . . .	12
2.2.	Leica DMIL LED. Fuente: [4] . . . . .	13
2.3.	Leica DMi8. Fuente: [5] . . . . .	14
2.4.	Leica DMi8.Fuente: [6] . . . . .	15
2.5.	Nikon AZ100M.Fuente: [7] . . . . .	16
2.6.	Nikon ECLIPSE Ti-U. Fuente: [8] . . . . .	17
2.7.	Nikon ECLIPSE FN1. Fuente: [9] . . . . .	17
2.8.	Nikon ECLIPSE FN1. Fuente: [9] . . . . .	18
2.9.	Nikon-NT-88-V3.Fuente: [10] . . . . .	19
2.10.	Axio-VertA1. Fuente: [11]. . . . .	19
2.11.	Axio Observer. Fuente: [12]. . . . .	21
2.12.	Olympus BX61WI/BX51WI. Fuente:[13] . . . . .	21
2.13.	Olympus IX73. Fuente:[14] . . . . .	22
2.14.	MTK-1-O1/O2/O3/N1/Z1/Z2/L1/L2. Fuente:[15] . . . . .	23
2.15.	Eppendorf InjectMan 4. Fuente:[16] . . . . .	24
2.16.	Eppendorf TransferMan 4r. Fuente: [17] . . . . .	26
2.17.	OpenTrons V1. . . . .	30
3.1.	Esquema general del sistema mecánico. . . . .	34
3.2.	ShapeOKO, fresadora CNC para montar en casa. Fuente:[18] . . . . .	35
3.3.	Foto del modelo CNC3020T. Fuente:[19]. . . . .	35
3.4.	Foto del modelo CNC3020T. Fuente:[19] . . . . .	36
3.5.	Foto del modelo CNC3020T. Fuente:[19] . . . . .	37
3.6.	Foto del modelo CNC3020T adquirida.Fuente:[20] . . . . .	38
3.7.	Otro foto del modelo CNC3020T adquirida.Fuente:[20] . . . . .	38
3.8.	Motor paso a paso 57BYGH56-4017B del eje Y y eje X. . . . .	40
3.9.	Motor paso a paso 57BYGH41-402B del eje Z. . . . .	40
3.10.	Foto del husillo. . . . .	42
3.11.	Distintos tipos de dientes del husillo.Fuente [21] . . . . .	43

3.12. Micromanipulador comercial MHW-3. Fuente:[22]. . . . .	44
3.13. Esquema trigonométrico del movimiento angular vertical. . . . .	45
3.14. Parámetro de diseño en FreeCAD del adaptador. . . . .	47
3.15. Esquema del enfoque del microscopio. . . . .	49
3.16. Vista del perfil, donde se puede apreciar los distintos niveles del prototipo 1. . . . .	49
3.17. Imagen del eje M8. . . . .	51
3.18. Imagen en perspectiva del primer prototipo. . . . .	52
3.19. Alzado del primer prototipo. . . . .	52
3.20. Vista de la planta desde abajo del primer prototipo. . . . .	53
3.21. Imagen trasera del primer prototipo. . . . .	53
3.22. Foto del alzado del primer prototipo. . . . .	54
3.23. Foto del perfil del primer prototipo. . . . .	54
3.24. Foto en detalle de la plataforma del primer prototipo. . . . .	55
3.25. Foto del primer prototipo sobre el sistema de posicionamiento. .	55
3.26. Otra foto del primer prototipo sobre el sistema de posicionamiento.	55
3.27. Imagen en perspectiva del segundo prototipo. . . . .	56
3.28. Fabricación de la pletina base en aluminio, mediante fresado CNC. .	57
3.29. Alzado del segundo prototipo. . . . .	58
3.30. Vista del perfil del segundo prototipo. . . . .	58
3.31. Vista de la planta desde abajo del segundo prototipo. . . . .	59
3.32. Imagen trasera del segundo prototipo. . . . .	59
3.33. Foto del perfil del segundo prototipo. . . . .	60
3.34. Foto del segundo prototipo sobre el sistema de posicionamiento.	60
3.35. Foto del segundo prototipo sobre el sistema de posicionamiento (desde otra vista). . . . .	61
3.36. Imagen en perspectiva de la pletina base. . . . .	62
3.37. Imagen de la planta de la pletina base. . . . .	63
3.38. Foto de la pletina base terminada. . . . .	63
3.39. Imagen del alzado de la pieza. . . . .	64
3.40. Foto de la pletina vertical terminada. . . . .	64
3.41. Imagen de la escuadra. . . . .	65
3.42. Imagen de la planta de la pieza. . . . .	65
3.43. Foto de la pieza terminada. . . . .	66
3.44. Alzado de la plataforma giratoria. . . . .	67
3.45. Perfil de la plataforma. . . . .	67
3.46. Foto de la plataforma terminada. . . . .	67
3.47. Alzado de la pieza. . . . .	68
3.48. Perfil de la pieza. . . . .	69
3.49. Foto de la pieza impresa. . . . .	69
3.50. Imagen del alzado de la pieza de sujeción del motor. . . . .	70
3.51. Imagen del perfil de la pieza de sujeción del motor. . . . .	70
3.52. Foto de la pieza de sujeción del motor una vez impresa. . . . .	70
3.53. Imagen del alzado de la pieza de sujeción de la plataforma. . . .	71
3.54. Imagen del perfil de la pieza de sujeción de la plataforma. . . .	72
3.55. Foto de la pieza impresa de la pieza de sujeción de la plataforma.	72

3.56. Alzado de pieza de sujeción del microscopio digital. . . . .	73
3.57. Perfil de pieza de sujeción del microscopio digital. . . . .	73
3.58. Foto de piezas de sujeción del microscopio digital. . . . .	73
3.59. Alzado de pieza de sujeción del motor de la herramienta. . . . .	74
3.60. Perfil de pieza de sujeción del motor de la herramienta. . . . .	74
3.61. Foto de pieza de sujeción del motor de la herramienta. . . . .	75
3.62. Alzado del adaptador. . . . .	75
3.63. Perfil del adaptador. . . . .	76
3.64. Foto del adaptador. . . . .	76
3.65. Imagen de la caja. . . . .	77
3.66. Imagen de la tapadera. . . . .	77
3.67. Foto de la caja. . . . .	77
3.68. Foto del motor NEMA17. . . . .	78
3.69. Foto de una pipeta básica. . . . .	79
3.70. Foto del rodamiento 12060. . . . .	79
3.71. Foto de pletina base con escuadras. . . . .	80
3.72. Foto otra vista de la pletina base con escuadras. . . . .	80
3.73. Foto de la pletina vertical con escuadras y la base. . . . .	81
3.74. Foto otra vista de la pletina vertical con escuadras y la base. . . . .	81
3.75. Foto del soporte con el motor atornillado. . . . .	81
3.76. Foto de los elementos atornillados a la plataforma giratoria. . . . .	82
3.77. Foto del soporte de la plataforma atornillado a la propia plata- forma giratoria. . . . .	82
3.78. Foto del soporte con el motor atornillado. . . . .	83
3.79. Foto de los elementos atornillados a la plataforma giratoria. . . . .	83
3.80. Foto del soporte con el motor atornillado. . . . .	83
3.81. Foto de los elementos atornillados a la plataforma giratoria. . . . .	84
3.82. Foto del soporte con el motor atornillado. . . . .	84
3.83. Foto del soporte con el motor atornillado. . . . .	85
3.84. Foto de los elementos atornillados a la plataforma giratoria. . . . .	85
3.85. Foto de los elementos atornillados a la plataforma giratoria. . . . .	85
3.86. Foto de la impresión 3d la caja protectora con la RAMPS. . . . .	86
3.87. Foto de la caja protectora con la RAMPS. . . . .	86
3.88. Foto del montaje final. . . . .	87
3.89. Foto 2 del montaje final. . . . .	87
4.1. Esquema de control del sistema de control. . . . .	89
4.2. Imagen de la electrónica por defecto. . . . .	90
4.3. Imagen 2 de la electrónica por defecto. . . . .	91
4.4. Aspecto de la interfaz Mach3. . . . .	91
4.5. Aspecto de la interfaz LazyCam. . . . .	92
4.6. Imagen de interior de la electrónica por defecto. . . . .	93
4.7. Imágenes de las placa analizadas. Fuentes:[23], [24], [25],[26] . . . . .	95
4.8. Foto de la placa compatible Arduino utilizada. . . . .	97
4.9. Foto de USB tipo B. . . . .	97
4.10. Foto de la RAMPS utilizada. . . . .	98

4.11. Foto de la fuente ATX. . . . .	98
4.12. Esquema los pines de la fuente. Fuente:[27] . . . . .	99
4.13. Imagen de los pines de la fuente puenteada. . . . .	100
4.15. Soldado de uno de los conectores de seguridad. . . . .	101
4.14. Imagen de la clema ya cableada. . . . .	101
4.16. Esquema de conexión de la RAMPS modificado. . . . .	102
4.17. Arduino IDE. . . . .	103
4.18. Página en Github.Fuente: [28] . . . . .	104
4.19. Arduino IDE con Marlin cargado. . . . .	104
4.20. Puente H en operación. Fuente: [29] . . . . .	108
4.21. Forma de onda en el microstepping. Fuente: [30] . . . . .	109
4.22. Formato de driver. Fuente: [31] . . . . .	110
4.23. Esquema del driver. Fuente: [31] . . . . .	111
4.24. Disposición de los jumpers . . . . .	112
4.25. Microscopio digital adquirido . . . . .	113
4.26. Útil de calibración del microscopio digital adquirido. . . . .	114
5.1. Esquema general del sistema de interfaz gráfica. . . . .	115
5.2. Programa Printrun en su parte de Pronterface. Fuente: [32] . . .	116
5.3. Programa Cura con una figura ya cargada. . . . .	117
5.4. Programa Repetier con una figura ya cargada. Fuente: [33] . . .	117
5.5. Octoprint. [34] . . . . .	118
5.6. Imagen de una RapsberryPi 2. Fuente: [35] . . . . .	118
5.7. Imagen de una Grblfeeder . . . . .	119
5.8. Imagen de una BioGrblfeeder . . . . .	119
5.9. Imagen de una BioGrbfedeer . . . . .	120
5.10. Partículas de polen. . . . .	121
5.11. Logo creado con Inkscape,BioCNC. . . . .	121
5.12. Página de descarga de GitHub. . . . .	121
5.13. Se abre la imagen con Inkscape. . . . .	123
5.14. Pestaña Printer. . . . .	124
5.15. Pestaña User Interface. . . . .	125
5.16. Pestaña User Interface. . . . .	125
5.17. Pestaña Colors. . . . .	125
5.18. Pestaña External Commands. . . . .	126
5.19. Definiendo los botones a través de la opción Custom buttons. .	127
5.20. ImageJ. Fuente: [36] . . . . .	127
5.21. Foto de ImageJ trabajando con el plugin ya instalado. . . . .	129
5.22. Imagen obtenida con Cheese. . . . .	130
6.1. Montaje del experimento 1. . . . .	132
6.2. Imagen borrosa debido a un enfoque inadecuado. . . . .	132
6.3. Imagen nítida tras realizar un corrector enfoque. . . . .	132
6.4. Calibrando la escala. . . . .	133
6.5. Montaje del experimento 1. . . . .	133
6.6. Análisis de muestra 1. . . . .	134

6.7. Muestra de tallo de algodón. . . . .	134
6.8. Muestra de madera de pino. . . . .	134
6.9. Muestra de tallo de dicotiledónea. . . . .	135
6.10. Muestra de epidermis de cebolla. . . . .	135
6.11. Superficie de grano de centeno en falso color. . . . .	135
6.12. Superficie de un driver. Aumentos x500, x100 y por x25. . . . .	136
6.13. Montaje del experimento 2. . . . .	137
6.14. Asa aparece en el campo de visión del microscopio sin enfocar. . . . .	138
6.15. Asa aparece en el campo de visión del microscopio enfocada. . . . .	138
6.16. Asa y malla de calibración enfocados . . . . .	138
6.17. Asa y malla de calibración enfocados tras moverse de la posición	139
6.18. Montaje del experimento 4. . . . .	139
6.19. Embrión en placa de Petri . . . . .	140
6.20. Imagen del calibrado . . . . .	141
6.21. Punción del embrión muerto . . . . .	141
6.22. Montaje de la incubadora. . . . .	142
6.23. Huevo a tras luz . . . . .	143
6.24. Cáscola resquebrajada. . . . .	143
6.25. Retirada de la cáscola con ayuda del Ayudándose del punzón para retirar la cáscola. . . . .	144
6.26. Huevo abierto . . . . .	144
6.27. Huevo bajo el microscopio. . . . .	144
6.28. Huevo abortado. . . . .	145
6.29. Observación de embrión de pollo vivo con el dispositivo. . . . .	145
6.30. Medición de embrión de pollo vivo con el dispositivo. . . . .	145
6.31. Otra observación de embrión de pollo vivo con el dispositivo. . . . .	146
6.32. Realizando una grabación de video con el programa Cheese de Ubuntu. . . . .	146
6.33. Tapando el orificio realizado en la cáscola del huevo. . . . .	146
6.34. Imagen tomada al segundo día de realizar el experimento, el em- brión seguía vivo . . . . .	147



# Capítulo 1

## Introducción

La técnica y la ciencia no son conocimientos independientes. La primera facilita a la segunda las herramientas necesarias con las que avanzar, y a su vez la segunda realimenta a la primera. Un ejemplo claro fue el telescopio, que ayudó a desentrañar las leyes de la física y el conocimiento de éstas repercutió en una mejora de los instrumentos.

En los laboratorios de biología y microbiología de todo el mundo se intenta disponer de la maquinaria más avanzada y fiable. Marcas de reconocido prestigio en instrumentación óptica como Leica o Nikon compiten en la fabricación de microscopios muy avanzados. El problema está cuando además de microscopios se necesita cierta manipulación. Brazos robóticos o posicionamiento controlado por el ordenador hasta ahora habían sido sistemas muy complejos y poco accesibles.

Por ello, en este proyecto se desarrolla un sistema de micromanipulación basado en una máquina CNC, sistema profusamente utilizado en industria, y Open source(OS), de fuentes y planos abiertos.

### 1.1. Necesidades de los laboratorios

En un laboratorio de microbiología se realizan una multitud de experimentos, con células y tejido de múltiples orígenes para investigación. Los experimentos básicos en microbiología se llevan a cabo para fines educativos/formativos y son los que se listan a continuación [37]:

- Técnicas de siembra y aislamiento de bacterias y levaduras.
- Técnicas de tinción simple, diferencial y selectiva.
- Pruebas de diferenciación bioquímica.
- Cultivo y morfología de hongos filamentosos.

- Cultivo y morfología de microalgas.
- Cuantificación de microorganismos.
- Efecto de factores ambientales en la curva de crecimiento.
- Efecto de la actividad de agua sobre el crecimiento microbiano.
- Evaluación de agentes antimicrobianos

Existen muchas más prácticas y variantes pero las listadas son un buen ejemplo de la mayoría de ellas. En ellas no se requiere micromanipulación pero la mayoría de tareas podrían automatizarse y monitorizarse con maquinaria específica, algo que actualmente no se hace. Por ello para este tipo de aplicaciones este proyecto ya sería válido.

Otros experimentos más avanzados son el cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* y la embriología animal. Este proyecto pretende realizar micromanipulación sobre embriones de pollo y de ratones. Por otra parte, no solo sobre estas especies se realizan experimentos, sino también sobre embriones de pez cebra o de rana por ejemplo. Los embriones son útiles ya que son un modelo de organismo vivo ideal para estudiar el potencial de diferenciación de células y su membrana corioalantoidea (CAM), un entorno de prueba vascular para el estudio de la angiogénesis y también la tumorigénesis [38].

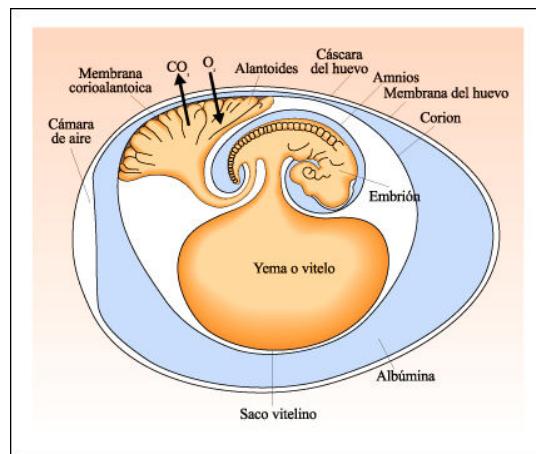


Figura 1.1: Partes de un embrión de pollo. Fuente: [1]

Otras operaciones que requieren ya necesariamente micromanipulación y que se realizan de forma comercial (no para investigación) son las técnicas de fecundación *in vitro* en clínicas de fertilidad(FIV). Una máquina de micromanipulación lo suficientemente precisa (un óvulo humano mide 100 micrómetros de



Figura 1.2: Técnica ICSI (Intracytoplasmatic sperm injection), variante de la fecundación in vitro. Fuente: [2]

diámetro) serviría para estos usos.

Todos estos experimentos demuestran la necesidad real de una máquina multipropósito capaz de manipular muestras de manera fácil y accesible.

## 1.2. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es el desarrollo de un sistema de micromanipulación basado en una máquina CNC y Open source (fuentes y planos abiertos) para experimentación con embriones, microcirugía en animales adultos, manipulación de óvulos, etc. que sea útil con respecto a las técnicas manuales y suponga un menor coste que las alternativas comerciales similares. Concretando, los objetivos principales son:

- Observación de una muestra a nivel microscópico .
- Posicionamiento del microscopio sobre la muestra en cualquier posición de los tres ejes cartesianos.
- Micromanipulación mediante herramienta (pipeta, bisturí, etc) en cualquier ángulo vertical y horizontal
- Control de posición mediante una interfaz gráfica (GUI), que use comunicación USB
- Programación de rutinas y automatización de tareas desde la misma GUI.

Los objetivos adicionales son (no fundamentales, posibles en futuras líneas de investigación):

- Reconocimiento visual.
- Pipeta con bomba de inyección controlada por ordenador.
- Varios manipuladores a la vez para operaciones avanzadas.
- Visión esteroscópica.
- Control remoto por Streaming.
- Atmósfera controlada.

Estos objetivos pueden concretarse como una lista de requerimientos:

- Observación por microscopio: Rango de aumento de al menos x20 a x500, suficiente para ver muestras de 20 micrómetros. El control de este aumento será manual (motorizado sería excesivamente complejo) y el enfoque controlado con el eje Z. El sensor digital tendrá una resolución máxima de 2 Mpx.
- Posicionamiento sobre los 3 ejes: Se utilizarán los 3 ejes cartesianos X,Y,Z con área de trabajo de 300x200x40 mm, con una resolución de 20 micrómetros. La velocidad máxima no será un factor a tener en cuenta.
- Micromanipulación: El micromanipulador tendrá una posición relativa fija con respecto al microscopio y de esta forma, se mueve solidariamente con respecto a éste. Es por ello que la herramienta no se enfocará hasta que este actuando sobre la pieza, ya el enfoque sobre esta no tiene importancia. Su ángulo de ataque (ángulo vertical) será variable de la misma manera que el ángulo horizontal. Sin embargo ser solidario con el microscopio, el ángulo de este también variará.
- Control de posición por interfaz gráfica usuario: En ella se podrá configurar la velocidad y posición del movimiento. El software debe de ser multiplataforma (Windows, Mac OS, Ubuntu) y estar escrito en un lenguaje de programación accesible y fácilmente modificable y ampliable. La comunicación sera mediante puerto USB.
- Programación de rutinas y automatización de procesos: La realización de tareas repetitivas como el pipeteo o fotografía de varias posiciones a lo largo del tiempo de varias muestras requiere programación de la máquina.

Sobre los requerimientos de los objetivos adicionales:

- Reconocimiento visual: Para realizar actividades tediosas como el conteo de espécímenes o reconocimiento de formas difíciles. También para realizar mediciones.

- Pipeta con bomba de inyección controlada por ordenador: Una pipeta con bomba permite la inyección de líquido sin limitación y sin tener que cambiar de recarga, todo ello de forma automática.
- Varios manipuladores a la vez para operaciones avanzadas: Dos micromanipuladores o un manipulador de dos grados de libertad pueden favorecer muchísimo la diversidad de operaciones a realizar.
- Visión estereoscópica: La toma de dos imágenes del mismo lugar con un ángulo de separación da lugar al combinar éstas de una imagen con profundidad (imágenes 3D)
- Control remoto por Streaming
- Atmósfera controlada(seguridad, luz, humedad, temperatura y CO<sub>2</sub>): Plataforma iluminada mediante LEDs, temperatura controlada por calefactores, humedad controlada por ventilación forzada y sensores de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> incluido. Máquina cerrada con llave de seguridad en puerta, rodamiento lineales del tipo secos (dry) para evitar posible contaminación.

### 1.3. Diseño preliminar del sistema

La implementación de las especificaciones se hace a través de 3 sistemas principales, donde recogen los distintos requerimientos, teniendo cada uno de estos sus respectivos subsistemas.

- El sistema mecánico constará de dos subsistemas: subsistema de posición: los actuadores, motores y la estructura de la máquina CNC; y el subsistema de orientación: con su actuador y el micromanipulador.
- El sistema de control constará del firmware, la placa de control, los drivers y el microscopio digital.
- El sistema de la interfaz de usuario constará de una interfaz gráfica (GUI) y software complementario de imagen.

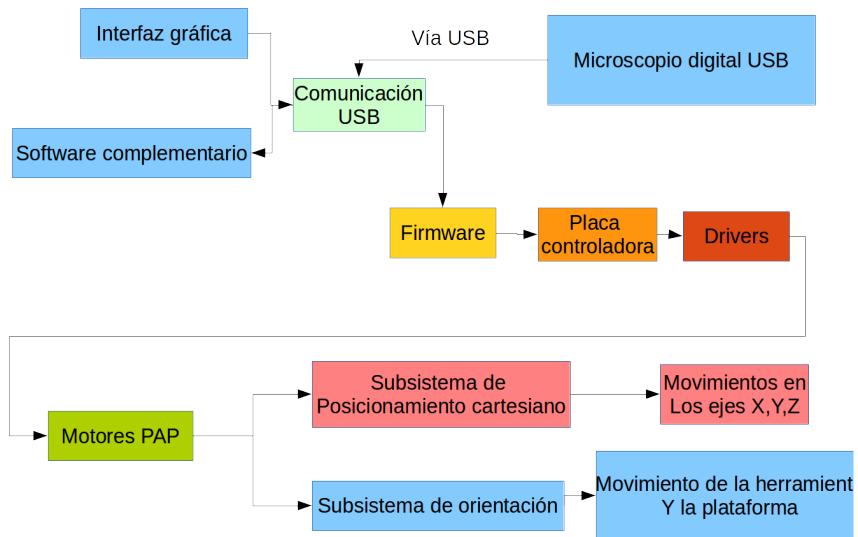


Figura 1.3: Esquema de todos los sistemas.

#### 1.4. Estructura de la memoria

En el capítulo 2 se describen los principales sistemas de micromanipulación que se pueden encontrar en el mercado. También se habla del paradigma de Open Source como modelo de desarrollo y se hace una pequeña introducción al funcionamiento de una maquina CNC.

En el capítulo 3 se describe el diseño y la implementación del sistema mecánico: la máquina CNC, motores paso a paso, husillos, cálculos para cumplir con las especificaciones de resolución. Por otra parte, se describe el diseño e implementación del sistema de orientación: diferentes prototipos realizados, descripción detallada de piezas móviles y proceso de fabricación, así como también del proceso de montaje.

En el capítulo 4 se describe el diseño y la implementación del sistema de control: placa controladora, firmware de la placa, drivers de los motores paso a paso y microscopio digital.

En el capítulo 5 se describen el software implementado, sus librerías necesarias y modificaciones realizadas. Además se describe el software complementario para análisis y procesado de imágenes.

En el capítulo 6 se describen los cuatro experimentos realizados con la máquina, utilizados para la comprobación de los requerimientos especificados.

En el capítulo 7 se describirán las conclusiones y líneas futuras de investigación.



# Capítulo 2

## Antecedentes

En este capítulo se hace una introducción a los dispositivos existentes de micromanipulación, se describen las máquinas CNC por el uso que se hace de ellas en el proyecto, se discute el paradigma Open Source como modelo de desarrollo y los principales proyectos hasta la fecha que pueden servir de inspiración (proyectos biotecnológicos).

### 2.1. Micromanipuladores comerciales

Los micromanipuladores siempre van unidos a los microscopios y por ello los fabricantes de microscopios son las principales compañías que surten al mercado de los mismos. Es un tipo de producto englobado dentro de la optomecánica (mecánica para dispositivos ópticos). Las cuatro principales compañías de fabricación de microscopios (que también son grandes compañías de instrumentación científica) son Leica, Nikon, Olympus y Carl Zeiss. Todas ellas tienen suministradores para dichos micromanipuladores (electrónica y mecánica). Los dos suministradores principales son Narishige y la Eppendorf.

Los tipos de micromanipuladores normalmente utilizados son dos:

- **Micromanipulador de 4 grados de libertad:** Se asemeja a un brazo robótico. Puede estar motorizado ( motores paso a paso) o ser mediante accionamiento y reducción hidráulica. Los hay con 3 ó 4 ejes de libertad y suelen venderse junto al joystick.
- **Plataformas móviles:** Mayoritariamente son de dos tipos, cartesianas (llamadas Motorized Translation Stages (Eje X e y) y Vertical stages (Eje Z)) y giratorias (Motorized Rotation Stages). Suelen mover la muestra, no la herramienta. Otros tipos serían: diafragmas, atenuadores, espejos y actuadores motorizados. Las herramientas y/o plataformas que cambian de ángulo se llaman goniómetro. Además se pueden encontrar con la opción

de trabajar en vacío.

En cuanto al tipo de microscopio, nos concentraremos en los microscopios ópticos (o de luz) ya sean estereos, macros, digitales o simples. Estos microscopios suelen tener un aumento máximo 1250x con una resolución teórica máxima de 0,250 micrómetros (250 nm) [39]. En este proyecto la resolución máxima buscada es de 10 micrómetros, por lo que microscopios más avanzados serían inútiles. Con técnicas más complejas como microscopia confocal estas resoluciones puede aumentarse pero siempre estarán limitadas por la difracción. Por ello no se analizaran microscopios electrónicos ni de ningún tipo avanzado. Hacemos la siguiente clasificación de los tipos de microscopios ópticos o de luz utilizados [40]

- **Microscopio vertical:** Se utiliza para observar los especímenes por encima. La variedad de este tipo son enormes, y su utilización sirve desde la innovación hasta la educación.
- **Microscopio invertido:** Se utiliza para observar los especímenes desde abajo. Son muy utilizados en la observación de cultivos de células.
- **Microscopios polarizados,** de contraste de fase, epifluorescente, confocal: Están basados en la polarización de las luz, filtros, contrastes , fluorescencias o el escaneo laser para mejorar las resoluciones. No se analizaran en este proyecto.
- **Microscopio digital:** Este tipo de microscopios disponen de cámaras digitales para observar y analizar muestras a través del ordenador. Con este microscopio y el software adecuado se puede por ejemplo medir distancias y áreas o, cuantificar manchas/especímenes de forma semi-automática. Un tipo concreto de microscopio digital es el de baja potencia y bajo coste, llamado microscopio USB. Utilizan como cámara una webcam equipada con macro-lentes. La iluminación es directa, normalmente a través de LED de alta luminosidad acoplados al propio microscopio. Por su bajo coste se ha elegido este tipo para el proyecto.

Se pretende realizar un sistema de orientación que mueva el microscopio y las herramientas, dejando inmóvil la muestra. En las siguientes secciones se analiza las características técnicas de algunos de sus modelos con el fin de poder comparar y mejorar el presente proyecto.

### 2.1.1. Leica

Actualmente Leica [41] es una marca comercial y cuatro son las compañías independientes entre si las que comparten la misma marca. Estas son: Leica

Camera, Leica Geosystems, Leica Biosystems y Leica Microsystems. Las dos compañías que nos interesan son Leica Biosystems, la cual desarrolla y distribuye máquinas de diagnóstico para el mercado médico además de instrumentación de investigación; y Leica Microsystems, ambas divisiones de la Danaher Corporation, un gran holding de empresas tecnológicas. Leica Microsystems es fabricante de microscopios y equipamiento de preparación de muestras para los mismos. A día de hoy la empresa tiene 10 fábricas en 8 países y distribuidores en unos 100 países. Emplea a un total de 4000 personas y su sede se encuentra en Wetzlar (Alemania) [42].

Los sistemas de Leica son modulares, es decir, se pueden configurar según los requerimientos específicos de cada laboratorio. Las categorías de estudio son: microscopios ópticos, microscopios estereoscópico, macroscopios y microscopios digitales. Las categorías de microscopios confocales, EM Sample Prep, microscopios de super resolución, microscopios de cirugía por ejemplo no se estudiarán ya que no se puede aplicar la micromanipulación o es mucho más complejo. Ocurrirá de manera similar en las demás compañías analizadas [43]. Vamos describir 3 modelos de esta marca que serían los más interesantes desde el punto de vista de las especificaciones.

### **Leica DMS1000 B**

Interesante por la característica de ser digital. Este modelo se utiliza sobre todo para trabajar en cabinas de flujo laminar como las requeridas para fecundación *in vitro* o cultivo de células. Las cabinas de flujo cerrado minimizan el riesgo de contaminación cruzada en las muestras. La Leica DMS1000 B tiene un aumento óptico de hasta 300x y una cámara HD que puede grabar en directo hasta 30 fps y tomar imágenes con una resolución de 5 megapíxeles. La unidad puede ser utilizada sola sin necesidad de un ordenador. Se puede además configurar con un mando de control remoto inalámbrico [3].

#### **Especificaciones interesantes**

- Distancia de trabajo: 303 a 27 mm
- Zoom: x18 a x150
- Tamaño de Pixel (resolución): 3,34 m x 3,34 m
- Grabación de vídeo (Full HD):  $1920 \times 1080 - 50 \text{ Hz} / 60 \text{ Hz} / 25 \text{ Hz} / 30 \text{ Hz} - 30 \text{ fps}$



Figura 2.1: Leica DMS1000B. Fuente:[3]

### Leica DM IL LED

Es el modelo adaptado para micromanipulación (recomendado por Leica). Esta recomendado para micromanipulación, cultivo de tejido y células y examen de células vivas y esta certificado para diagnósticos especiales in vitro,(in-vitro-diagnostics ,IVD) como fecundación in vitro. Dispone de una iluminación LED de 5W de alto contraste e intensidad con más 50000 horas de vida. Esta iluminación tiene una temperatura de color constante y el brillo se ajusta automáticamente según el método de contraste seleccionado. Los micromanipuladores pueden ser eléctricos o hidráulicos [4].

#### Especificaciones interesantes

- Distancia de trabajo: 40 mm
- Zoom: HC objectives: 2.5x–100x
- Base: A elegir entre tres: base fija con tres puntos de apoyo de 248 x 212 x 20 mm o Plataforma caliente 248 x 212 x 20 mm incluyendo el TempControl 2000 o plataforma de 3 ejes.
- Campo de visión: 20 mm x 20 mm



Figura 2.2: Leica DMi8. Fuente: [4]

### Leica DMi8

La principal cualidad de este microscopio es su adaptabilidad. Es modular y puede ir adaptándose según los requerimientos. Esto lo hace bastante interesante desde el punto de vista del proyecto [5].

La adaptaciones para micromanipulación depende de las compañías suministradoras. La versión con micromanipuladores motorizados de Eppendorf por ejemplo para tareas de la transferencia de células madre embrionarias tiene como especificaciones [6]:

- Leica DMi8 con enfoque motorizado con cambio de objetivo
- Pantalla táctil
- Objetivos 10x, 20x, 40x
- Sistema Integrado de modulación de contraste y fase de contraste.
- Base motorizada de 3 ejes
- Leica DFC290 HD camera

Por otra parte, la motorización hecha por Narishige usa una combinación de motorización hidráulica con sistemas manuales. Esta pensada especialmente para ICSI ([6]):



Figura 2.3: Leica DMi8. Fuente: [5] .

- Leica DMi8 con enfoque manual con cambio de objetivo
- Objetivos 10x, 20x, 40x
- Sistema Integrado de modulación de contraste
- Base Manual de tres ejes
- Leica MATS 37°C (plataforma caliente)
- Leica DFC290 HD camera

### 2.1.2. Nikon

Nikon Corporation es una empresa multinacional especializada en óptica e imagen. Su sede esta en Tokyo, Japón, y tiene 24000 empleados (según datos del 2011)[44]. Es una subsidiaria de Mitsubishi. Nikon en su división instrumental, encontramos dos categorías principales: la categoría de biociencia (se estudiaran únicamente las subcatergorias de microscopios biológicos, microscopios estereoscópicos y microscopios Zoom multipropósito) y la categoría Industrial, la cual no se va a analizar [45].

Hemos elegido 3 modelos a analizar:

#### **Nikon MULTIZOOM AZ100M**

Este modelo, tanto en su versión para biociencia como para su versión industrial presenta características interesantes. Es un microscopio multipropósito. El



Figura 2.4: Leica DMI8. Fuente: [6]

control del zoom motorizado vía software es muy interesante, además también controla el movimiento vertical de la muestra [7].

- Zoom: 5x to 400x (6.25x to 500x cuando la iluminación coaxial esta montada)
- Ángulo de inclinación: 0 a 30 grados (modelo del ocular AZ-TE100/AZ-TE80)
- Distancia de trabajo 85mm
- Alta resolución y contraste tanto para regiones macro y micro.
- Muchos métodos de contraste soportados: epi-fluorescence, campo oscuro, simple POL y contraste de interferencia diferencial por ejemplo.
- Detención automática de la lente de aumento según las tres disponibles.
- Comunicación con el PC y controladores DS-L2 y DS-U2 para la cámara digital



Figura 2.5: Nikon AZ100M.Fuente: [7]

### Nikon ECLIPSE Ti-U

El Eclipse Ti-U es el modelo más popular de microscopio invertido de Nikon. Esta diseñado para ser configurado con componentes adicionales motorizados. Usa la óptica Nikon CFI60 lo que permite utilizar diferentes métodos de contraste: campo claro, campo oscuro, fluorescente, contraste de fase, DIC y modulación del contraste [8]. Para micromanipulación se le acopla el sistema NT-88-V3 [10]. Las especificaciones interesantes para este modelo son:

- Distancia de trabajo
- Ajuste (manual): up 8mm, down 3mm
- Ajuste grueso: 5.0mm/rotation
- Ajuste fino: 0.1mm/rotation
- Mínimo ajuste: 1 $\mu$ m
- Aumentos CFI60 objetivos ,CFI 10x, 12.5x, 15x
- Base: Modelo TI-S-ER Motorizado con Encoders



Figura 2.6: Nikon ECLIPSE Ti-U. Fuente: [8]

#### Nikon ECLIPSE FN1

Es el modelo más universal de modo vertical (no invertido) de Nikon. Se utiliza sobre todo para investigación electrofisiológica. Se caracteriza por una gran claridad de las muestras en los experimentos de técnica de fijación de membranas (patch-clamp). Se incluye una luz IR para observar especímenes en profundidad de forma clara [9].



Figura 2.7: Nikon ECLIPSE FN1. Fuente: [9]

Otros campos en los que se usa este modelo son: fertilización *in vitro*, ICSI, semiconductor y para fabricación de FPD (flat panel display). Estos micromanipuladores ofrecen múltiples adaptadores, accesorios y equipo. Las especifica-

ciones interesantes de este modelo son:

- Ajuste: 30mm (en el eje X,Y)
- Aumentos: objetivos CFI60 ,CFI 10x, 12.5x, 15x periférico.



Figura 2.8: Nikon ECLIPSE FN1. Fuente: [9]

### Modelo NT-88-V3

El sistema de micromanipulación NT-88-V3 [10] desarrollado por Nikon and Narishige fue una respuesta al crecimiento del mercado de IVF/ICSI. Los fabricantes son Narishige (parte del micromanipulador) y Tokai Hit (parte de la termobase). Las características principales de este sistema son:

- Diseño compacto (la mitad de los modelos convencionales).
- Distancia reducida en la montura del manipulador para incrementar la estabilidad.
- Joystick de tipo *colgante* para una mayor operabilidad.
- Medidor de ángulo incorporado en la junta universal para asegurar la inclinación.
- Combinación de un motorización eléctrica para el manejo del manipulador en combinación con un sistema hidráulico de ajuste fino.
- Equipado con mecanismos para el retroceso de microelectrodos para el fácil intercambio de las placas de Petri.



Figura 2.9: Nikon-NT-88-V3. Fuente: [10]



Figura 2.10: Axio-Vert A1. Fuente: [11].

### 2.1.3. Carl Zeiss

Carl Zeiss es una compañía alemana fabricante de sistemas ópticos , medidas industriales y dispositivos médicos, fundada en Jena por el famoso óptico Carl Zeiss en 1846. La sede de Carl Zeiss Microscopy sigue en Jena. Otros lugares donde se desarrolla y se produce es en Goettingen, Munich, Oberkochen, Cambridge and Peabody [46]. Como en los casos anteriores, se va a estudiar solo la categoría de microscopios ópticos, dejando el resto.

#### Zeiss Axio Vert.A1

Es un microscopio compacto para la investigación de cultivos de células. Es lo suficientemente compacto para estar dentro de incubadoras y mantener a las células en un ambiente protegido [11].

### **Zeiss Axio Observer**

Es un modelo de microscopio invertido para la investigación de células vivas. Tiene varios grados de automatización y múltiples accesorios. Se puede completar con sistemas accesorios. Uno de ellos son los módulos de incubación. En ellos se regula la temperatura, el CO<sub>2</sub> y concentración de oxígeno. La atmósfera creada para los experimentos de células vivas es controlada por software [12]. Una de sus características principales es la flexibilidad, y se debe a las siguientes especificaciones:

- Las distintas motorizaciones tanto para el eje z, el obturador luz transmitida, la unidad de condensador o de obturación luz reflejada. Una vez alcanzan la posición indicada, los motores se desconectan. Esta función da una estabilidad adicional.
- Se mueve el objetivo en lugar de la muestra cuando este está centrado.
- Se puede acceder al espacio de trabajo es accesible desde los lados y el frente, y se puede ampliar a más de 100 mm.
- Objetivos de tipo LD Plan-APOCHROMAT 20x / 1,0. Permite penetrar en el tejido con una profundidad de hasta 6 mm en un escaneo láser o multifotónica microscopio confocal.
- Iluminación oblicua se puede girar a través de 360 grados.

#### **2.1.4. Olympus**

Olympus Corporation es otra compañía japonesa de óptica y productos reproductivos. Se fundó en Octubre de 1912 y es líder en endoscopios gastrointestinales. Tiene su sede Shinjuku, Tokio, Japón [47]. Igualmente, se estudia el catálogo de microscopios ópticos (Invertidos o no) seleccionando algunos de los más interesantes para el proyecto y dejando el resto de categorías.

#### **Olympus BX61WI/BX51WI**

Microscopio vertical para todo tipo de experimentos fisiológicos como la técnica de fijación de membranas (patch clamping) y microscopía intravital. La base fija y el marco antivibraciones asegura una alta estabilidad en los experimentos.

#### **Olympus IX73 y Olympus IX83**

Estos microscopios de tipo invertido permiten la adaptación de sistema de micromanipulación [14] [48].



Figura 2.11: Axio Observer. Fuente: [12].



Figura 2.12: Olympus BX61WI/BX51WI. Fuente:[13]



Figura 2.13: Olympus IX73. Fuente:[14]

### 2.1.5. Suministradores de micromanipuladores

Los suministradores son las compañías encargadas de fabricar los componentes de los micromanipuladores para las compañías de microscopios. Estos componentes son habitualmente fabricados en exclusiva para un modelo de microscopio u otro, aunque dichos suministradores también poseen en su catálogo piezas compatibles, adaptables a cualquier tipo de microscopio óptico.

#### Narishige

Narishige Group es una compañía japonesa fundada en 1953. Es distribuidora de una enorme variedad de micromanipuladores y otros productos, utilizado en investigación zoología, fisiología y biotecnología. Según la propia descripción de la compañía, un micromanipulador debe ser compacto para poder operar en muchos modelos sin perder operatividad. Normalmente los manipuladores motorizados de ajuste grueso y los micromanipuladores de tres ejes de ajuste fino, tienen su propio joystick [49].

Los típicos usos para los micromanipuladores son: La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), microinyección de ADN y otras sustancias en las células, trasplante nuclear (clonación) y el posicionamiento de los electrodos microscópicos en las superficies de las células para las mediciones electrofisiológicas (patch clamp). A la hora de escoger un micromanipulador, hay que tener en cuenta:

- Microscopio
- Adaptadores de montaje para el microscopio seleccionado

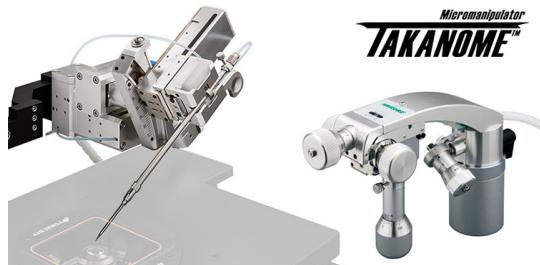


Figura 2.14: MTK-1-O1/O2/O3/N1/Z1/Z2/L1/L2. Fuente:[15]

- Manipuladores: rangos grandes y pequeños.
- Equipamiento y herramientas: como por ejemplo el microinyector.
- Accesorios: mesa antivibraciones, video monitor, etc.

De todos los productos, vamos a destacar:

#### **MTK-1-O1/O2/O3/N1/Z1/Z2/L1/L2**

Es un micromanipulador hidráulico de 4 grados de libertad con joystick colgante. Es específico para la tareas del manejo de células en suspensión. Dispone de un sistema que impide el retorno del movimiento, fijando la pipeta en posición. El joystick hidráulico mueve el micromanipulador de forma suave. Este manipulador alinea la pipeta con el eje óptico, evitando gastar tiempo en esta tarea y permitiendo más tiempo al trabajo de operación. [15].

Este producto cumple con Class.1 MDD 93/42/EEC, directiva europea para dispositivos médicos. Este modelo es compatible con los siguientes modelos de microscopios (algunos ya descatalogados, otros analizados en los subapartados anteriores)[15]:

- Olympus: IX70 para MTK-1-O1, IX71 para MTK-1-O2, IX73-IX83 para MTK-1-O3
- Nikon: ECLIPSE TE2000, ECLIPSE Ti para MTK-1-N1
- Carl Zeiss: Axiovert 200, Axio Observer para MTK-1-Z1, Axio Vert.A1 para MTK-1-Z2
- Leica: DMI3000 B, DMI4000 B, DMI6000 B para MTK-1-L1

#### **Eppendorf**

Eppendorf, compañía con sede en Hamburgo(Alemania) desarrolla productos y servicios para laboratorios. Estos productos se usan en investigaciones académicas e investigaciones industriales de temática diversa como farmacéutica, biotecnología, química y alimentación. También tiene mucha importancia el



Figura 2.15: Eppendorf InjectMan 4. Fuente:[16]

uso en laboratorios clínicos y de análisis medioambiental, uso forense, procesos industriales, certificación de calidad, etc. Durante la década de 1960, el enfoque holístico utilizado para el sistema microlitro Eppendorf establece nuevos estándares en el mundo del laboratorio [50]. Su sistema perfectamente armonizado para la dosificación, mezclado, templado, centrifugación, refrigeración, separación, almacenamiento y transporte de muestras sigue siendo un elemento central en el trabajo de laboratorio de hoy. La empresa sigue en plena expansión. Eppendorf también vende consumibles de laboratorios [51].

El catálogo incluye: Pipeteo automatizado, Equipos para bioprocessos, Manipulación de células, centrifugación, incubadores de CO<sub>2</sub>, Detección, Congeladores, Puntas, tubos y placas, pipeteo ,PCR, Agitadores, Mezcladores y control de temperatura, consumibles de cultivo e Imagen Celular [52]. Los adaptadores de microscopio de Eppendorf permiten la instalación de sus sistemas de micromanipulación en la mayoría de microscopios invertidos convencionales fabricados por Leica, Nikon, Olympus y Zeiss.

#### **Eppendorf InjectMan 4**

El InjectMan4 es un sistema para la microinyección en células adherentes, organismos más pequeños y embriones en las fases tempranas del desarrollo. En combinación con el FemtoJet 4i o 4x (micrinyectores de Eppendorf) permite una inyección rápida semiautomática. El sistema incluye un movimiento de inyección axial que garantiza la protección de células sensibles. La velocidad de penetración rápida hace que la inyección en estructuras rígidas sea fácil. El software de control incluye diferentes interfaces de aplicación predefinidas que ayuda en el flujo de trabajo individual según el tipo de tarea: para inyección de células adherentes, microinyección en serie en larvas de peces, etc. Los motores pueden desacoplarse electrónicamente para evitar el movimiento accidental de la micropipeta [16].

#### **Especificaciones mecánicas:**

- Máx. distancia de desplazamiento: ≥ 20mm.

- Peso (completo): 2.15kg.
- Ancho de paso: <20 nm (resolución computacional).
- Velocidad: 0 – 10.000  $\mu\text{m}/\text{s}$ .
- Capacidad de adaptación mecánica: >80 mm.
- Dimensiones: 129 mm x 51 mm x 36 mm.
- Peso: 570g.
- Dirección de rotación: -45° – +90°.
- Ángulo de trabajo: 0° – 90°.

**Características interesantes:**

- La estabilidad máxima garantiza un trabajo libre de vibraciones.
- Operación con una sola mano para manipulación de capilares y programación de ángulos .
- Límite del eje Z programable para evitar la rotura capilar
- Conexión con el Eppendorf PiezoXpert® y microinyectores electrónicos FemtoJet 4i/4x
- Control remoto (mediante ordenador).

**Aplicaciones interesantes:**

- Microinyección semiautomática en células adherentes
- Microinyección en serie en larvas de peces, óvulos de rana, embriones de insectos, etc.
- Inyección en células de plantas vivas, C.elegans y otros ascárides y platelmintos

**Eppendorf TransferMan 4r**

Es el micromanipulador más popular de Eppendorf. Incluye funciones inteligentes, tales como la función *Home* vuelta automática al origen y el almacenamiento de posición. Este micromanipulador esta diseñado para la manipulación de ovocitos y embriones de fase temprana, transferencia de células madre y micropartículas, y una amplia gama de aplicaciones de la biología reproductiva [17].

**Aplicaciones:**

- Micromanipulación de ovocitos y embriones de fase temprana
- Transferencia ES e iPS



Figura 2.16: Eppendorf TransferMan 4r. Fuente: [17]

- Transferencia nuclear
- Producción de animales transgénicos utilizando inyección pronuclear y citoplasmática (p.ej., CRISPR/Cas, TALEN)
- Selección de células individuales (p.ej., biopsias)
- Posicionamiento y selección de micropartículas
- Microdisección de cromosomas, etc.

Existen muchas más empresas de optomecánica que las dos anteriores, pero describir las todas sobrepasa los objetivos de este proyecto. Podemos citar entre otras a STANDA, Edmund Optics y Thorlabs y algunas de las más nuevas como Micro Control Instruments o Imina Technologies. Actualmente también están apareciendo nuevos fabricantes de origen chino

## 2.2. Introducción a las máquinas CNC

Una máquina de control numérico por computador (CNC) dispone de un sistema electrónico que automatiza las tareas a realizar. En las máquinas herramienta, la principal aplicación de las CNC es controlar la posición relativa de la herramienta respecto a las piezas a tratar. Esta sigue las instrucciones contenidas en un programa previamente realizado. [53] Se pueden clasificar las instrucciones en:

- Movimientos (rotaciones y desplazamientos)
- Valor de velocidades
- Cambios de herramientas

- Cambios de piezas
- Condiciones de funcionamiento

Además el tener un ordenador dedicado al control de la maquina da múltiples ventajas como:

- Capacidad de almacenamiento de varios programas
- Posibilidad de utilizar macros y subrutinas
- Corrección automática de movimientos detectados por elementos de medición.

El posicionamiento controlado por ordenador tiene ya una larga historia. Las máquinas con control numérico por ordenador empezaron a construirse en la décadas de los años cuarenta y cincuenta del siglo XX en los Estados Unidos. Actualmente su uso esta completamente generalizado en la industria, donde se usan en el mecanizado de todo tipos de piezas. Dependiendo de la complejidad de dichas piezas, se utilizan máquinas de 3, 4, 5 y más ejes. En grandes máquinas se pueden encontrar servomotores y encoder (sistemas de control de bucle cerrado) para evitar el huelgo y aumentar así la precisión de las mismas [54].

Podemos listar algunas típicas máquinas CNC:

- Fresadoras
- Tornos
- Cortadoras de plasma, laser, etc.
- Máquinas de soldaje EDM

En los últimos 5 años, gracias al concepto de Open Hardware (ver sección 2.3) se han popularizado diferentes tarjetas controladoras de usos múltiple que han hecho que grupos de aficionados y semiprofesionales en todo el mundo hayan desarrollado CNC de escritorio o domésticas.

Las tarjetas controladoras incluyen circuitos integrados programables, capaces de ejecutar programas almacenadas en su memoria. Un microcontrolador incluye en su interior las tres unidades funcionales de una computadora: Unidad central de procesamiento, memoria y periféricos de entrada/salida. Uno de los usos que más proliferaron para estas tarjetas de control fue el control del motores paso a paso. Estas se conectaba por un lado al ordenador para recibir la instrucciones y por otro a los drivers que gobiernan los motores paso a paso [55].

La evolución de las CNC ha dado lugar a máquinas CNC de prototipado rápido mediante fabricación aditiva, o como se las conoce popularmente, impresoras 3D [56]. Estas máquinas se caracterizan por tener una electrónica y mecánica de bajo coste pero precisas en las escalas de los micrómetros. La popularidad

de estos sistemas hace que la documentación disponible sea muy abundante y los precios de los dispositivos (placas, drivers, sensores,etc) muy bajos. Es por esta razón se ha elegido una máquina CNC como base del sistema de micromanipulación de proyecto.

### 2.3. Los paradigma de Open Source y tecnología apropiada

El concepto de Open Source(OS)([57]) establece básicamente eliminar las barreras que para cualquier tecnólogo existen a la hora de acceder a las fuentes de los diferentes sistemas tecnológicos. Debido a que en este proyecto se pretende fomentar el uso de aparatos de micromanipulación en los laboratorios y esto actualmente no es posible debido al alto coste de los mismos, se plantea como modelo de desarrollo el OS : que los planos estén abiertos hace que no se dependa de los pocos fabricantes, lo que hace que se baje el precio, los sistemas serán más baratos, estarán más difundidos.

Aparte de la consecuente difusión, el OS incluye el concepto del desarrollo colaborativo. Cada nuevo desarrollo y posterior subida a la red hace que las soluciones disponibles crezcan. Además, con este modelo se pretende evitar la perniciosa paradoja de reinvencción de la rueda; que no es sino invertir esfuerzos en inventar algo que previamente ya existía, pero al que no se podía tener acceso.

Actualmente hay un interesante debate abierto sobre si el Open Source atenta contra la propiedad intelectual o la complementa. Según la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual ([58]), la propiedad intelectual (P.I.) se relaciona con las creaciones de la mente: invenciones, obras literarias y artísticas, así como símbolos, nombres e imágenes utilizados en el comercio.

Hay múltiples formas en que la legislación nacional, europea y mundial protege la P.I. Las más famosas son las patentes, el derecho de autor y las marcas. Estas permiten obtener reconocimiento o ganancias por las invenciones o creaciones. Se intenta buscar un equilibrio entre el interés de los innovadores (lucro privado derivado de los esfuerzos de la invención) y el interés público (educativo y científico).

El problema que se plantea estos últimos años ha sido la rotura de dicho equilibrio: las empresas como entes que buscan un beneficio privado, evitan la difusión de los conocimientos adquiridos, saliendo gravemente perjudicado el interés público. En “Un manifiesto sobre la OMPI y el Futuro de la Propiedad Intelectual” ([59]) , el profesor James Boyle expone algunos argumentos sobre la pérdida de estos equilibrios y la necesidad de nuevas alternativas. Los argumentos expuestos serían el adecuado equilibrio entre material protegido y

## **2.3. LOS PARADIGMA DE OPEN SOURCE Y TECNOLOGÍA APROPIADA29**

dominio publico, proporcionalidad en los costes que acarrea la ley de propiedad intelectual sobre lo público, la adecuación de la ley al desarrollo económico del país, participación y transparencia en su regulación, apertura y fomento de nuevas alternativas a las formas de protección ya establecidas como fomento de la actividad intelectual creativa, aprovechar internet como oportunidad de innovación y no como amenaza y neutralidad ante las diferentes formas de propiedad intelectual. El desarrollo de los medicamentos es un ejemplo claro y que se puede relacionar con este proyecto: la investigación médica requiere de una alta inversión (normalmente privada). Esta se recupera a través del precio de las ventas de los medicamentos en los países desarrollados. Sin embargo un precio alto supone una falta de acceso a las mismas de una gran parte de la población mundial (países subdesarrollados). El interés privado entra en conflicto directo con el bienestar de estos ciudadanos. Con las máquinas de investigación pasaría exactamente igual a un nivel mucho menor: sin máquinas de investigación no puede haber progreso en ciencia.

Otros conceptos interesantes son el de Tecnología Intermedia o Apropriada ([60]). El concepto de tecnología intermedia es un movimiento ideológico planteado por el economista Ernst Friedrich “Fritz” Shumacher en su obra “Small is Beautiful”, [61]. Aunque orientado más bien a tecnología agrícola y energética para países en vías de desarrollo, su principios son validos también en este proyecto, ya que la mayoría de experimentos realizados en un laboratorio no requieren de una gran complejidad y no hay una tecnología intermedia entre los complejos manipuladores de altísimo coste y la manipulación manual. El concepto de tecnología intermedia además ha resurgido en estos últimos años uniéndose al OS, como tecnología intermedia de fuente libre (OSIT en sus siglas en inglés,[62]). También se menciona el concepto obsolescencia programada, o limitación de la vida útil de las máquinas que las empresas planifican, habitualmente a través de la falta de repuestos. Con el Open Source esto se evita ya que tenemos la fabricación de cada pieza de forma independiente y libre. Es interesante destacar algunos ejemplos en la lucha contra dicha obsolescencia como la nueva legislación francesa sobre el tema [63].

### **2.3.1. Principales proyectos recientes Open Source**

Más allá del software, con sistemas operativos como Ubuntu Linux y la enorme gama de software productivo (LibreOffice, FreeCAD, Gimp, Blender, Inkscape, Libre-CAD), tenemos proyectos de Open Hardware (dispositivos físicos de fuente libre) mundialmente conocidos. Por ejemplo se tienen la plataforma Arduino, una suite de microcontroladoras y PCBs de diseño libre para múltiples propósitos, el proyecto Reprap de impresoras 3D o la RaspberryPi. Este hardware libre suele desembocar en otros proyectos. Citar por ejemplo el proyecto E-nable, dedicado a hacer diseños de prótesis para personas con discapacidad, las cuales se personalizan para cada paciente y se imprimen en 3D [64].

A continuación se listan algunos otros proyectos OpenSource relacionados

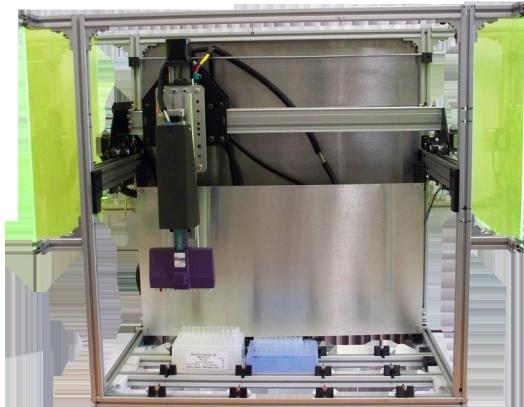


Figura 2.17: OpenTrons V1.

con la medicina o la biología:

- **OpenTrons:** Es uno de los proyectos más parecidos a este y uno de los más importantes a nivel mundial. Es un robot de tipo manejo de líquidos (liquid handling), es decir, succiona líquido de un vial para transportarlo a otro con una pipeta ([65]). Este proyecto se anunció en Noviembre de 2014, dos meses después de que se aprobase este proyecto. Esto se debe a que el equipo promotor se dio cuenta de que los biólogos gastan demasiado tiempo en hacer estas tareas manualmente ya que las máquinas automatizadas son demasiados caras. Este “Micropipetting” es muy repetitivo, lo que lleva a errores y un consumo de tiempo excesivo de los investigadores, bajando el desarrollo de sus proyectos.

Usa una electrónica RaspberryPi y un software basado en Java. Más de 235 personas o instituciones respaldaron el proyecto, recaudando un total de 126,694 dolares a través de la plataforma Kickstarter.

Las completas especificaciones de esta maquina son:

- Raspberry Pi con WiFi.
- Software OpenTrons open-source basado NodeJS preinstalado.
- Estructura en aluminio industrial.
- Dimensiones aproximadas: 60 x 60 x 60 cm, peso de unos 27 kg.
- Resolución: 100 micrómetros en los ejes XYZ. Placa de control Smoothieboard y 5 motores paso a paso. No especifica nada de la mecánica aunque parece ser por correas.
- Capacidad: 15 placas de columnas de viales (SPE well-plate). 100 aluminio para facilitar la esterilización.
- Sistema de montaje rápido.

### 2.3. LOS PARADIGMA DE OPEN SOURCE Y TECNOLOGÍA APROPIADA31

- Transporte de líquidos: Un único motor para montar una micropipeta, ya sea sola o multicanal. Precisión de microlitros

Otros accesorios que se pueden incluir en el pack inicial son:

- **Montura para dos micropipetas:** Trabaja con protocolos que requieren 2 diferentes en el mismo trabajo.
- **8-Channel Micropipette:** 8 transferencias a la misma vez.
- **Camara interior:** para futuras aplicaciones incluidas monitorización, auto posicionamientos, confirmación de procesos, etc. Una idea que esta compañía quiere poner en practica es Mix.Bio, la primera comunidad para compartir desarrollos en el proceso automatizado de protocolos biológicos.
- **Synbiota kit** (suministrado por una de las empresas patrocinadoras del equipo,[66]). Este kit consiste en ensamblar un diseño de ADN a partir de bloques genéticos modulares y reiniciar una bacterias con estos cambio de forma que brille en la oscuridad. El kit incluye según la propia web 4 “Genomikon” bloques de ADN: una Anchor (ancla), un Linker (Conector),un gen de proteína roja fluorescente copiada de un coral rosa y una Cap(tapa) que completa el plasmanido. Esta basado en el paradigma de Rapid DNA Prototyping (RDP), que es cada vez más popular estándar OS para biología sintética. Desarrollado por el profesor Professor Michael Ellison, del departamento de Bioquímica de la Universidad de Alberta, el RDP fue premiado como el “Best Foundational Advance” en el 2009 International Genetically Engineered Machines competition del MIT. En este nuevo paradigma, los “bioinnovadores” tienen la capacidad de diseñar, crear, validar, y conectar sofisticados circuitos multicomponentes con rapidez y flexibilidad.
- **E-Health:** The e-Health Sensor Shield V2.0 permite a Arduino y Raspberry Pi usuarios mejorar aplicaciones biométricas y médicas donde la monitorización del cuerpo es necesaria. La placa usa 10 tipos de sensores diferentes: pulso, oxígeno en sangre (SPO2), flujo de aire(respiración), temperatura corporal, electrocardiograma (ECG), glucómetro, respuesta galvánica de la piel (GSR – sudoración), presión de la sangre, posición del paciente (acelerómetro) y sensor muscular(EMG) [67].
- **OpenBrain:** Es una plataforma pensada para compartir y colaborar en desarrollos de modelos computacionales de sistemas neuronales [68].
- **OpenBCI:** Son las siglas de open-source brain-computer interface (BCI), interfaz cerebro-ordenador Open Source. La placa OpenBCI es una versátil placa microcontroladora que puede ser usada para registrar la actividad

eléctrica del cerebro (EEG), actividad muscular (EMG), frecuencia cardíaca (EKG), etc. La placa es compatible con la mayoría de electrodos y esta apoyada por un framework Open Source para el procesado de señales [69].

- **OpenPCR:** Preciso thermocycler de bajo coste y tipo “hazlo tu mismo”, con capacidad para control fiable del PCR, reacciones para detención del ADN, secuenciación, etc. [70]
- **OpenTricorder:** Un tricorder médico es un dispositivo portátil que puede ser usado por cualquier persona para auto diagnosticar sus condiciones médicas y tomar medidas de sus signos vitales. El desarrollador, Peter Jansen (PhD), tiene varias versiones llamada OpenTricorder, aunque de momento solo para datos. Del mismo desarrollador es un CT scanner open-source (escáner de tomografía axial computerizada) [71]
- **Roboroach:** Electrónica y software para el control electrónico de una cucaracha viva. Se vende como una plataforma educativa sobre el funcionamiento neuronal [72].
- **OpenWorm:** Proyecto dedicado a crear un gusano virtual replica del original biológico. Para ello se establece que la simulación sea a nivel celular. De las 959 células que posee este gusano, el C. elegans, 302 son neuronas y 95 musculares. Interesante para desarrollos posteriores de desarrollos robóticos y de inteligencia artificial [73].
- **OpenEMR, OpenEHR y otros sistemas de software libre:** para grabación de datos médicos, gestión y planificación. Es el típico software de los hospitales y centros de salud. Funciona en múltiples plataformas [74].
- **Biolabs:** A imitación de los hackerspace y makerspace, son los biolabs [75], dedicados a BioDIY, experimentadores con biología que siguen la filosofía hazlo tu mismos. También muchos makerspace/hackerspace clásicos ofrecen muchos de estos ofrecen sitio para personas interesadas en DIY BIO. Según DIYbio.org, organización dedicada a biólogos DIY, actualmente hay 15 DIY grupos en América del Norte, 11 en Europa, dos en Asia, y dos en Australia/New Zealand. Cabe destacar el DIYBCN, en único en España situado en Barcelona. Entre sus proyectos destacan la creación de equipamiento para laboratorio Open Source como una centrifugadora, una bomba de inyección o un espectrómetro. También tiene un proyecto de para crear kit de investigación de antibióticos Open Source o bombillas bioluminiscentes.

## Capítulo 3

# Diseño e implementación del sistema mecánico

En este capítulo se va a describir cómo se ha realizado el análisis y diseño de la parte mecánica del proyecto y cómo se ha llevado a cabo su implementación. Este sistema se divide en dos subsistemas:

- Subsistema de posicionamiento cartesiano
- Subsistema de orientación

El subsistema de posicionamiento cartesiano está basado en un dispositivo comercial denominado CNC y es la parte encargada de mover la plataforma con el microscopio por encima de la muestra. Este sistema proporciona los tres primeros ejes.

El subsistema de orientación es el encargado de otorgar el cuarto y quinto eje (posicionamiento angular). Esta es la parte del proyecto que más diseño e innovación ha requerido.

El esquema de este sistema sería el siguiente:

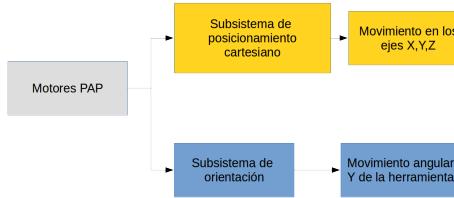


Figura 3.1: Esquema general del sistema mecánico.

### 3.1. Sistema motorizado de posicionamiento cartesiano

En esta sección se justifica la elección de la máquina de posicionamiento cartesiano y sus características técnicas además de realizar el cálculo de la resolución mecánica de la máquina analizando el tipo de motor eléctrico empleado en la máquina y el tipo de accionamiento lineal.

#### 3.1.1. Elección del modelo

Para realizar este sistema existen tres opciones principales:

- Comprar una máquina completa comercial.
- Comprar una maquina en kit (en inglés Do-Your-Self, DIY), para montar como ShapeOKO etc. [76]
- Diseñar la maquina desde cero.

### 3.1. SISTEMA MOTORIZADO DE POSICIONAMIENTO CARTESIANO35



Figura 3.2: ShapeOKO, fresadora CNC para montar en casa. Fuente:[18]

Como el diseño desde cero de una plataforma cartesiana es un proyecto de gran magnitud y las máquinas en kit eran más costosas, se decidió por una comercial pequeña para hobby (no profesional).

Este tipo de máquina es suministrada principalmente por vendedores a través de plataformas de comercio online para realizar trabajos de fresado. Cuando el uso de la máquina es no profesional, los materiales de trabajo suelen ser blandos (MDF, madera, PV, Acrylico) debido al taladro de poca potencia que posee la máquina, que habitualmente oscila entre 200 y 500W.

El modelo elegido se denomina CNC3020T. Múltiples empresas venden este modelo bajo su propia marca. Es una máquina de 4 ejes donde la herramienta (4 ejes) pilota sobre el XYZ. La descripción y las imágenes facilitadas en el la web del vendedor son [77]:



Figura 3.3: Foto del modelo CNC3020T. Fuente:[19].

36 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO



Figura 3.4: Foto del modelo CNC3020T. Fuente:[19]

### 3.1. SISTEMA MOTORIZADO DE POSICIONAMIENTO CARTESIANO37

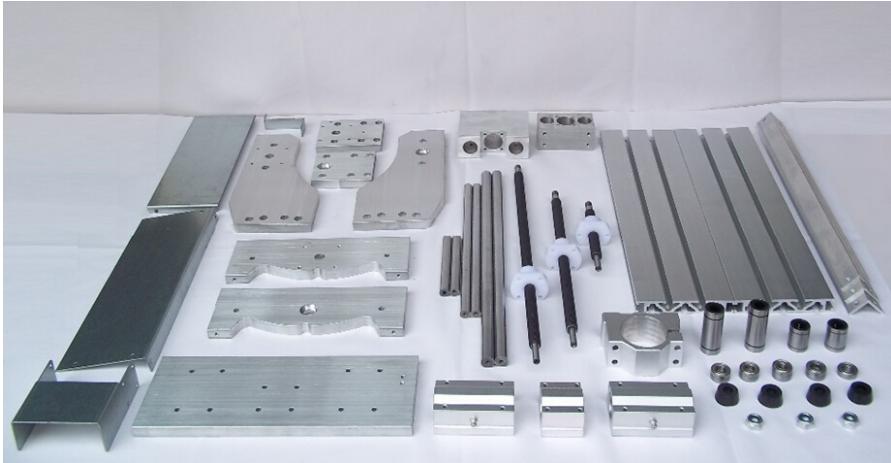


Figura 3.5: Foto del modelo CNC3020T. Fuente:[19]

EL modelo de la máquina indica el tamaño del área del trabajo: 3020 es un área de trabajo de 300x200 mm. Este modelo es el más pequeño y sigue siendo más que suficiente para las muestras que se van a analizar. Otros modelos serían el 4030 o el 6040. Normalmente viene con la opción de añadir un cuarto eje (esto lo convertiría la CNC en un torno-fresadora y no en una fresadora simple), cambiar el taladro por otro con más potencia (se han visto hasta de 2KW con refrigeración de agua), electrónica con comunicación USB, etc.

Como se detalla en el capítulo 4, no se va a utilizar la electrónica que trae la máquina ya que no se adapta a las especificaciones mínimas necesarias de esta parte. Algunas de las características interesantes son:

- La garantía que ofrece el vendedor es de 1 año (la máquina viene desde China). Debido a que no se va a llevar a cabo ninguna modificación sobre la máquina, esta garantía seguiría vigente.
- El vendedor hace hincapié en la fácil instalación y uso.
- Toda la estructura está hecha en aluminio (aleación 6063 y 6061) para mayor estabilidad. Que la estructura sea reforzada y ligera hacen posible el transporte de la máquina de forma completamente segura y con una largo tiempo de vida.
- El software que se utiliza es Mach 3, adaptado a la electrónica que trae por defecto por lo que se podrá utilizar dicho software, excepto para fresar antes de desmontar el taladro.
- Se puede controlar el posicionamiento de forma manual gracias a los tiradores de los que dispone.

38 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

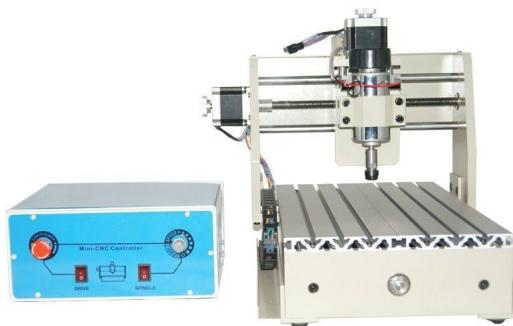


Figura 3.6: Foto del modelo CNC3020T adquirida.Fuente:[20]



Figura 3.7: Otro foto del modelo CNC3020T adquirida.Fuente:[20]

### **3.1. SISTEMA MOTORIZADO DE POSICIONAMIENTO CARTESIANO39**

- Se disponen de cubiertas de protección que reducen la polución en husillos y ejes. Esto es muy deseable para favorecer la limpieza e higiene.
- La estructura reforzada y ligera hacen posible el transporte de la máquina de forma completamente segura y con una largo tiempo de vida.
- Los ejes cromados no son fáciles de deformar, aptos para trabajos de largas horas. Sin embargo, los rodamientos que corren en estos ejes son autolubricados, y sería recomendable que fuesen secos, para evitar contaminación con las muestras.

#### **3.1.2. Especificaciones técnicas**

Los componentes que vienen de fábrica son:

- 1× Maquina de CNC (estructura)
- 1× Caja de control (electrónica)
- 1× Cable paralelo
- 1× Cable de herramienta
- 1× Caja de herramientas y fresas

Se desprecia todo excepto la estructura. Las especificaciones técnicas de la mecánica son:

- Área de trabajo efectiva: 200mmx300mmx50mm
- Dimensiones totales: 550x400x350mm
- Max.dimension de la pieza de trabajo: 200mmx300mmx65mm
- Dimensión de la mesa de Trabajo: 200mmx300mmx15mm
- Unidades conductoras (husillos en todos los ejes): 1204 tornillos de rosca trapezoidal
- Unidades deslizantes: Varillas cromadas con rodamientos lineales con recirculación de bolas autolubricados . Los diámetros de las varillas en los ejes son: eje X Dia.13mm, eje Y Dia.16mm y eje z Dia.12mm. Una posible mejora serían los sistemas de guías lineales.
- Tipo de motores paso a paso: NEMA23, modelo 57 de dos fases 1.45A-2A
- Resolución: 0.05mm
- Velocidad en vacío: 0-2500mm/min
- Peso total de la máquina: 24KG

En las siguientes subsecciones se analizarán las dos partes más importantes de este subsistema, ya que determinan la resolución mecánica.

## 40 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO



Figura 3.8: Motor paso a paso 57BYGH56-4017B del eje Y y eje X.



Figura 3.9: Motor paso a paso 57BYGH41-402B del eje Z.

### 3.1.3. Motor paso a paso

La máquina dispone de motores paso a paso híbridos de tamaño normalizado NEMA23.

La máquina CNC tiene el modelo de motor NEMA 23 57BYGH56-4017B para los motores de los ejes X e Y y el modelo NEMA 23 57BYGH41-402B para el motor del eje Z. Son motores bipolares híbridos. La diferencia entre motores unipolares y bipolares es que mientras los primeros se controlan con 5 o 6 cables siendo más sencillo el mismo, los bipolares tienen 4 y requieren el cambio de dirección del flujo de corriente a través de las bobinas, lo que se soluciona habitualmente con un puente H en los drivers. Los drivers escogidos se analizarán en el capítulo 4. Se detallan algunas de las especificaciones más interesantes [78]:

#### Modelo 57BYGH56-4017B

##### Especificaciones

- Modelo: Doble eje, similar a 57BYGH56-401A

### 3.1. SISTEMA MOTORIZADO DE POSICIONAMIENTO CARTESIANO41

- Ángulo de paso: 1.8°
- Largo del motor: 56 mm
- Corriente nominal: 2.8 A
- Resistencia de fase: 0.9 Ω
- Inductancia de fase: 2.5 mH
- Par de mantenimiento: 12.6 Kgf.cm
- Número de cables: 4
- Inercia del rotor: 300 g.cm<sup>2</sup>
- Peso: 0.7 Kg
- Exactitud del paso: ±5 % (full step, no load)
- Temperatura máxima: 80°C CMax.(ratod current,2 phase on)
- Temperatura de trabajo: -10°C a 50°C
- Clase de aislamiento: B
- Resistencia dieléctrica: 500 VCA durante un minuto
- Carga radial en el eje: 0.06Max.(450g-load)
- Carga axial en el eje: 0.08Max.(450 g-load)

El parámetro más interesante para el diseño es el paso del ángulo que es 1.8 grados. El voltaje, no especificado anteriormente lo da los drivers, pero oscila entre 12v y 36v. La fuerza no es un parámetro de importancia ya que la máquina aplicará fuerzas mínimas sobre la muestra, ejerciendo esfuerzos únicamente el propio peso de las herramientas y de la estructura. Con el paso cuantificado (1.8 grados), éste se multiplica por el paso del husillo y se divide por el número de micropasos para finalmente dar la resolución total de la máquina.

#### 3.1.4. Paso del Husillo

Se especifica que la máquina posee un sistema de husillos para el movimiento de los ejes de tipo 1204 Double Thread Trapezoidal Screw. Tras una búsqueda se ha conseguido hallar el código del modelo de husillo: SFU1204. Una traducción literal indica que el husillo es de doble rosca trapezoidal. EL código especifica que tiene 12 mm de diámetro y un paso de 4mm. Si se compara con la métrica 12, cuyo paso es de 1,75 y 1,25 en el fino, se concluye que en este caso se sacrifica precisión en favor de la velocidad. El código SFU es su código de China Ball Bearing Lead Screw (SFU SFE) [79].



Figura 3.10: Foto del husillo.

Si multiplicamos el ángulo del motor paso a paso por el paso del husillo, obtenemos la resolución mecánica. Para utilizar el paso del motor pasamos los grados (1.8 grados) a número de vueltas por paso ( $1,8/360 = 0,005$ ), ya que el paso del husillo es el recorrido lineal del diente en una vuelta.

Si hacemos la inversa de este resultado, obtenemos la cifra de 200 pasos por vuelta. Calculando entonces la resolución actual de la máquina:

$$\begin{aligned} \text{Paso del husillo: } & 4\text{mm} \\ 4\text{mm} * (1/200) &= 0,02 \text{ mm} = 20 \text{ micrometros} \end{aligned}$$

Sin utilizar micropasos esta precisión es claramente insuficiente para nuestro

requerimiento principal (recordemos que el tamaño de una célula oscila alrededor de 10 micrómetros). Una posible mejora sería sustituir por una varilla roscada M12 (para no tener que cambiar el rodamiento del eje), obteniendo:

Paso del husillo: 1.25mm, 1.75 mm

Normal:  $1.75 \text{ mm} * (1/200) = 0.00875$  Resultado Aceptable

Fino:  $1.25 \text{ mm} * (1/200) = 0.00625$  Resultado Aceptable

Si se cambiara por una varilla M8, tendríamos:

Paso del husillo: 1mm, 0.8mm

Normal:  $1 \text{ mm} * (1/200) = 0.005$  Resultado Aceptable

Fino:  $0.8 \text{ mm} * (1/200) = 0.004$  Resultado Ideal

Otra mejora sería introducir una reductora en el motor, pero por su alto precio no se contempla. Finalmente se ha optado por aplicar los micropasos para aumentar la precisión, con lo que se conserva el husillo que trae por defecto de rosca trapezoidal. Este tipo de rosca tiene más fricción que por ejemplo la rosca simple pero este es proporcionado por el fabricante debido a que soporta mejor grandes esfuerzos.

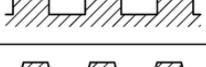
Thread Form	Figure	Uses
Unified		General use.
Metric		General use.
Square		Ideal thread for power transmission.
ACME		Stronger than the square thread.
Buttress		Designed to handle heavy forces in one direction (e.g. truck jack).

Figura 3.11: Distintos tipos de dientes del husillo. Fuente [21]

### 3.2. Subsistema de orientación

Para poder cumplir los requerimientos planteados, en este subsistema se ha diseñado todas las partes y para ello se ha seguido un proceso de prueba y error. El diseño se ha basado en una plataforma giratoria, con movimiento angular de eje paralelo al eje Z de la maquina cartesiana, y que es movida por el sistema de posicionamiento cartesiano en las tres direcciones principales.

Como se vio en el capítulo 2, la forma habitual en la que los micromanipuladores comerciales cumplen con estos requerimientos es mediante un brazo controlado de forma hidráulica con un joystick.



Figura 3.12: Micromanipulador comercial MHW-3. Fuente:[22].

El hecho diferenciador con estos sistemas es que el movimiento angular horizontal (plano XY) no es independiente del microscopio digital. Tampoco lo es el de la traslación. El de traslación no tiene importancia ya que el microscopio debe enfocar siempre a la parte que se opera. Con el giro angular ocurre de forma análoga. Siempre enfoca, pero no podemos cambiar el enfoque angular relativo con respecto a la herramienta. Esta es la principal limitación de la solución técnica elegida.

### 3.2.1. Diseño de los movimientos angulares

Son dos movimientos que van a ser objeto de estudio: el movimiento vertical de la herramienta o cambio de ángulo en el plano que contiene al eje de la plataforma y el movimiento horizontal o cambio de ángulo en el plano XY. Para realizar el movimiento angular vertical (plano que contiene al eje de la plataforma), la implementación se realiza a través del motor paso a paso que controla la inclinación con respecto a la base de la herramienta. El giro del motor corresponde con la inclinación tal y como aparece en el siguiente esquema:

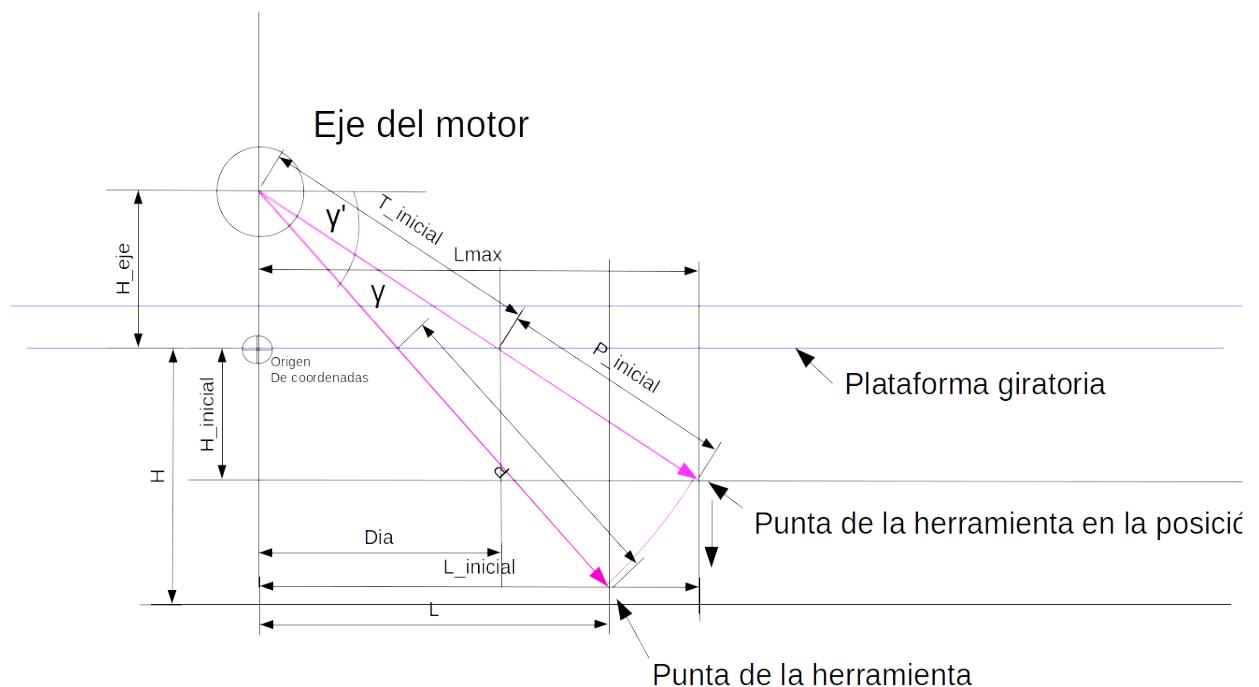


Figura 3.13: Esquema trigonométrico del movimiento angular vertical.

Se pueden hallar las relaciones entre el ángulo dado por el motor y el movimiento de la punta de la herramienta si se utilizan relaciones trigonométricas. El primer paso es calcular el ángulo que forma la herramienta en la posición inicial:

$$\tan(\gamma_i) = \frac{H_{eje}}{Dia} \quad (3.1)$$

$$T_{inicial} = \sqrt{H_{eje}^2 + Dia^2} \quad (3.2)$$

$$P_{inicial} = P_{total} - T_{inicial} \quad (3.3)$$

Donde  $P_{inicial}$  es el avance de la punta de la herramienta en la posición, que denominaremos profundidad.  $H_{eje}$  es la distancia desde el eje hasta la pla-

## 46 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

taforma y Dia, el diámetro de la abertura para herramientas de la plataforma giratoria.  $P_{total}$  es la distancia desde el eje de giro hasta la punta de la herramienta. El resto de medidas iniciales quedan definidas:

$$H_{inicial} = P_{total} * \sin(\gamma_i) - H_{eje} \quad (3.4)$$

$$L_{inicial} = P_{total} * \cos(\gamma_i) \quad (3.5)$$

$$(3.6)$$

Si se toman como  $Dia = 30mm$ ,  $H_{eje} = 35mm$  y  $P_{total} = 120mm$  se hallan las siguientes medidas iniciales:

$$\gamma_i = 54,88^\circ$$

$$Li = 69,03mm$$

$$Hi = 63,15mm$$

$$Pi = 73,9mm$$

Una vez se tienen las medidas iniciales del modelo, podemos calcular la posición de la punta de la herramienta a partir de estas en cualquier ángulo. L es la distancia en el eje X, mientras que H en el eje Z, si se toma la plataforma giratoria como origen de coordenadas.

$$H = P_{total} * \sin(\gamma) - H_{eje} = Z \quad (3.7)$$

$$L = P_{total} * \cos(\gamma) = X \quad (3.8)$$

$$P = \sqrt{Z^2 + (X - Dia)^2} \quad (3.9)$$

Se calculan los incrementos (avance de la punta de la herramienta) de forma que quedan

$$\Delta P = (P - Pi) \quad (3.10)$$

$$\Delta X = (X - Xi) \quad (3.11)$$

$$\Delta Z = (Z - Zi) \quad (3.12)$$

Los dos incrementos de movimientos en los ejes X y Z deben corregirse si se quiere mantener la punta en una posición en concreto pero variando ángulo. En este caso la herramienta no penetraría en la muestra. Si no se corrige, el cálculo de la profundidad de penetración es directamente P. La segunda opción es la escogida ya que no requiere ningún algoritmo especial por software.

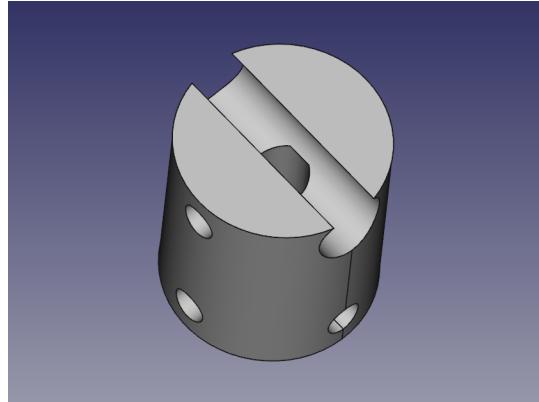


Figura 3.14: Parámetro de diseño en FreeCAD del adaptador.

El motor paso a paso se une a la plataforma mediante impresión 3D. La herramienta se acopla mediante un adaptador especialmente hecho para herramienta gracias al diseño paramétrico que se unirá al eje del motor.

Por otra parte remarcar que no habrá mayor realimentación que la visión ofrecida por el microscopio. Sin embargo se podían instalar sistemas de medición en la plataforma como sensores de altura, humedad, espectrómetros,etc.

Ahora se plantea la inclinación de la herramienta en el plano XY. El giro de la plataforma se puede llevar a cabo a través de varios sistemas mecánicos. Desde el más simple al más complejo podemos citar:

- Eje directo
- Engranaje directo
- Correas
- Tornillo sin fin

Tras hacer un primer prototipo con el sistema de eje directo, se ha visto que era más compacto y sencillo utilizar otro modelo. Utilizando sistemas de engranaje se puede plantear un sistema de reductora (Relación de transmisión [80]):

$$T = \frac{w_1}{w_2} = \frac{z_2}{z_1} \quad (3.13)$$

$$\frac{d_1}{z_1} = \frac{d_2}{z_1} \quad (3.14)$$

(3.15)

Donde Z1 y Z2 son los números de dientes,  $\omega_2$  y  $\omega_1$  velocidades del engranaje y d1 y d2 diámetros medios de los engranajes. Utilizando el número de dientes y partiendo de Z1=17 y Z2=50, se procede de forma:

$$T = \frac{z_2}{z_1} = \frac{50}{17} \quad (3.16)$$

(3.17)

Se produce por tanto un aumento de la precisión de forma que:

$$\omega_2 = \omega_1 * \frac{50}{17} \quad (3.18)$$

(3.19)

Pasando a ángulo se expresa de forma que se obtiene la resolución angular:  
a

$$Resolucionangular = \frac{angulo\ por\ paso}{T} = 1,8 * \frac{17}{50} = 0,612 \quad (3.20)$$

(3.21)

Con la solución de las correas la resolución hubiese sido similar. Pero se quería evitar problemas con la tensión de las mismas.

Otro de los factores de diseño es el tipo de diente. Con la técnica del fresado, los dientes solo pueden ser planos mientras que con la impresión 3D puede ser de cualquier tipo. Existen por tanto varias formas de hacer el engranaje:

- Fresando la plataforma con el engranaje incluido
- Imprimiendo en 3D la plataforma con el engranaje incluido
- Fresando la plataforma entera y creando una corona con en el engranaje a su alrededor de impresión 3D

Los dientes helicoidales y doble helicoidales son propuestos para este tipo de propósito ya que reducen el huelgo, pero se han elegido los engranajes simples por la facilidad de construcción esperando una versión mejorada posterior.

Por último se debe apuntar que para que el microscopio cambie de ángulo sin cambiar la posición del enfoque. Éste debe de estar inclinado con respecto a la horizontal de forma que el eje transversal del objetivo corte a su vez con el eje de giro de la plataforma y el eje transversal de la herramienta.

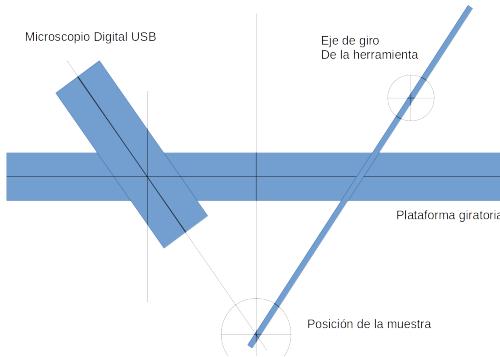


Figura 3.15: Esquema del enfoque del microscopio.

### 3.2.2. Sistema de posicionamiento angular V1

La primera versión como se ya ha comentado en la sección anterior está basada en un sistema de eje directo con varios niveles donde el motor está sujeto en la parte posterior.

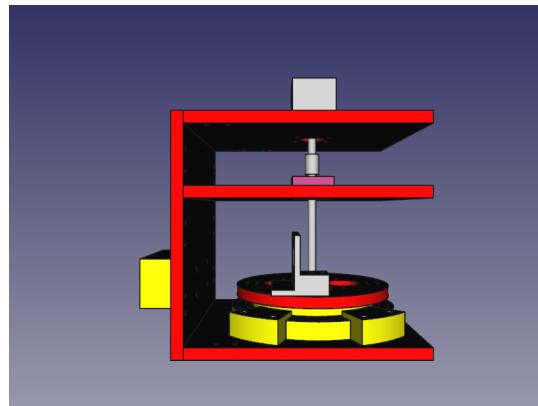


Figura 3.16: Vista del perfil, donde se puede apreciar los distintos niveles del prototipo 1.

Como puede verse en la imagen, se divide en 3 niveles. En el primer nivel encontramos un motor paso a paso. Se ha elegido un NEMA 17 ya que son más

## 50 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

comunes, debido a su uso en impresión 3d, que los NEMA 23 habituales. El modelo escogido es 42BYGHW811 de la marca Wantai Stepper Motor [81]. Las características de este motor son:

### Especificaciones del modelo 42BYGHW811

- Modelo: Eje simple
- Ángulo de paso:  $1.8^\circ$
- Largo del motor: 48 mm
- Corriente nominal: 2.5 A
- Resistencia de fase:  $1.25 \Omega$
- Inductancia de fase: 1.8 mH
- Par de mantenimiento: 4.8 Kgf.cm
- Número de cables: 4
- Inercia del rotor: 68 g.cm<sup>2</sup>
- Peso: 0.332 Kg
- Exactitud del paso:  $\pm 5\%$  (full step, no load)
- Temperatura máxima:  $80^\circ\text{C}$  CMax.(rated current,2 phase on)
- Temperatura de trabajo:  $-20^\circ\text{C}$  a  $50^\circ\text{C}$
- Clase de aislamiento: 100M  $\Omega$  Min, 500VDC
- Resistencia dieléctrica: 500 VCA durante un minuto

El eje se une al motor a través del acoplador flexible de aluminio tipo 5mm a 8mm y este eje es una varilla roscada M8. Atraviesa el segundo nivel donde se encuentra el rodamiento 608zz con su pieza de sujeción, que sirve como estabilizador del eje.

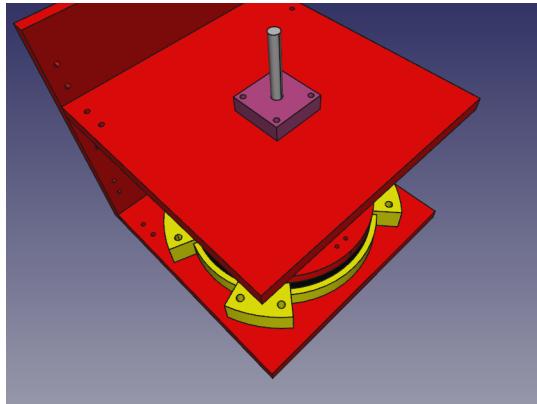


Figura 3.17: Imagen del eje M8.

Finalmente llega hasta el nivel 3 donde esta la plataforma con instrumentación. Esta plataforma se sitúa por debajo de un rodamiento 12060 de la compañía RHP bearing [82], sobre el que gira la plataforma gracias a una pieza de acople hecha en impresión 3D. El rodamiento esta sujeto a la pletina base a través de 4 piezas. Las pletinas están sujetas entre ellas mediante escuadras.

#### Especificaciones del rodamiento 12060

- Ángulo de paso:  $1.8^\circ$
- Largo del motor: 56 mm
- Corriente nominal: 2.8 A
- Resistencia de fase:  $0.9 \Omega$
- Inductancia de fase: 2.5 mH
- Par de mantenimiento: 12.6 Kgf.cm
- Número de cables: 4
- Inercia del rotor:  $300 \text{ g.cm}^2$
- Peso: 0.7 Kg

A continuación se muestran las vistas principales del prototipo:

52 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

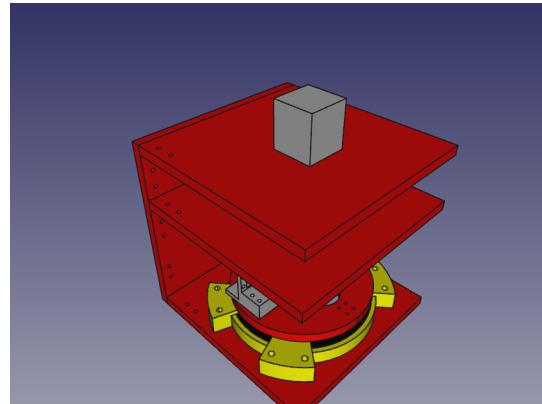


Figura 3.18: Imagen en perspectiva del primer prototipo.

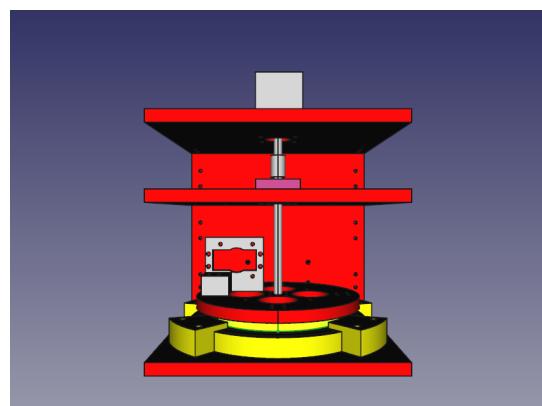


Figura 3.19: Alzado del primer prototipo.

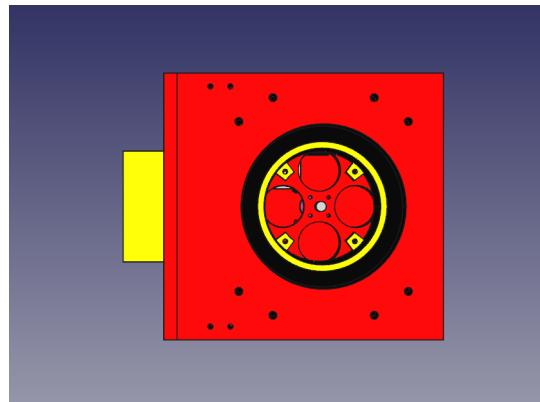


Figura 3.20: Vista de la planta desde abajo del primer prototipo.

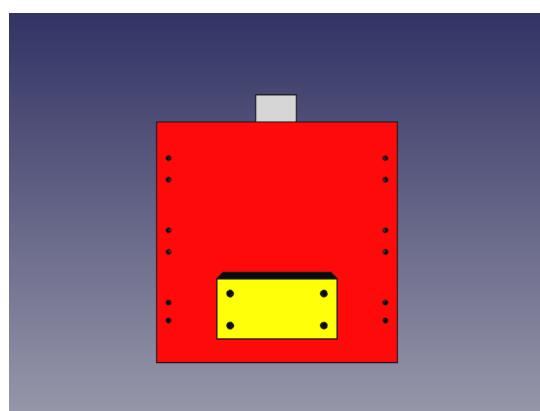


Figura 3.21: Imagen trasera del primer prototipo.

Haciendo un inventario de las piezas con el material y forma de fabricación queda:

1. Pletina base: En MDF de 10mm, fresado por CNC.
2. Pletina vertical: En MDF de 10mm, fresado por CNC.
3. Pletina inferior y pletina superior: En MDF de 10mm, fresado por CNC.
4. Plataforma giratoria: En MDF de 10mm, fresado por CNC.
5. Piezas de sujeción de la plataforma: PLA, impresión 3D.
6. Piezas de sujeción del rodamiento 12060: PLA, impresión 3D.

#### 54 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

7. Piezas de sujeción del rodamiento 608: PLA, impresión 3D.
8. Piezas de sujeción del microscopio digital: PLA, impresión 3D.
9. Piezas de sujeción del motor de la herramienta: PLA, impresión 3D.
10. Piezas de sujeción del pipeta: PLA, impresión 3D.
11. Adaptador de la herramienta: PLA, impresión 3D.
12. Piezas adquiridas: motores NEMA17, pipeta, rodamientos, escuadras.

A continuación algunas fotos del prototipo terminado:

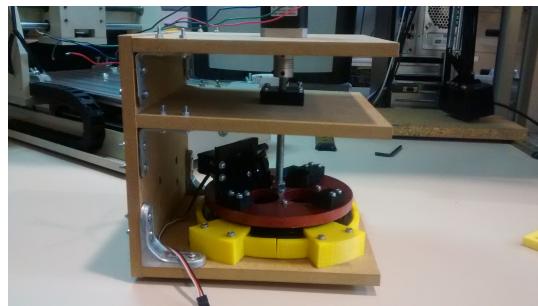


Figura 3.22: Foto del alzado del primer prototipo.

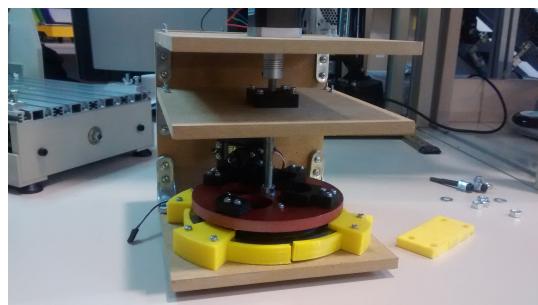


Figura 3.23: Foto del perfil del primer prototipo.

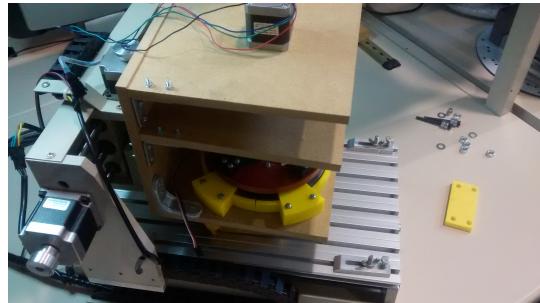


Figura 3.24: Foto en detalle de la plataforma del primer prototipo.

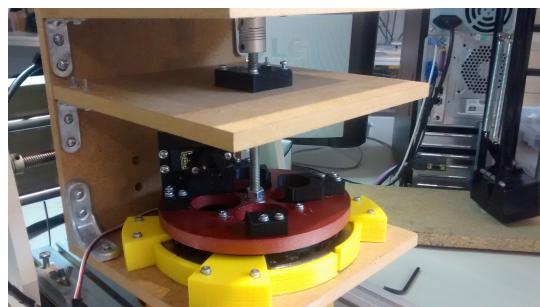


Figura 3.25: Foto del primer prototipo sobre el sistema de posicionamiento.



Figura 3.26: Otra foto del primer prototipo sobre el sistema de posicionamiento.

Se adjunta en la documentación el archivo en formato proyecto FreeCAD, véase archivo *prototipo\_v1.FCStd* dentro de la carpeta Piezas.

### 3.2.3. Sistema de posicionamiento angular V2

El primer prototipo presentaba algunas deficiencias importantes:

## 56 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

- La mayoría de piezas están hechas MDF: El MDF es un material fácil de fresar pero da como lugar a demasiados inexactitudes debido a la deformación del mismo al ser demasiado blando.
- El sistema en varias plantas pero dificulta el trabajo de modificación de elementos sobre la plataforma, que son intercambiables.
- El eje directo, hace que la resolución angular mecánica sea 1.8 grados (la resolución final es calculada en el capítulo 4 ya que depende del numero de micropasos) la cual es bastante baja.

Se ha realizado para ello un segundo prototipo, donde desaparecen los distintos niveles. En este se reciclan algunos elementos. Sin embargo todas las piezas de MDF se descartan. La pletina vertical disminuye mucho de tamaño pasando a 200x100 mm a 100x50 mm, las escuadras son fabricadas a medida y la pletina base sufre las modificaciones más importantes.

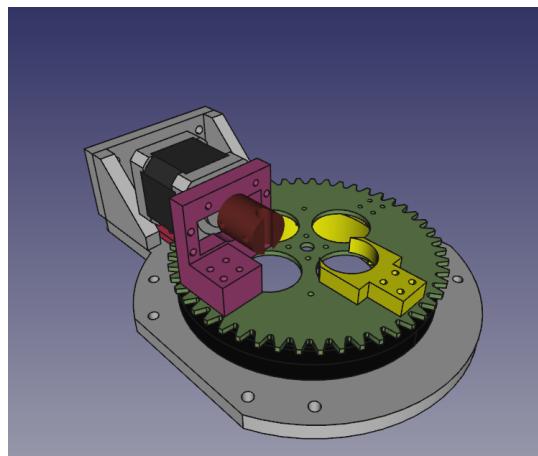


Figura 3.27: Imagen en perspectiva del segundo prototipo.

La pletina base pasa a estar compuesta por dos primitivas, un rectángulo y una circunferencia. Se realizan dos cortes para poder fresar dentro del área de trabajo (de otra forma sobrepasaría el área de trabajo). Esta plataforma pasa a estar hecha en aluminio de 10 mm de grosor.

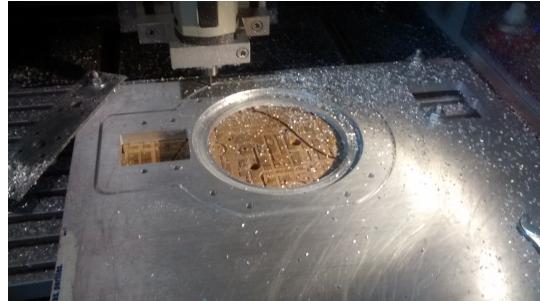


Figura 3.28: Fabricación de la pletina base en aluminio, mediante fresado CNC.

El sistema de conducción del movimiento angular pasa a ser engranado como se advertía en el apartado 3.2.1. La plataforma se convierte en el propio engranaje conducido al tener el borde tallado con dientes.

#### **Engranaje pequeño o conductor**

- Ángulo de ataque:  $20^{\circ}$
- Módulo: 3 mm
- Número de dientes: 17
- Diámetro aproximado: 50 mm

#### **Engranaje grande o conducido**

- Ángulo de ataque:  $20^{\circ}$
- Módulo: 3 mm
- Número de dientes: 50
- Diámetro aproximado: 145 mm

El motor se instala en el hueco para ajustar la altura según el largo del motor (se realiza de esta forma con la intención de que no sobresalga excesivamente por abajo pues limitaría la distancia de trabajo al chocar con la muestras, si esta muestra fuese grande) además que favorece el montaje y ayuda a eliminar el huelego. Se muestran algunas ilustraciones del segundo prototipo:

58 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

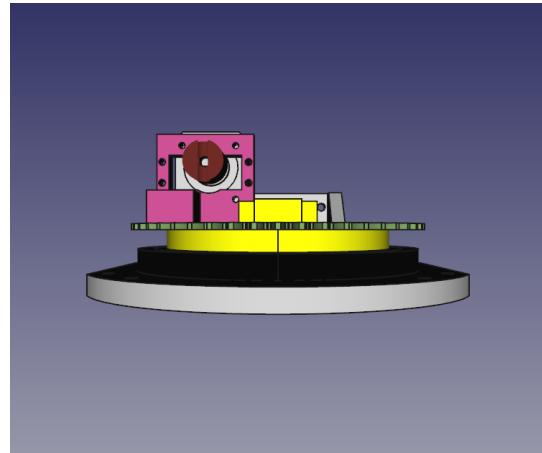


Figura 3.29: Alzado del segundo prototipo.

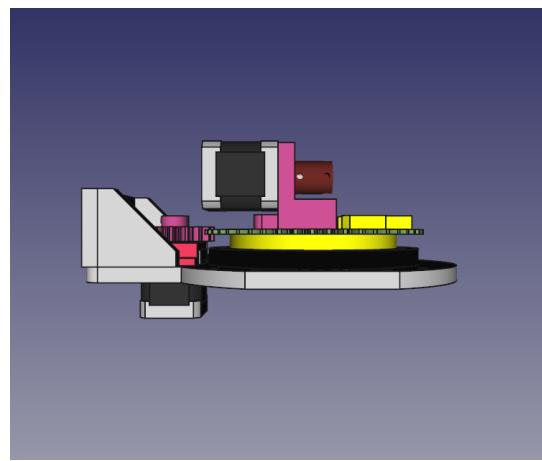


Figura 3.30: Vista del perfil del segundo prototipo.

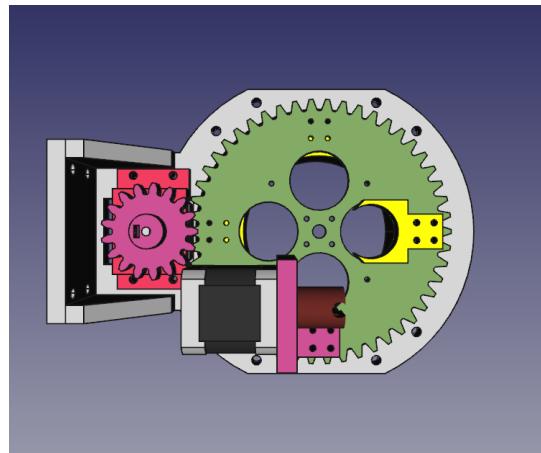


Figura 3.31: Vista de la planta desde abajo del segundo prototipo.

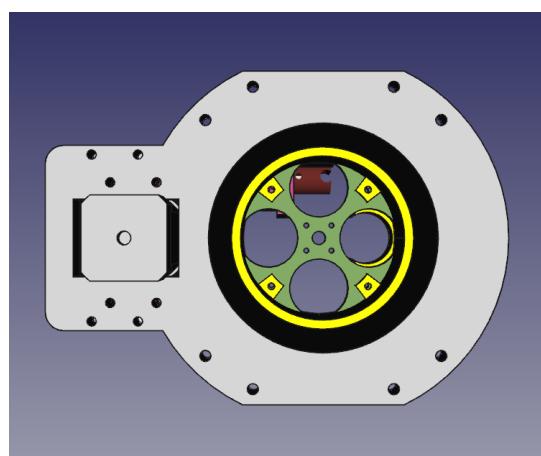


Figura 3.32: Imagen trasera del segundo prototipo.

Haciendo un pequeño inventario de las piezas con el material:

1. Pletina base: En aluminio de 10mm, fresado por CNC.
2. Pletina vertical: En aluminio de 10mm, fresado por CNC.
3. Escuadras: En aluminio de 10mm, fresado por CNC.
4. Plataforma giratoria: En aluminio de 5 mm, fresado por CNC.
5. Engranaje conductor ABS, impresión 3D.

60 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

6. Piezas de sujeción del motor posicionador angular: ABS, impresión 3D.
7. Piezas de sujeción de la plataforma al rodamiento: ABS, impresión 3D.
8. Piezas de sujeción del microscopio digital: ABS, impresión 3D.
9. Piezas de sujeción del motor de la herramienta: ABS, impresión 3D.
10. Adaptador de la herramienta: ABS, impresión 3D.
11. Caja para la electrónica: ABS, impresión 3D.
12. Piezas adquiridas: motores NEMA17, pipeta, rodamientos, escuadras.

En el apartado 3.3 se describen por separado. Algunas fotos del prototipo terminado son:

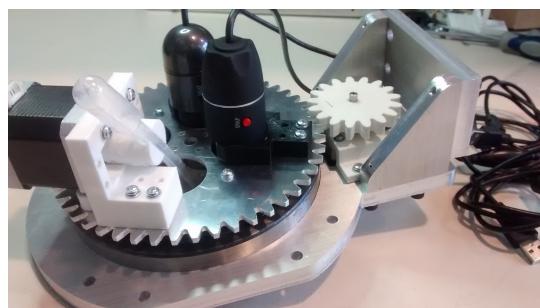


Figura 3.33: Foto del perfil del segundo prototipo.

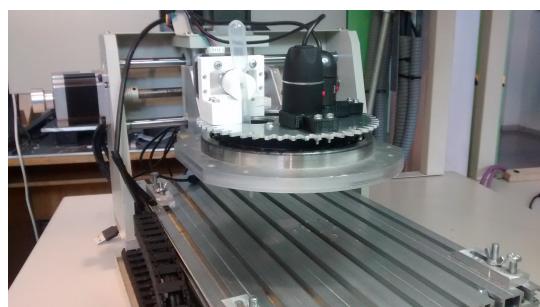


Figura 3.34: Foto del segundo prototipo sobre el sistema de posicionamiento.



Figura 3.35: Foto del segundo prototipo sobre el sistema de posicionamiento desde otra vista).

Se adjunta en la documentación el archivo en formato proyecto FreeCAD, véase archivo *prototipo\_2.fcstd* en la carpeta Piezas.

### 3.3. Diseño y construcción de las piezas

En el siguiente apartado se va a proceder a describir cada una de las piezas que componen el subsistema de orientación. Para ello se va a listar el programa con el que ha sido diseñada, el nombre del fichero con el que se adjunta en la documentación (carpeta Piezas), el tipo de fabricación, el material de fabricación, las dimensiones aproximadas y una descripción donde se justifica el diseño

escogido.

### 3.3.1. Pletina base

- Diseñada con: FreeCAD
- Nombre del fichero: *base\_sheet.dxf*
- Fabricación: fresadora CNC
- Material: Aluminio de grosor 10 mm
- Dimensiones: 200x190x10 mm (Aproximada)

**Descripción:** Es la pieza sobre la que se monta el resto de elementos del posicionador angular. Por un lado se encuentra la parte circular, la cual lleva a cabo la sujeción del rodamiento y por otra la parte rectangular, para la sujeción del motor paso a paso. En la parte circular encontramos la abertura principal, de 124 mm de diámetro, a través de la cual van a pasar las herramientas. Por otro lado, se dispone de un rebaje de 150 mm (diámetro exterior) para la sujeción del rodamiento y por el exterior con una profundidad de 5mm, 8 taladros para piezas de acople de seguridad del rodamiento.

En la parte rectangular, los agujeros más extremos son los encargados de las escuadras que unen con la pletina vertical. El orificio rectangular es para el ajuste del motor paso a paso, ya que éste, al ser de profundidad variable debe ser ajustado de forma exacta tanto en altura(coincidiendo con la altura de la plataforma) como en el ajuste del huelgo en los piñones.

El rebaje debe fresarse con una tolerancia de un 1 mm ya que sino el rodamiento no entrará.

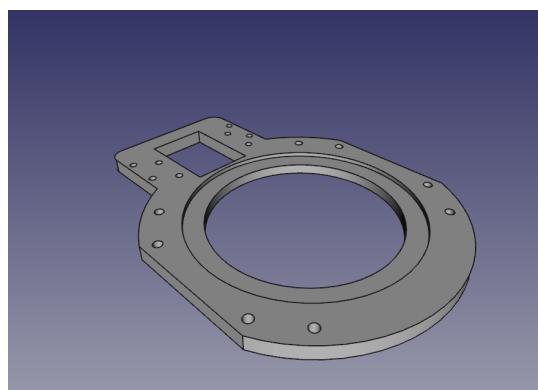


Figura 3.36: Imagen en perspectiva de la pletina base.

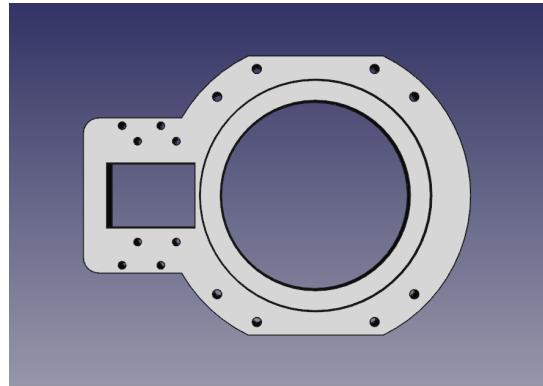


Figura 3.37: Imagen de la planta de la pletina base.

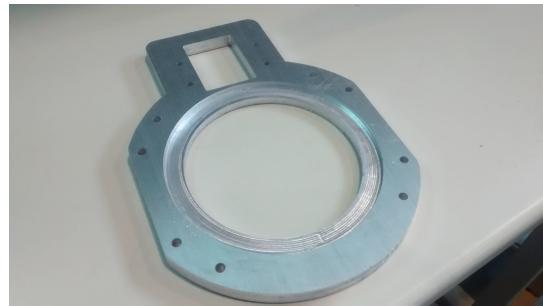


Figura 3.38: Foto de la pletina base terminada.

### 3.3.2. Pletina vertical

- Diseñada con: FreeCAD
- Nombre del fichero: *vertical\_sheet.dxf*
- Fabricación: fresadora CNC
- Material: Aluminio de grosor 10 mm
- Dimensiones: 100x50x10mm (Exactas)

**Descripción:** La pletina vertical sirve para sujetar la pletina base (sobre las que van la herramienta) a la estructura de la máquina de posicionamiento cartesiana. Los cuatro taladros principales (interiores) sirven para este cometido mientras los cuatro exteriores sirven para la sujeción de las escuadras de refuerzo. Los exteriores son de diámetro 5mm pasantes para M4, mientras que los interiores de diámetro 6,5mm pasantes para M6. Tal y como se termina de

## 64 CAPÍTULO 3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

fabricar en la fresadora puede ser utilizada sin ningún tratamiento adicional.

En un primer prototipo se buscó que el ancho de la pletina fuese igual a la parte donde se sujetaba en la estructura. Sin embargo, eso hace que los tornillos que sujetan a las escuadras no puedan sobresalir y deban ser avellanados. Se ha solucionado pasando el ancho de 100 mm a 120 mm. El alto también ha quedado corto por lo que se ha pasado de 50 mm a 60 mm quedando así en el diseño final.

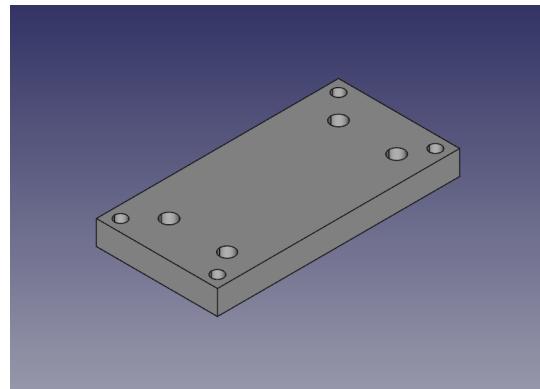


Figura 3.39: Imagen del alzado de la pieza.



Figura 3.40: Foto de la pletina vertical terminada.

### 3.3.3. Escuadras

- Diseñada con: FreeCAD
- Nombre del fichero: *brackets.dxf*
- Fabricada con: fresadora CNC
- Material: Aluminio de grosor 10 mm