

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ**

**“IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOTIPO DE TERMOCICLADOR
ALIMENTADO CON UNA FUENTE DE 24VDC”**

Tesis para optar el Título de **Ingeniero Electrónico**, que presenta el bachiller:

Jesús Humberto Macassi Quispe

Asesores: Ing. Willy E. Carrera Soria

Dra. Sayda Estela Mujica Bueno

Lima, agosto de 2014

RESUMEN

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo implementar un prototipo de Termociclador alimentado con una fuente comercial de 24 voltios DC, con lo cual se podrá analizar y observar el comportamiento de las etapas del proceso de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para el desarrollo de este trabajo se tiene como base los estudios realizados por Zegarra y Ponce en "Diseño e Implementación de un módulo para procesos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la Replicación de ADN"; de igual manera, la investigación "Caracterización de la Celda Peltier para un Prototipo de Termociclador" realizada por Ayllón, G., todo este proceso implica desarrollar etapas previas para posteriormente lograr el buen manejo y optimación en el desarrollo del prototipo de termociclador PUCP.

Este trabajo se ha dividido en cuatro capítulos que se detallan a continuación.

En el capítulo 1, se mencionan las tecnologías que se utilizan para el proceso de PCR, y la importancia de éstas en el desarrollo de los Termocicladores; además de los avances que se tiene en la actualidad en el desarrollo del Termociclador PUCP.

En el capítulo 2, se va encontrar una descripción del ADN, sus generalidades, el proceso de replicación de ADN y que elementos se ven envuelto en todo el proceso; así como también, la tecnología que gobierna actualmente a estos equipos electrónicos.

En el capítulo 3, se encuentra el desarrollo de todas las etapas que conllevan al proceso de la PCR y que permiten la implementación del prototipo de Termociclador.

En el capítulo 4, se realizan pruebas para las etapas del proceso de PCR, así como una evaluación final de todo el proceso para diferentes números de ciclos.

En la parte final del documento se presentan las conclusiones finales obtenidas en la implementación del prototipo de Termociclador, así como las recomendaciones que este trabajo ha suscitado.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: Avances en el desarrollo del prototipo de Termociclador PUCP ..	2
1.1. Desarrollo e importancia de los Termocicladores	2
1.2. Avances en el desarrollo del Termociclador PUCP	3
1.3. Presentación del asunto de estudio.....	6
CAPITULO 2: Estado del Arte de los Termocicladores	7
2.1. El ADN, estructura interna y su proceso de replicación	7
2.2. Técnica del proceso: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	9
2.2.1 Etapas del Proceso de Replicación de la Polimerasa.....	10
2.3. Generalidades de los Termocicladores	12
2.3.1. Celda Peltier	13
2.3.2. Tecnología de los Termocicladores	14
2.4. Objetivos.....	18
2.4.1. Objetivo general.....	18
2.4.2. Objetivos específicos	18
CAPITULO 3: Implementación del proceso de PCR con una fuente de 24 VDC. 19	
3.1. Etapa del sistema Termomecánico	20
3.2. Etapa de Sensado de Temperatura	22
3.2.1. Etapa de Sensado.....	22
3.2.2. Etapa de Acondicionamiento.....	25
3.2.3. Etapa de Amplificación.....	30
3.3. Etapa de Interfaz de Usuario.....	33
3.4. Etapa de control.....	35
3.5. Etapa de Potencia.....	41
3.5.1. Celda Peltier	42
3.5.2. Excitador de Potencia	42
3.5.3. Filtro DC.....	45
CAPITULO 4: Pruebas y resultados	51
4.1. Etapa de Desnaturalización (Fuente: 24V).....	54
4.2. Etapa de Hibridación (Fuente: 24V)	55
4.3. Etapa de Extensión (Fuente: 24V)	56
4.4. Proceso de PCR	57
Conclusiones	59
Recomendaciones	60
Bibliografía	61
Anexos	

INTRODUCCIÓN

Hoy en día conocer y trabajar con las moléculas del ADN de los seres vivos es una necesidad sea por razones de investigación, diagnóstico de enfermedades, estudio de la biodiversidad, etc. Es por ello que la ciencia biológica, la tecnología mecánica y electrónica se han unido y desarrollado el Termociclador; este es un equipo que regula automáticamente la temperatura y los tiempos para realizar el proceso conocido como PCR por las siglas del inglés Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa, que permite replicar el ADN de cualquier ser vivo. El Termociclador es de uso en cualquier laboratorio de Biología Molecular, Ingeniería Genética o de Diagnóstico que trabaje con ácidos ribonucleicos (ADN, RNA) de cualquier ser vivo. En el Perú casi no hay nadie que tenga manejo de la tecnología de estos equipos y si bien los hay importados a un costo elevado, pueden quedar relegados en cualquier depósito por motivos de reparación terminada la garantía. Para conocer la tecnología que le da soporte es necesario introducirse en el estudio, reconocimiento, caracterización, simulación y desarrollo de los elementos que lo componen.

El tema de esta tesis está basado en una de las actividades del Grupo de Desarrollo de Equipos para Laboratorios Biológicos de las Ciencias de la Vida – Equi-LaB de la Sección de Electricidad y Electrónica de la PUCP quienes con el fin de manejar la tecnología involucrada en el equipo están desarrollando un prototipo de Termociclador. Dentro de las actividades de este grupo se han desarrollado diversos temas de tesis en Ingeniería Mecánica e Ingeniería Electrónica [12, 13, 35]. Habiéndose logrado la construcción e implementación de un prototipo o módulo básico para PCR, que se ha probado indistintamente con dos tipos de fuente de alimentación DC (una fuente conmutada comercial de 12 VDC [12, 14] y otra fuente de 24 VDC compuesta por 2 baterías de 12 VDC conectadas en serie) se lograron rampas de temperatura de alrededor de 2 °C/s [12] conectando directamente a la fuente DC. Luego Allyón, [14] realiza estudios para cada etapa de la PCR y en atención a los resultados obtenidos, él propone el uso de una fuente de 24 VDC que pueda ser también acondicionada para funcionar a 12VDC, logrando mayor eficiencia en la alimentación y por ende en el desarrollo del proceso.

El objetivo del presente trabajo de tesis se centra en implementar el desarrollo del proceso de PCR con el prototipo hasta ahora logrado; pero alimentado con una fuente de 24VDC/22A comercial de la empresa TDK-Lambda, para lo cual se tendrá que adecuar el programa del control de manera que a partir de esta fuente también se pueda alimentar las celdas Peltier con 12 VDC según lo planteado por Ayllón [14].

CAPITULO 1

Avances en el desarrollo del prototipo de Termociclador PUCP

1.1. Desarrollo e Importancia de los Termocicladores

El desarrollo del Termociclador está ligado a las investigaciones relacionadas al ADN. Han sido muchos los investigadores que han intervenido en el descubrimiento de la molécula básica para la vida. En 1869 Johann Friedrich Miesscher aísla por primera vez el núcleo de la célula, posteriormente, Richard Altmann identifica a las nucleínas como ácidos y las denomina ácidos nucleicos. En 1914 Robert Feulgen logra comprobar que todas las células eucariotas tienen núcleo. P.A. Levene en 1919 descubrió las cuatro bases nitrogenadas y que se encuentran unidas en el orden fosfato-azúcar-base formando un nucleótido. En 1952, Alfred Hershey y Martha Chase lograron comprobar que el ADN es la base del material genético y no las proteínas como se pensaba. En 1953 Watson y Crick, basándose en los hallazgos previos de Franklin y Wilkins establecen el modelo del ADN de una doble hélice helicoidal, trabajo por el que obtuvieron reconocimiento mundial y en 1962 el Premio Nobel otorgado a Watson, Crick y Wilkins. Casi 100 años de estudios para lograr conocer a la molécula de ADN; pero este conocimiento no era suficiente había que encontrar la forma de trabajar con el ADN y hacer análisis específicos para cada ser vivo. En 1983 Kary B. Mullis y su colaborador Fred A. Faloona en la Cetus Corporation de Emeryville, California descubren la técnica para la replicación del ADN y diez años después obtiene el Premio Nobel de Química por este trabajo. La técnica es sencilla llamada Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ella clona o duplica varias veces un pequeño fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) para obtener copias múltiples. Esta técnica es una de las más usadas en cualquier laboratorio de Biología Molecular y se puede decir que es la base de toda esta disciplina, porque con el ADN multiplicado se pueden hacer los diversos ensayos de la biología molecular.

Hacer los ensayos como lo hacía Mullis usando diferentes termostatos era muy trabajoso y lento, por lo tanto, los científicos de Cetus comenzaron a buscar las maneras de automatizar el proceso. La primera máquina termocicladora, "Mr. Cycle" fue creada por los ingenieros de Cetus. Más adelante con el descubrimiento de la enzima ADN polimerasa de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus* llamada "Taq polimerasa" que actúa eficientemente entre los 75°C y los 80°C y resiste más de dos horas a 93°C se pudo visualizar la posibilidad de automatizar el proceso. En 1985, Cetus se asoció con la corporación Perkin-Elmer e introdujo el Termociclador DNA

Thermal Cycler. De esta manera fue y es posible mezclar las secuencias de ADN que se quieren replicar con determinados reactivos de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados para que se den las reacciones de replicación.

En 1990, los científicos alcanzan la primera amplificación y detección simultánea de las secuencias específicas de ADN usando un colorante fluorescente, de este modo nace la PCR en tiempo real o PCR "cinético". En 1991 Hoffmann-La Roche Inc. adquiere los derechos y las patentes mundiales de la PCR [16], habiendo ya transcurrido los 20 años que normalmente es vigente para patentes.

La PCR automatizada, es decir haciendo uso de un Termociclador tiene hoy en día muchísimas aplicaciones (identificar individuos a partir de cantidades mínimas de tejidos o sangre, diagnóstico de enfermedades genéticas, investigaciones sobre la evolución de la vida, etc.) y ha tenido un alto impacto en todos los campos relacionados con la biología molecular. Con ella, esta disciplina ha desarrollado muchísimas técnicas que son variantes de la PCR misma, como PCR/ AFLP , PCR asimétrica, PCR para colonias, PCR diferencial desplegado, PCR Degenerada, PCR Múltiple, PCR de transcripción reversa, PCR – ELISA, PCR – RFLP [17], entre otras que han permitido el desarrollo y el conocimiento que actualmente se tiene en todas las áreas de las ciencias de la vida, por lo que contar con un equipo Termociclador en un laboratorio de Biología Molecular es vital.

1.2. Avances en el desarrollo del Termociclador PUCP

En la PUCP se han realizado diversos avances para desarrollar un prototipo de Termociclador. Equi-LaB, equipo de Investigación formado por profesores y alumnos de las Secciones de Ingeniería Electrónica unidos con el grupo INACOM de la Sección de Mecánica viene trabajando en el Desarrollo de un prototipo de Termociclador.

El primer paso se dio con el Proyecto de la Dirección Académica de Investigación de la PUCP por medio del trabajo "Termociclador térmico programable digitalmente" [11], con el cual se llegó a conocer las características de la celda Peltier CP 1.4-127-10 de Melcor (hoy Laird Technologies) y se desarrolló una bandeja metálica de plata, cuya geometría se determinó basándose únicamente en el menor tamaño y el mínimo de peso. Posteriormente mediante el trabajo de Zegarra y Ponce se diseñó y desarrolló un módulo básico que permita la replicación de ADN empleando el proceso de

Reacción en Cadena de la Polimerasa [12]. El módulo es capaz de controlar un juego de temperaturas configurables por el usuario, este módulo constituye un primer aporte a la intención de desarrollar equipos termocicladores de producción nacional. En esta tesis se hace uso de la tecnología Peltier, utilizando dos modelos de dispositivos de efecto termoeléctrico conocidos como Celdas Peltier, modelos CP 1.4-127-10L y CP 0.8-254-06L, componentes que permiten obtener cambios de temperatura de manera muy rápida. Previamente los autores presentan un estudio del efecto termoeléctrico y plantean el diagrama de bloques que se muestra en la figura 1.1.

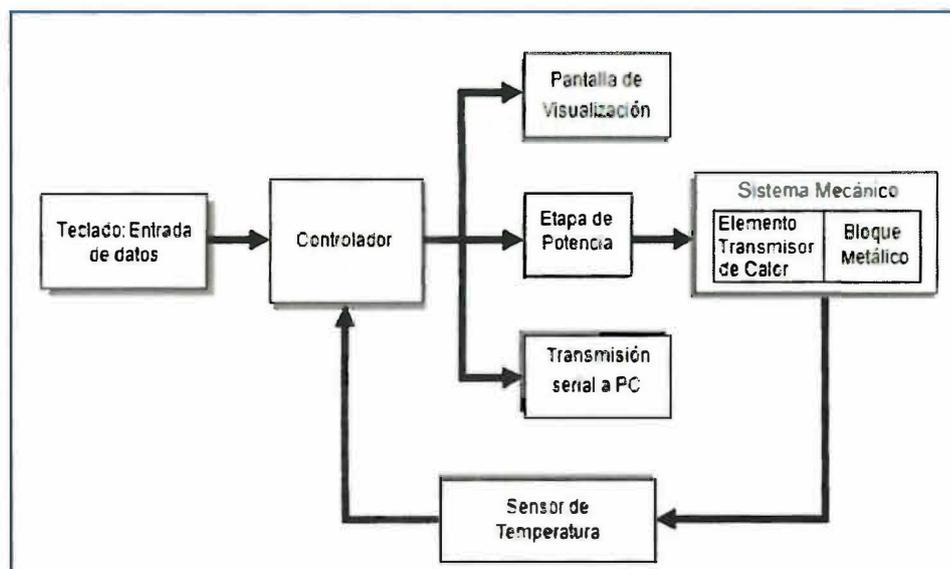


Figura 1.1: Diagrama de bloques planteado para el desarrollo del prototipo elaborado por Zegarra, y Ponce., [12]

El desarrollo del sistema mecánico llevó al desarrollo de dos opciones: a) un bloque sólido de aluminio y b) un bloque de plata, este último es el que se usa en este trabajo. Así también luego de hacer un estudio de la cantidad de calor necesario para alcanzar las máximas temperaturas se llegó a la conclusión que se requerían dos celdas Peltier modelo CP 1.4-127-10L. Para el control de la temperatura se selecciona el sensor YSI 44018, por sus características de precisión de $\pm 0.15^{\circ}\text{C}$ (garantiza que las muestras de ADN a replicar no se degeneren) y se incluyó acondicionamiento para linealizar la salida del termistor, así como un amplificador de instrumentación INA125 para acondicionar el rango de la salida de [0-5V], y de esta manera se acople a los rangos de la etapa de control, el cual cuenta con una etapa análogo digital para convertir los valores análogos a datos digitales entendibles por la etapa de control. Asimismo construyen una interfaz de usuario que permite ingresar los valores de temperaturas y tiempos de la PCR, las interfaces de entrada-salida las constituyen el teclado matricial y la pantalla LCD respectivamente. Los resultados llevaron a la

conclusión que era necesario realizar un estudio más detallado para la selección adecuada del tipo de celda Peltier y la geometría y material para la construcción del bloque metálico.

Posteriormente, Piminchumo, [13] en el trabajo "Diseño de los componentes mecánicos de un termociclador utilizando el método de elementos finitos" logra efectuar la simulación de un modelo mecánico que permite identificar a la celda VT-199-1.4-0.8 de TE Technology, categoría High Temperature, como la más adecuada y define la geometría del nuevo bloque metálico para la bandeja portamuestras logrando este mecanizarse.

Estos resultados llevan a la incorporación de dicha celda peltier al prototipo logrado. Así también Gerson Ayllon (2012) logra mediante ensayos obtener un registro del funcionamiento de sistema termoeléctrico con la celda Peltier seleccionada para los momentos de calentamiento y enfriamiento de cada etapa del proceso de PCR en el prototipo de Termociclador, este trabajo implicó desarrollar un sistema de adquisición de datos y obtener un registro visual de las variables de temperatura y de la corriente suministrada en el tiempo, al hacer ensayos simulando las características de las etapas de la PCR pero sin ningún control programable, mejor dicho por la conexión ON/ OFF realizada directamente a la fuente de voltaje DC [14].

Como conclusión de este trabajo se obtuvo una rampa de temperatura positiva en el proceso: de 1.7°C/s , como máximo, y una rampa de temperatura negativa: 0.8°C/s , como mínimo, con voltajes de 23.85 y 12V. Los resultados indicaron que se requiere una fuente con características de 24V y 22A, regulada por una PWM a través de un puente H. En la etapa de calentamiento el duty cycle será el máximo posible para tratar de obtener 23.85V y para la etapa de enfriamiento un duty cycle del 25% aproximadamente que brinde 12V.

Conjuntamente con los avances sobre los aspectos electrónicos se ha avanzado en el rediseño de los componentes mecánicos y mediante la simulación numérica por computadora en el trabajo "Diseño, fabricación, ensamblaje y prueba de los componentes mecánicos de un Termociclador" [15], se comprueba, verifica y ajustan estos elementos para concluir con un diseño preliminar del componente mecánico, el cual fue analizado teniendo en cuenta la factibilidad de manufactura existente en nuestro medio habiéndose fabricado una primera versión del sistema termomecánico, la carcasa y la tapa del prototipo de Termociclador.(ver figura 1.2)

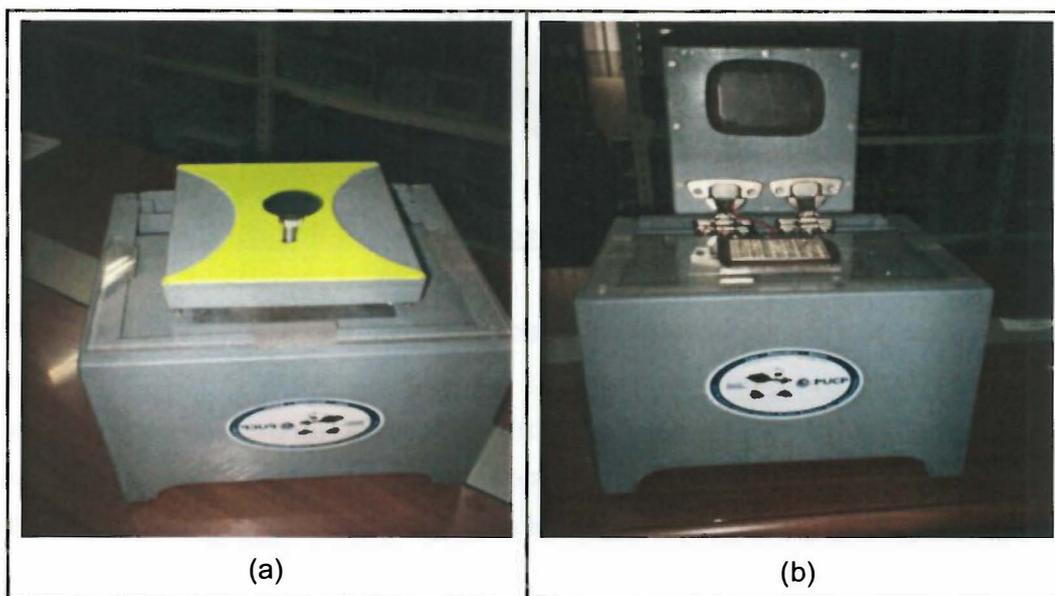


Figura 1.2: Carcasa del prototipo de Termociclador PUCP

(a): cerrado y (b): abierto, al centro se puede ver la bandeja portamuestras [15].

1.3. Presentación del asunto de estudio

Los resultados alcanzados por Ayllón [14], lleva a la necesidad de realizar un estudio con la finalidad de mejorar el prototipo del Termociclador que hasta el momento ha sido alimentado con una fuente de 12 VDC.

En ese contexto, el presente trabajo, se centra en la implementación de un prototipo de Termociclador alimentado con una sola fuente comercial de 24VDC/22A, para ello se realizan modificaciones en sus diversas etapas: i) adecuar el programa de control de manera que a partir de esta fuente también se pueda alimentar las celdas Peltier con 12 VDC, ii) mejorar y adecuar los elementos para el funcionamiento con respecto a la fuente comercial de 12 VDC utilizada anteriormente, iii) diseñar o rediseñar la Etapa de Potencia para que pueda cumplir el proceso de PCR para el módulo, iv) evaluar la necesidad de realizar modificaciones en la Etapa de Sensado, esta es una etapa crítica y muy sensible, por el cuidado en el manejo del sensor de temperatura, teniendo en cuenta parámetros como el tiempo de respuesta para que el prototipo muestre la real temperatura medida, la precisión requerida es de aproximadamente $\pm 1^{\circ}\text{C}$; además, v) presentar los interfaz de usuarios que son necesarios para el manejo del prototipo. De este modo se pretende mejorar el funcionamiento del prototipo existente pero con una sola fuente de 24 VDC.

CAPÍTULO 2

Estado del arte de los Termocicladores

2.1. El ADN, estructura interna y su proceso de replicación

El ADN es la molécula que contiene toda la información genética de cada ser vivo, esta información está contenida en los genes, que son pequeños segmentos de molécula y se encuentran ubicados dentro del núcleo de toda célula de un ser vivo eucariota. Las características físicas, como el color del cabello o de los ojos las establece el ADN de cada ser vivo. Todos los seres vivos de nuestro planeta tienen su propio ADN. Actualmente los estudios que se vienen realizando usando el modelo del Genoma Humano, permitirá en el futuro diagnosticar y prevenir enfermedades en una persona, e inclusive de su descendencia, por lo que se podrán tratar enfermedades hereditarias de forma más eficiente. La figura 2.1, muestra las cuatro bases nitrogenadas, dos purinas: Adenina (A) y Guanina (G), y dos pirimidinas: Citosina (C) y Timina (T), además de un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa) y grupos fosfato descubiertas por Levene [1].

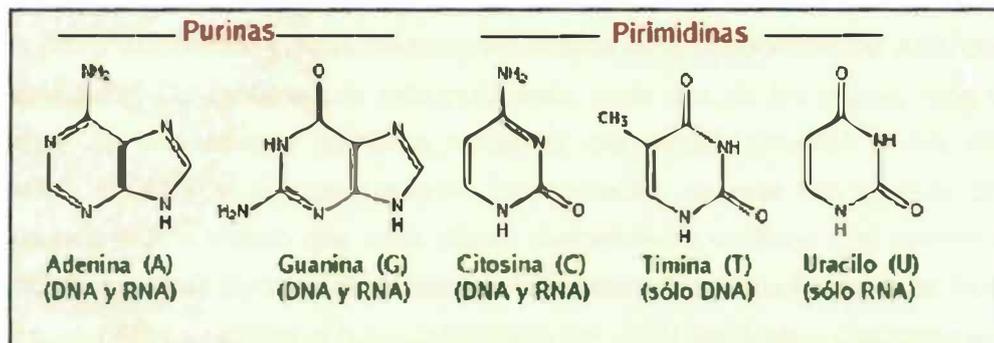


Figura 2.1: Bases nitrogenadas organizadas por tipos: Purinas y Pirimidinas, se puede observar su estructura química [2].

Como se mencionó anteriormente en el capítulo 1, en la década de los cincuenta, el campo de la Biología fue convulsionado por el desarrollo del modelo de la estructura del ADN. James Watson y Francis Crick en 1953 demostraron que consiste en una doble hélice formada por dos cadenas antiparalelas (orientación 5' 3' y 3' 5'), además se sabe que el ADN es un ácido nucleico formado por nucleótidos, cada nucleótido consta de tres elementos, un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada [4]. (ver figura 2.2)

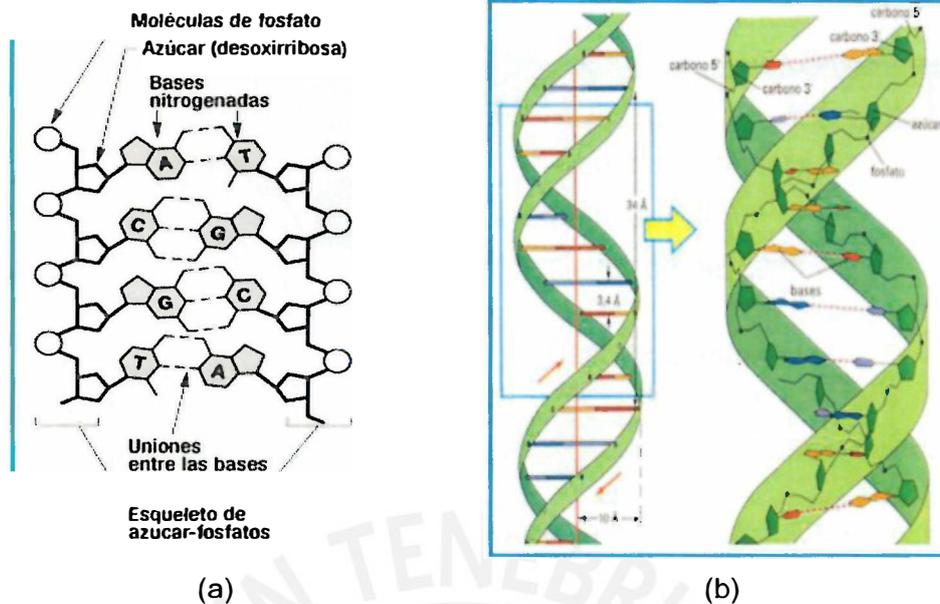


Figura 2.2: Estructura del ADN. La figura (a) muestra la estructura química y la gráfica (b) la representación de la doble hélice [4].

El proceso de replicación del ADN es el mecanismo que permite al ADN duplicarse (es decir, sintetizar una copia idéntica de sí misma). De esta manera de una molécula de ADN única, se obtienen dos o más "clones" de la primera. La propuesta de Watson y Crick había establecido ciertas predicciones acerca de la conducción del ADN durante la replicación. De acuerdo con esta propuesta, cada uno de los dúplex hijos debía consistir en una cadena completa heredada del dúplex parental y una cadena completa sintetizada de nueva cuenta. La replicación de este tipo se dice que es semiconservadora puesto que cada dúplex descendiente contiene una cadena de la estructura parental. Durante el proceso de replicación la enzima helicasa se mueve a lo largo del ADN y cataliza el desenrollamiento del ADN del dúplex. Conforme el ADN se desenrolla, las cadenas evitan la formación del dúplex por medio de proteínas (SSB). que se unen al ADN de cadena sencilla La primasa relacionada con la helicasa sintetiza los iniciadores de RNA, es decir, cada uno de los fragmentos de Okazaki., llamados también "iniciadores" de ARN, que tienen un tamaño aproximado de 10 nucleótidos, que se remueven con posterioridad [5].

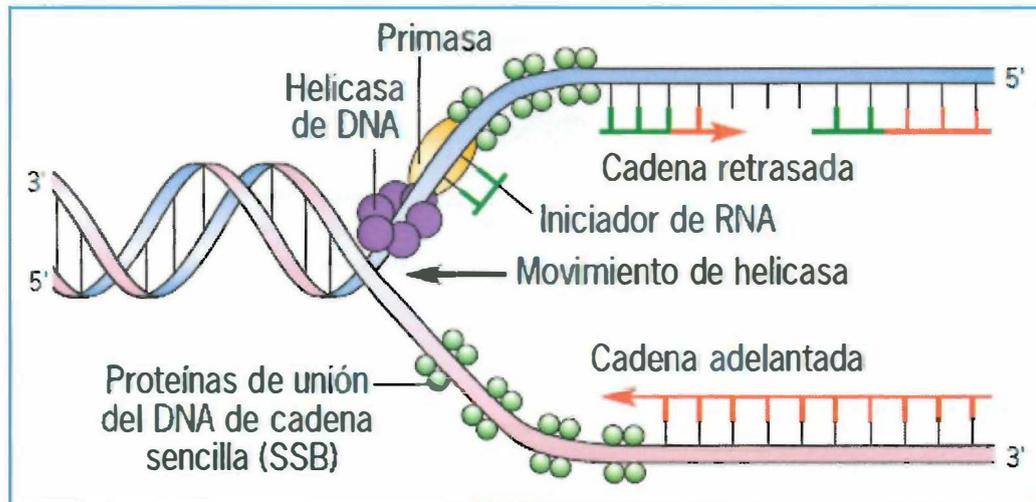


Figura 2.3: Secuencia de replicación de ADN y los elementos involucrados en el proceso [5].

2.2. Técnica del Proceso: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

En 1983 el Dr. Kary Mullis logró concebir un proceso por el cual se podían producir millones de copias de una molécula de ADN específica; este es el proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una técnica usada en Biología Molecular que tiene como esencia la amplificación exponencial de una muestra de secuencia de ADN, cada etapa de este proceso in vitro emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadamente para estimular la acción de las enzimas propias del proceso y separar las hebras de la molécula de ADN; de esta forma se duplica la molécula de ADN patrón en nuevas moléculas en cada fase de replicación [3, 6].

En la figura 2.4 se presenta una ilustración del ciclo completo del proceso de replicación del ADN con las temperaturas correspondientes a las tres principales etapas. A continuación se pasa a describir cada una de las etapas del proceso.

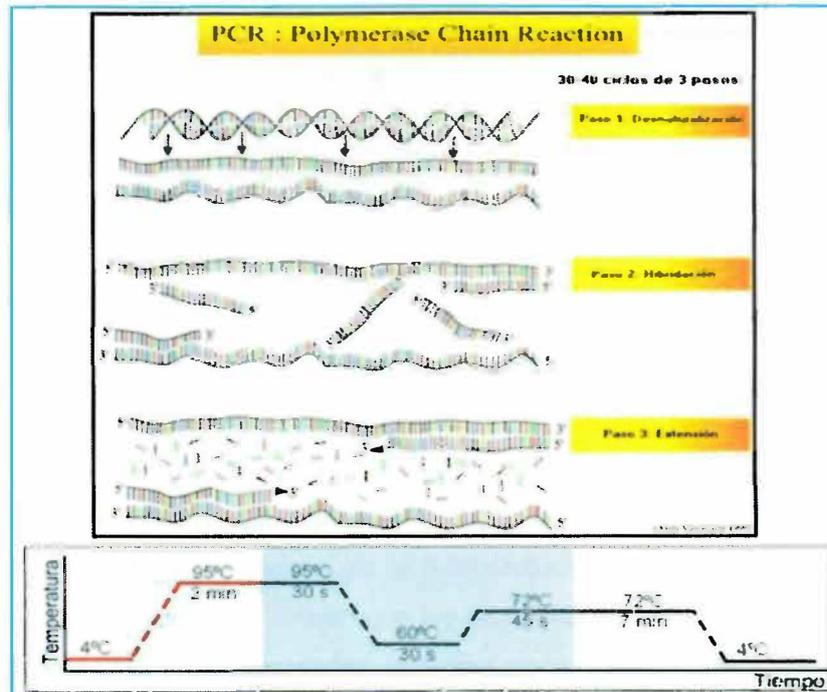


Figura 2.4: Representación del Ciclo de PCR, La parte superior muestra las etapas del proceso y la gráfica inferior los cambios de temperatura para cada una de las etapas del proceso [3, 6].

2.2.1. Etapas del Proceso de Replicación de la Polimerasa

- PRIMERA ETAPA DEL PCR: DESNATURALIZACIÓN.

Esta etapa se realiza en un rango de temperatura de 90 - 98 °C, siendo la elección de acuerdo al tipo de muestra biológica, cuando la muestra es llevada a temperaturas mayores a 90 °C se produce la separación de la doble hélice en dos hebras únicas como se esquematiza en la figura 2.5; además, se añaden dos componentes adicionales: primero la enzima llamada Taq polimerasa, capaz de separar y sintetizar ADN y soporta altas temperaturas, segundo, el iniciador o cebador, también conocido como "Primer", que es una cadena corta de polinucleótidos que forma enlaces complementarios con la cadena ADN del sector que se quiere replicar y es el punto de partida del copiado de la cadena [3, 6].

➤ **Duración y temperatura:**

Desnaturalización (Melting): De 2 a 10 minutos a 90 - 95 °C

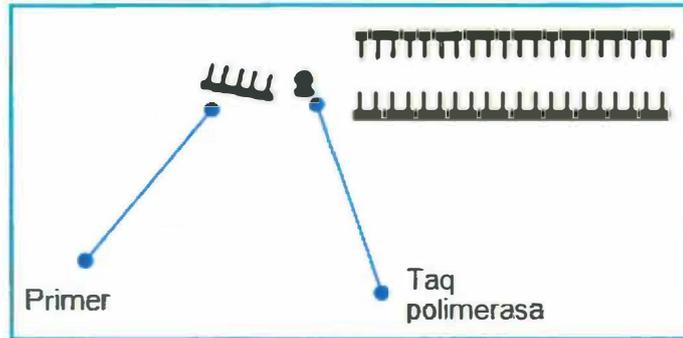


Figura 2.5: Se muestra el desdoblamiento inicial de la doble hélice de la molécula de ADN a la que se añaden el Primer y la Taq polimerasa [6].

- SEGUNDA ETAPA DEL PCR: HIBRIDACIÓN.

En esta segunda etapa, se disminuye la temperatura hasta los 60 °C para que los oligonucleótidos o primers, se alineen con las bases complementarias de cada una de las hebras de ADN, antes separadas (en direcciones 5'->3' y 3'->5'). Los "Primers" inician la síntesis del ADN complementario en un determinado punto de los enlaces químicos de las hebras que se desdoblaron anteriormente. La figura 2.6 ilustra este efecto.

- **Duración y temperatura:**

Hibridación (Annealing): De 30 a 45 segundos a 60°C

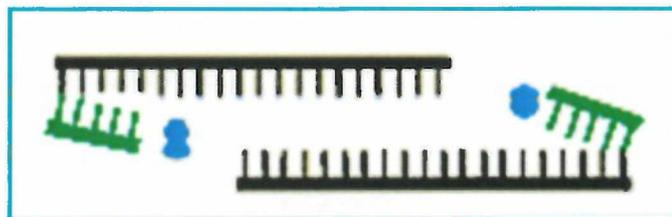


Figura 2.6: Se aprecia que los primers inician la serie de enlaces químicos en cada una de las hebras únicas formadas en la primera etapa [6].

- TERCERA ETAPA DEL PCR: EXTENSIÓN.

En la tercera Etapa, una vez que los Primers han formado los primeros enlaces con la hebra de ADN complementaria, la muestra es llevada a una temperatura alrededor de los 72°C aproximadamente para permitir que la enzima *Taq polimerasa* replique la hebra de ADN. Esta enzima inicia el proceso de sintetizado en la zona iniciada por los Primers facilitando la unión por enlaces químicos de los nucleótidos complementarios que se encuentran en la muestra. A continuación se ilustra detalles de este proceso en la figura 2.7.

➤ **Duración y temperatura:**

Extensión: De 7 a 10 minutos a 72°C



Figura 2.7: En la gráfica se ilustra el copiado total de las dos hebras de la molécula de ADN [6].

2.3. Generalidades de los Termocicladores

Los Termocicladores poseen un diseño extremadamente complejo, mucho más de lo que los usuarios del instrumento generalmente imaginan. En general, el diseño de termocicladores se puede dividir en dos áreas. Una sección es la encargada de la programación, la regulación de energía, procesamiento de sensores, etc. La otra sección involucra el diseño del sistema termomecánico: la bandeja portamuestras (la aleación metálica que conforma el bloque), los sensores, el módulo o celda Peltier, aislamiento de la bandeja portamuestra y disipadores de calor. Estas capas individuales se apilan una sobre otra y forman una construcción "tipo sandwich" [7], como se muestra en la figura 2.8.

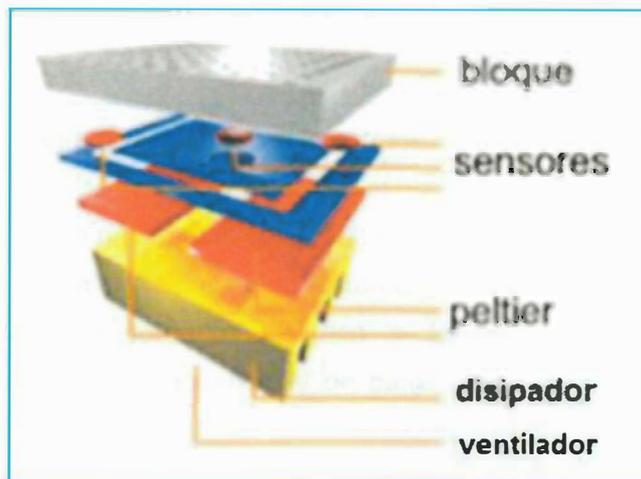


Figura 2.8: Desglose interno de los componentes del sistema Termomecánico en un Termociclador [7].

2.3.1. Celda Peltier

En la actualidad la mayoría de termocicladores utiliza para obtener el calor y frío deseado el efecto Peltier, que se logra gracias a las celdas Peltier, las cuales son utilizadas en módulos de calefacción o refrigeración [8]. Siendo esta opción tecnológica la más utilizada en el desarrollo del Termociclador.

El efecto Peltier se caracteriza por la presencia de una diferencia de temperaturas entre las dos caras de un semiconductor cuando por él circula una corriente. Una celda Peltier está conformada por dos materiales semiconductores de bismuto de telurio uno tipo P (huecos libres) y otro tipo N (electrones) en un arreglo como el mostrado en la Figura 2.9, produciéndose internamente el así llamado efecto termoeléctrico de Peltier [8]. La figura 2.9 muestra la estructura interna.

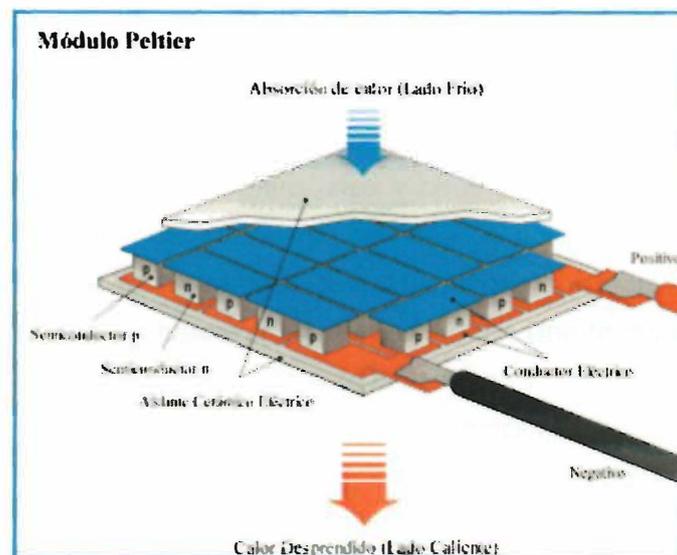


Figura 2.9: Diagrama que muestra la estructura interna de una celda Peltier [9].

La conexión interna que presenta la celda peltier consiste en conexiones eléctricas en serie y térmicas en paralelo, estas se conectan entre sí a través de uniones de cobre. La circulación de una corriente eléctrica a través de estos dos materiales semiconductores con diferente densidad de cargas libres produce una absorción o liberación de energía. La cantidad de pastillas semiconductoras depende del modelo de celda peltier a emplear y de los requerimientos de flujo de calor del sistema. Asimismo, las dimensiones están definidas por la superficie de contacto que debe haber entre el peltier y el objeto a enfriar o calentar. Una polarización como la mostrada en la figura 2.10, se distribuye a lo largo de cada elemento semiconductor de la celda, es decir, cada elemento semiconductor posee una diferencia de potencial proporcional a la polarización de entrada [10]. (ver figura 2.10)

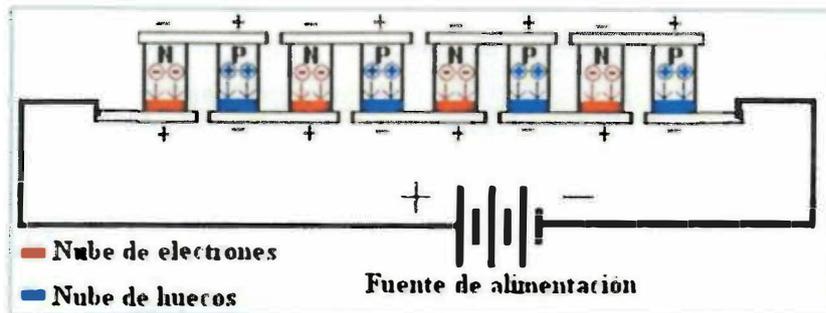


Figura 2.10: Compresión y enrarecimiento de portadores de carga cerca de la unión metal semiconductor en una celda Peltier [10].

2.3.2. Tecnología de los Termocicladores

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad existen diversos tipos de termocicladores, la mayoría basados en tecnología Peltier, por ser la que obtiene mejores resultados, la diferencia entre unos y otros se debe a la diversidad en las aplicaciones, algunas características que se tiene en consideración es el rango de temperatura, los rangos de las rampas de enfriamiento y calentamiento, la capacidad de pozos o tubos para las muestras, la precisión, etc.. Una forma de clasificar a los termocicladores es según su aplicación para la medición y cuantificación de muestras. Una característica que incrementa enormemente la funcionalidad del Termociclador; si bien los termocicladores normales (estándar) siguen siendo muy utilizados en laboratorios e instituciones pequeñas, existe una tendencia a reemplazarlos por termocicladores en tiempo real.

Termocicladores a Tiempo Final

Son los termocicladores básicos en su versión estándar. Es un equipo que sirve para la multiplicación del ADN y diversos análisis relacionados. Permiten estimar la cantidad de la muestra mas no cuantificarlas exactamente. Utilizan la tecnología o efecto Peltier, permite uniformidad en la temperatura y rampas de incremento y decremento de la temperatura, cumpliendo los procesos de la PCR.

Una característica adicional en los termocicladores es la función gradiente, un Termociclador de esta naturaleza, cuenta con un gradiente de temperatura en la bandeja, que permite seleccionar las condiciones térmicas óptimas de la PCR. Utiliza un gradiente de temperaturas programado libremente lo que permite optimizar los

pasos del protocolo PCR, utilizan índices de calentamiento y refrigeración constantes logrando obtener mayores precisiones que las maquinas PCR básicas.

A continuación se presentan algunos modelos de Termocicladores a Tiempo Final que se encuentran actualmente en el mercado.

Termocicladores a Tiempo Final



Figura 2.11: Modelo: LongGene MG25+ [18]

Tecnología: Peltier Tiempo Final
Capacidad: 0.2 ml x 25 pozos + 0.5 ml x 16 pozos
Rango de temperatura: 0°C ~ 99.9°C
Velocidad de calentamiento: 3°C/s
Velocidad de enfriamiento: 2°C/s
Precisión: $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$
Max. Numero de ciclos: 99



Figura 2.12: Modelo LongGene48G [19]

Tecnología: Peltier con gradiente Tiempo Final
Capacidad: 0.2ml x 48 pozos+0.5ml x 48 pozos
Rango de temperatura: 0°C ~ 99.9°C
Velocidad de calentamiento: 3°C/s
Velocidad de enfriamiento: 2°C/s
Precisión: $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$
Especificaciones de gradiente:
Precisión de gradiente: $\leq \pm 0.3^{\circ}\text{C}$
Uniformidad de columna: $\leq \pm 0.3^{\circ}\text{C}$
Rango de temperatura gradiente: 30°C ~99.9°C
Rango de temperatura diferencial: 1°C ~30°C

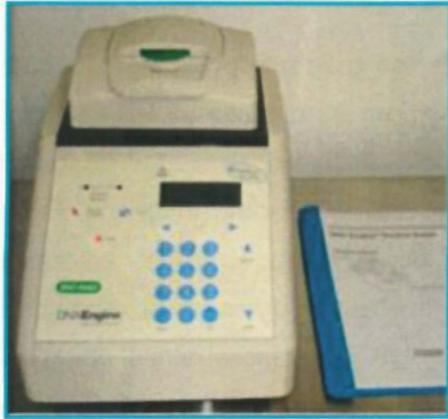


Figura 2.13: Modelo Bio-Rad PTC-200 [20]

Rango de temperatura: $-5 \sim 105^{\circ}\text{C}$
Precisión: $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$
Velocidad de rampa: $3^{\circ}\text{C}/\text{s}$
Capacidad de muestras: $96 \times 0.2\text{ml}$



Figura 2.14: Modelo Piko Thermal Cycler [21]

Configuración de bloques: 24 pozos y 96 pozos
Rangos de rampas máximas:
Calentamiento: 5°C
Enfriamiento: 4.5°C
Precisión: $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$
Rango de temperatura: $4^{\circ}\text{C} \sim 99^{\circ}\text{C}$

Termocicladores a Tiempo Real

El proceso de PCR que realiza este equipo permite cuantificar el número de nuevas hebras de ADN formadas en el momento de la reacción, visualizando en la pantalla la cantidad de muestras de ADN. Permite medir y cuantificar la acumulación PCR mientras ocurre el proceso, a una sensibilidad muy baja, además que no requiere purificar las muestras después del proceso. Es usado en un amplio rango de aplicaciones, tales como el análisis de Polimorfismo (SNP), detección patógena, medición de la interferencia del RNA y otros. Las figuras siguientes presentan algunos modelos de Termocicladores a Tiempo Real que se encuentran en el mercado.

Termocicladores a Tiempo Real



Figura 2.15. Modelo LightCycler 96 Real Time PCR [22]

Tecnología Peltier Tiempo Real
Velocidad de calentamiento: 4.4°C/s
Velocidad de enfriamiento: 2.2°C/s
Rango gradiente operacional: 37°C ~ 98°C



Figura 2.16. Modelo ShineGene Real Time PCR [23]

Tecnología Peltier Tiempo Real
Capacidad: 0.2mlx96pozos
Rango de temperatura: 0°C ~ 99.9°C
Velocidad de calentamiento: 3°C/s
Velocidad de enfriamiento: 2.5°C/s
Rango gradiente operacional: 40°C ~ 100°C
Rango de temperatura diferencial: 1°C ~25°C
Precisión: 0.1°C

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo general

La presente tesis tiene como objetivo implementar un prototipo de termociclador usando la celda peltier VT-199-1.4-0.8, la cual estará alimentada con una única fuente de 24 VDC/22A, de tal manera que nos permita ejecutar el proceso de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de esta forma lograr la replicación de segmentos específicos de muestras de ADN.

2.4.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de la presente tesis son:

1. Adecuar el programa de control, para que a partir de una fuente de 24 VDC, se pueda también alimentar a la celda peltier VT-199-1.4-0.8 con 12 VDC.
2. Rediseño e implementación de la etapa de potencia del proceso de PCR para el módulo.
3. Lograr velocidades de calentamiento o enfriamiento de aproximadamente 1°C/s.
4. El rango de la precisión de temperatura será de $\pm 1^\circ\text{C}$.
5. Presentar una interfaz de usuario de fácil manejo con teclado numérico y un visualizador gráfico de pantalla de cristal líquido para poder hacer la programación de los ciclos del PCR.

CAPÍTULO 3

Implementación del proceso de PCR con una fuente de 24 VDC

El esquema general del sistema está definido por el diagrama de bloques de la figura 3.1, donde se puede identificar las siguientes etapas: Etapa de interfaz de usuario, que está compuesto por el teclado o dispositivo de entrada de datos, la pantalla de visualización o dispositivo de salida de datos; Etapa de control, compuesto por el controlador que manejará todos los recursos del sistema; Etapa de potencia, para controlar el dispositivo transmisor de calor o también llamado celda Peltier; Etapa del sistema mecánico, compuesto por un bloque metálico conteniendo al elemento transmisor de calor y que es donde se colocan las muestras de ADN y finalmente una Etapa de sensado de temperatura, compuesto por un sensor de temperatura colocado en dicho bloque metálico que actuará como realimentación en el sistema.

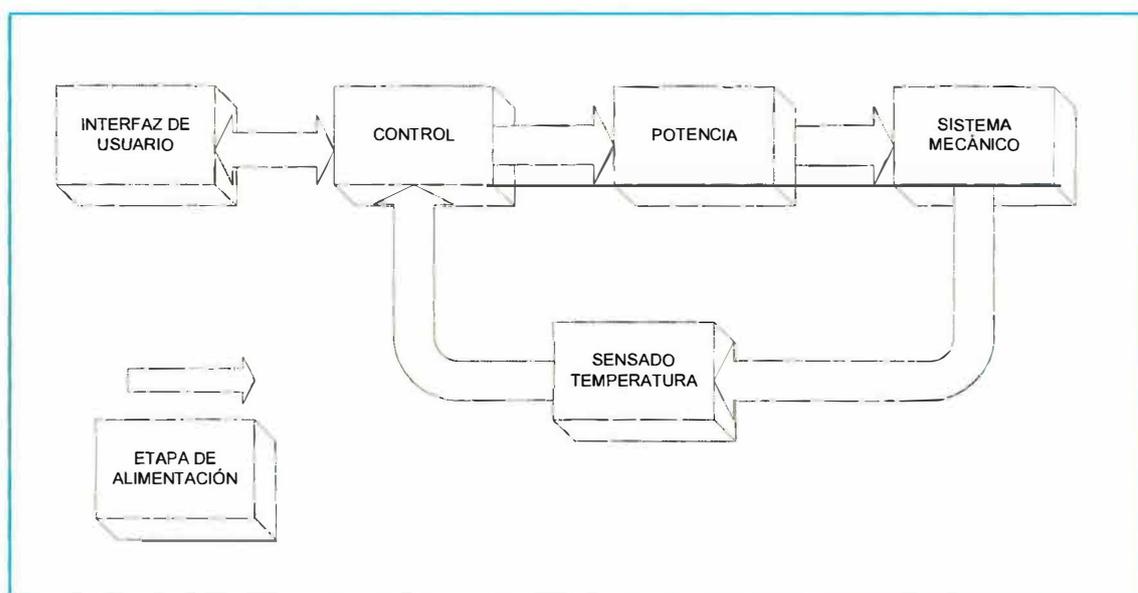


Figura 3.1: Diagrama de bloques general del sistema.

En la interfaz de usuario, se ingresan los parámetros de temperatura y tiempos deseados para el ciclo PCR y se visualizan las variables de temperatura y tiempo.

La etapa de sensado monitorea en todo momento la temperatura del bloque metálico de la etapa del sistema mecánico.

Conocido el valor de la temperatura, la etapa de control, mediante un algoritmo, obtiene un valor de control adecuado a fin de alcanzar la temperatura deseada.

El control enviará una señal hacia el excitador de potencia, el cual la acondicionará hacia la etapa de potencia, que generará un aumento o disminución de temperatura sobre el sistema mecánico.

En la mayoría de las etapas que se desarrollan a continuación se realiza una revisión a los trabajos: “Diseño e Implementación de un módulo para procesos de reacción de cadena de la polimerasa (PCR) en la replicación de ADN” por Zegarra, D y Ponce, J [12], “Caracterización de la celda Peltier para un prototipo de termociclador” por Ayllón, G [14].

En este sentido, en cada una de las siguientes etapas, se desarrolla teniendo como base los mejores resultados, conclusiones y recomendaciones de tesis que trabajaron en este tema, así como también los resultados de investigaciones propias de esta tesis.

A continuación se muestra el desarrollo de cada una de las siguientes etapas.

3.1. Etapa del sistema Termomecánico

La parte mecánica fue diseñada e implementada por el tesista Andrés Eloy Andía Paredes en su trabajo “Diseño, Fabricación, Ensamblaje y prueba de los componentes mecánicos de un termociclador” [15], en la cual realiza el diseño de los componentes mecánicos de un termociclador, partiendo del diseño del bloque portamuestras, que ya se encontraba definido, realiza el diseño preliminar y se hace la comprobación de los mismos a través de métodos computacionales, la fabricación es básicamente de la tapa y la carcasa que alberga a los demás componentes, ya que estos pueden ser adquiridos en el mercado local, abaratando los costos de fabricación.

Para el diseño de esta etapa, tuvo en cuenta estudios previos y realizó pruebas que corroboraron los cálculos previos que son reforzados con simulaciones por métodos computacionales.

Básicamente el trabajo de Andrés Andía se basa en cinco etapas: Siendo la primera una presentación de las características del equipo, aplicación y una descripción del uso final que se requiere lograr; la segunda etapa, que consiste en un diseño preliminar con métodos analíticos y simplificaciones de cálculo; la tercera etapa, en la cual se toman todas las consideraciones previas a través del análisis de simulación por computadora, concluyéndose con un diseño final; la cuarta etapa, que consiste en la fabricación de un prototipo del sistema Termomecánico; finalmente, concluye en la quinta etapa que trata de realizar las pruebas necesarias para experimentar el desempeño que se buscó en la etapa de diseño.

El resultado final de este trabajo fue la construcción de la tapa y la carcasa incluyendo por dentro el bloque portamuestra con la celda Peltier modelo VT-199-1.4-0.8.

La elección de este tipo de Peltier se dio debido a que anteriormente en la tesis de David Zegarra [12] se había hecho el cálculo de calor necesario, como se muestra a continuación.

$$Q = m \cdot C_p \cdot (\Delta T) / \tau$$

Donde

$$\tau = 1.5 \text{ } ^\circ\text{C/s} \quad m = \text{peso} = 0.32 \text{ Kg (bloque de plata)}$$

$$\Delta T = 40 \text{ } ^\circ\text{C} \quad C_p = \text{calor específico} = 235 \text{ J/(Kg.K)}$$

Teniendo un valor aproximado de $Q=75.2 \text{ W}$, razón por la cual el tesista David Zegarra eligió el modelo CP 1.4-127-10L que tiene un $Q=33.4 \text{ W}$ (por ello se requerían dos celdas Peltier) y una corriente máxima de 3.9 A .

Sin embargo en las pruebas que realizó, se mostró que se debía mejorar la elección de la celda Peltier, razón por la cual el tesista Piminchumo realiza un mejor cálculo dando como solución la elección de la Peltier VT-199-1.4-0.8, la cual tiene una $Q_{\text{max}}=172 \text{ W}$ y una corriente máxima de consumo de 11.3 A .

También cabe resaltar, que la construcción de esta parte mecánica no previó un agujero por el cual debió ingresar el sensor, por ende parte del trabajo de esta tesis es la realización de dicho agujero en la bandeja portamuestra para la toma de datos.

Un resumen de la geometría del sistema Termomecánico (ver figura 3.2) se describe a continuación:

Tabla 3.1: Dimensionamiento del sistema Termomecánico

Componente	Cantidad	Dimensiones (mm)			Material	Obs.
		Largo	Ancho	Alto		
Bandeja Portamuestras	1	74	56	15	Plata Pura (99.99%)	48 agujeros
Módulo Peltier	1	38	38	3	Compuestos Varios	Modelo: VT-199-1.4-0-8
Disipador	1	170	120	76	Aluminio	12 Aletas
Ventilador	1	110	110	37	Plástico	Modelo: 109P DC12V 0.52A

Observación:

Como parte del análisis previo que se realizó en la etapa de pruebas, se decidió que se debía trabajar con otro disipador, el motivo principal era que en su elaboración no previnieron errores de construcción, motivo por el cual la bandeja portamuestras no enfriaba y resultaba tedioso y muy complicado tomar los valores correspondientes de las pruebas realizadas.

Las características del disipador a utilizar son las siguientes:

Tabla 3.2: Dimensiones del disipador de aluminio

Componente	Cantidad	Dimensiones (mm)			Material	Obs.
		Largo	Ancho	Alto		
Disipador	1	160	70	30	Aluminio	21 Aletas

A continuación en la figura 3.2, se puede apreciar el sistema Termomecánico compuesto por la bandeja portamuestra, celda peltier, disipador y ventilador.



Figura 3.2: Sistema Termomecánico.

3.2. Etapa de Sensado de Temperatura

Esta etapa brindará un parámetro equivalente, ya sea voltaje o corriente, a la temperatura real del sistema a controlar. Es una etapa sensible ya que se debe buscar disminuir notablemente el error de la adquisición para que la muestra de ADN no se degrade, esta etapa consta de tres sub etapas: sensado, acondicionamiento y amplificación respectivamente.

3.2.1. Etapa de Sensado

Requerimientos

- Deberá tener un rango de medida mínimo de 0 a 95 °C, ya que las temperaturas necesarias para la replicación del ADN se encuentran dentro de este rango.
- Deberá tener una precisión de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ para obtener el menor error de adquisición en la toma de muestra de las temperaturas.
- Tiempo de respuesta de un segundo es un valor aceptable, para que la adquisición sea acorde a los valores reales en cada instante.
- Deberá ser lineal, para que facilite la programación en la toma de adquisición de datos de la etapa de control.

- Deberá ser de dimensiones longitudinales pequeñas, ya que la bandeja portamuestras donde irán los microtubos de muestra de ADN mide 7,4 cm * 5,6 cm * 1,5 cm aproximadamente.

Alternativas de solución

Existen muchas opciones para la adquisición de temperatura del portamuestra de microtubos que contendrán las muestras de ADN. Dentro de este abanico de opciones, se mencionan los más conocidos: termocuplas, termistores, RTD, circuito integrado. A continuación se muestra la tabla 3.3, con las características de cada uno de los componentes mencionados, para su posterior análisis, comparación y elección del sensor que más se adecua a nuestro caso en particular.

Tabla 3.3: Sensores de Temperatura

Sensor	Características	
	Ventajas	Desventajas
Termistor	Tiempo de respuesta rápido Grandes cambios de R vs T Alta Sensibilidad Bajo costo y tamaño pequeño	No lineal Requiere una fuente externa de voltaje
Termocupla	Robustos y económicos Amplio rango de temperatura Muy usados en la industria	Baja sensibilidad No lineal Susceptible a ruido eléctrico
RTD	Más estabilidad Más lineal que Termocuplas Ancho rango de temperatura de operación	Frágiles Costosas Tiempo de respuesta lento
Circuito Integrado	Lineal Bajo costo La salida conectado directamente al ADC.	Rango limitado de Temperatura. Respuesta lenta Requiere fuente de Voltaje No tiene buen acople de temperatura con el ambiente

Elaboración: Propia.

Elección del Sensor

Para elegir el sensor más adecuado para el sistema de adquisición del presente documento, se deberá partir de un análisis de los requerimientos dados y compararlos con cada elemento de la tabla 3.3, de esta comparación se elegirá al sensor que cumpla con todos o la mayoría de los requerimientos.

La Termocupla se descarta ya que tiene baja sensibilidad, requerimiento prioritario. Así también se descarta el RTD ya que son frágiles y necesitamos un sensor robusto, en el caso del circuito integrado se descarta al tener bajo rango de temperatura. La última elección sería el termistor, la única desventaja encontrada sería su no linealidad; sin embargo, esta es salvable con una circuitería simple adicional, además el costo no es elevado; motivo por el cual, se elegirá el termistor, ya que cumple con todos los requerimientos mencionados: alta sensibilidad, pequeño y la linealidad se conseguirá con una circuitería adicional, como por ejemplo el puente de wheatstone.

TERMISTOR [25]

Estos son principalmente de dos tipos: NTC, con un coeficiente negativo de temperatura con la resistencia; y PTC, con un coeficiente positivo de resistencia.

En el mercado se encontró al fabricante Yellow Spring Instrument (YSI), el cual tiene la gran ventaja de fabricar componentes termilíneares, que brindan una respuesta lineal, al realizar un arreglo con uno de sus termistores que fabrican en conjunto con un set de resistencias. YSI fabrica termistores NTC, los cuales exhiben una elevada caída en la resistencia mientras la temperatura se incrementa, proporcionando una alta sensibilidad a los cambios de temperatura. La resistencia cambia aproximadamente tres órdenes de magnitud en un rango de 100 ° C. Este provee un medio de medida de variaciones muy pequeñas de temperatura y variaciones muy precisas.

VENTAJA DE LOS TERMISTORES DEL FABRICANTE YSI [25]

- Fabrican componentes termilíneares, que brindan una respuesta lineal.
- Sensibilidad, un termistor es mucho más sensible que otros sensores al cambio de temperatura.
- Conexión dos cables. No necesita compensación de unión como en el caso de Termocupla. La elevada resistencia inherente en los termistores permiten una larga longitud de cables sin introducir errores significantes
- Sello hermético, termistores YSI con encapsulamiento de vidrio logran un sello hermético entre el ambiente y el disco termistor. Este permite mediciones en entornos severos de humedad.

- Flexibilidad, termistores YSI vienen en una gran variedad de resistencias, características de pendientes, configuración de cables y encapsulación de materiales.

Como es lógico, se elegirá el componente termilínear para el presente trabajo. Cada red termilínear consiste en dos subcomponentes: un componente termistor y un set de resistencias. El elemento activo es el componente termistor, hecho de dos termistores de precisión YSI y encapsulamiento de resina. A continuación se muestra en la figura 3.3 los dos componentes termistores que ofrece YSI.

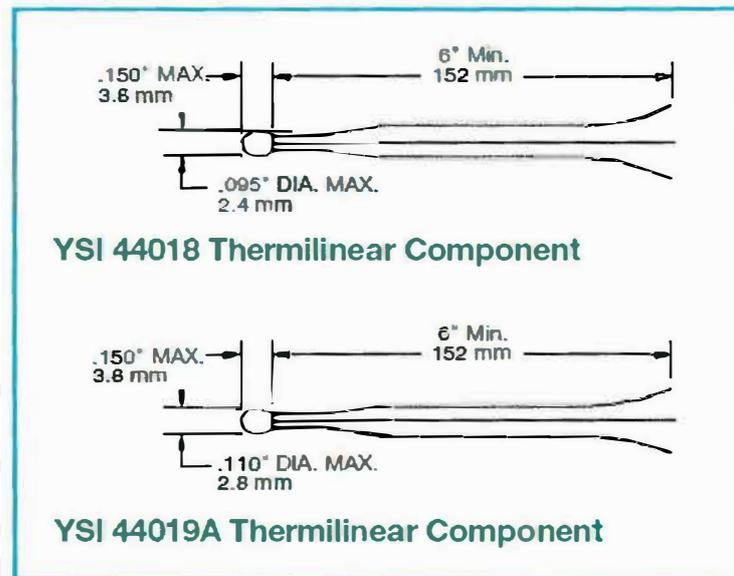


Figura 3.3: Red Termilínear disponibles por YSI [25].

Se elegirá el componente termistor YSI 44018 ya que tiene un rango de temperatura de hasta 105°C, mientras que el termistor 44019A tiene un rango de temperatura hasta 85°C.

3.2.2. Etapa de Acondicionamiento

El set de resistencias consiste de dos resistencias de precisión de películas de metal para uso con los componentes termistores 44018 y 44019A; en la figura 3.4, se muestra la configuración de esta red termilínear.

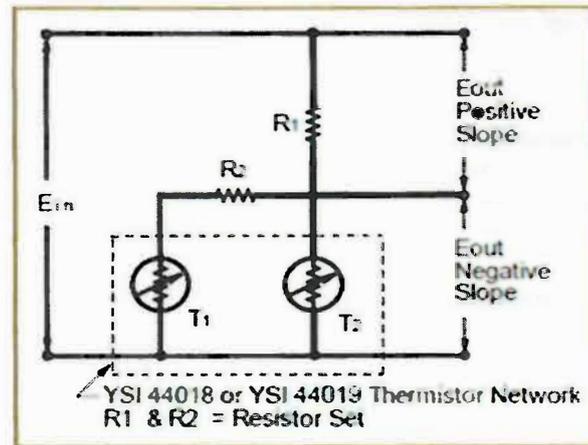


Figura 3.4: Red Termilinear [25].

La relación de la red termilinear puede ser definida como:

$$E_{out} = (m \cdot E_{in}) T + (b \cdot E_{in})$$

Donde:

E_{out} = voltaje de salida

m = cambio de voltaje por grado centígrado de temperatura (pendiente)

E_{in} = voltaje de entrada

T = temperatura en °C

b = voltaje a 0° y 1 voltio de entrada

A continuación, en la tabla 3.4, se muestra las especificaciones del componente termistor 44018 con diferentes set de resistencias.

Tabla 3.4: Especificaciones de las diferentes redes termilinear

YSI Thermilinear Component Specifications		
Component	Maximum Operating Temperature	Accuracy & Interchangeability
YSI 44018	105°C (220°F)	±0.15°C
YSI Thermilinear Network Specifications		
YSI Networks Using 44018		
44201	Linear Range 0 to +100°C	Linearity Deviation ±0.216°C
44018	Resistance Mode $R_1 = (-17.115)T + 2768.23$ $R_2 = 30,000 \Omega @ 25^\circ\text{C}$	E_p Positive Mode $E_{p+} = (+0.0063483 E_p)T + 0.13493 E_p$
		E_n Negative Mode $E_{n-} = (-0.0063483 E_n)T + 0.86507 E_n$
44301	E_p Max I_p Max 2.0V 625 μA	Min RL 10 M Ω
	Resistor Error ±0.14°C @ 0°C, ±0.03°C @ +100°C	
44202	Linear Range -5 to +45°C	Linearity Deviation ±0.066°C
44018	Resistance Mode $R_1 = (-32.402)T + 4593.39$ $R_2 = 30,000 \Omega @ 25^\circ\text{C}$	E_p Positive Mode $E_{p+} = (+0.0056846 E_p)T + 0.194142 E_p$
		E_n Negative Mode $E_{n-} = (-0.0056846 E_n)T + 0.806856 E_n$
44302	E_p Max I_p Max 3.5V 615 μA	Min RL 10 M Ω
	Resistor Error ±0.12°C @ -5°C, ±0.07°C @ +45°C	
44203	Linear Range -30 to +50°C	Linearity Deviation ±0.16°C
44018	Resistance Mode $R_1 = (-127.096)T + 12175$ $R_2 = 30,000 \Omega @ 25^\circ\text{C}$	E_p Positive Mode $E_{p+} = (+0.0067966 E_p)T + 0.34893 E_p$
		E_n Negative Mode $E_{n-} = (-0.0067966 E_n)T + 0.65107 E_n$
44303	E_p Max I_p Max 3.0V 475 μA	Min RL 10 M Ω
	Resistor Error ±0.12°C @ -30°C, ±0.02°C @ +50°C	

Elaboración: Hoja técnica del YSI [25].

Se utilizará la Red Termilinear 44201, debido a que es el único que cumple el rango de temperatura de trabajo.

Las características técnicas de la red 44201 se detallan a continuación:

- Componente Termilinear: YSI44018
- Precisión e intercambiabilidad: ± 0.15 °C
- Set de resistencias 44301: R1 = 3.2 K Ω , R2 = 6.25 K Ω
- Rango de aproximación lineal: 0 a 100°C
- Voltaje de alimentación máximo: 2.0 V
- Corriente de entrada máxima: 625 μA

• Error de resistencia: $\pm 0.14^{\circ}\text{C}$ @ 0°C , $\pm 0.03^{\circ}\text{C}$ @ 100°C

• Modo voltaje negativo:

$$E_{\text{out}} = (-0.0053483 * E_{\text{in}}) * T + 0.86507 * E_{\text{in}}$$

• Modo voltaje positivo:

$$E_{\text{out}} = (0.0053483 * E_{\text{in}}) * T + 0.13493 * E_{\text{in}}$$

De esta guía de diseño podemos hallar todos los parámetros que requerimos de la siguiente manera:

Se considera inicialmente la pendiente de salida: $-10 \text{ mV}/^{\circ}\text{C}$ (pendiente negativa)

Nosotros usaremos red YSI 44201 en este ejemplo. Esta red tiene un rango de temperatura de 0°C a 100°C , incluye el termilínear YSI 44018 y el set de resistor YSI 44301. Nosotros hemos visto un diseño de las páginas de especificación de la red termilínear y seguiremos estos pasos para hallar todos los parámetros según YSI [25].

$$R1 = 3200 \Omega$$

$$R2 = 6250 \Omega$$

$$E_o = (-0.0053483 E_{\text{in}}) T + 0.86507 E_{\text{in}}$$

sensitivity constant

$$= (\delta / \delta) E_{\text{in}}$$

$$= -0.0053483$$

output voltage at 0°C per volt in

$$= E_{00^{\circ}\text{C}} / \delta E_{\text{in}}$$

$$= +0.86507$$

1. Determinar el voltaje de entrada que resultará de la pendiente deseada ($-10 \text{ mV}/^{\circ}\text{C}$ en este ejemplo). Este es igual a la pendiente dividida por la constante de sensibilidad.

$$E_{\text{in}} = -0.01 / -0.0053483 = 1.869753 \text{ V}$$

2. Determinar el voltaje de salida (E_{out}). La ecuación general es dada con la variable de temperatura.

$$\text{A } 0^{\circ}\text{C}: = -0.0053483 * 1.869753 * 0^{\circ}\text{C} + 0.86507 * 1.869753 = 1.617467 \text{ V}$$

2. Disipación de potencia. Se calcula el autocalentamiento para evaluar el efecto de potencia en la precisión de medición. El autocalentamiento es más grave para el termistor de mayor resistencia (T2) a alta temperatura. Un termistor de $30 \text{ K}\Omega$ @ 25°C tiene una resistencia de 2069Ω a 100°C .

$$P = E^2/R$$

Donde:

P = Disipación de potencia en watts

E = Voltaje a la temperatura máxima

R = resistencia del termistor de mayor resistencia a temperatura máxima

$$P = 0.617467^2V/2069\Omega = 0.000184 \text{ watts}$$

La constante de disipación es usada para la conversión a unidad de temperatura.

Asumimos por ejemplo que el componente está inmerso en aire quieto. La constante de disipación para un YSI 44018 es 1.3143mW/°C (0.0013143W/°C).

$$\text{Error de autocalentamiento} = 0.000184W/0.0013143W/^\circ C = 0.14^\circ C$$

Finalmente la ecuación de salida de voltaje de esta etapa con respecto a la temperatura será:

$$E_{out} = -0.01T + 1.617467$$

A continuación, en la tabla 3.5, se muestra los valores de la temperatura versus el voltaje de salida que se obtiene.

Tabla 3.5: Valores obtenidos de voltaje y temperatura a la salida de la red termilinear.

Temperatura (°C)	Voltaje (v)
0	1.617467
5	1.567467
10	1.517467
15	1.467467
20	1.417467
25	1.367467
27	1.347467
30	1.317467
35	1.267467
40	1.217467
45	1.167467
50	1.117467
55	1.067467
60	1.017467
65	0.967467
70	0.917467
75	0.867467
80	0.817467
85	0.767467
90	0.717467
95	0.667467
100	0.617467

Elaboración: Propia

Para mayor ejemplificación se muestra el gráfico siguiente de los resultados obtenidos en la tabla anterior, se puede observar la linealidad de la curva. (ver figura 3.5)

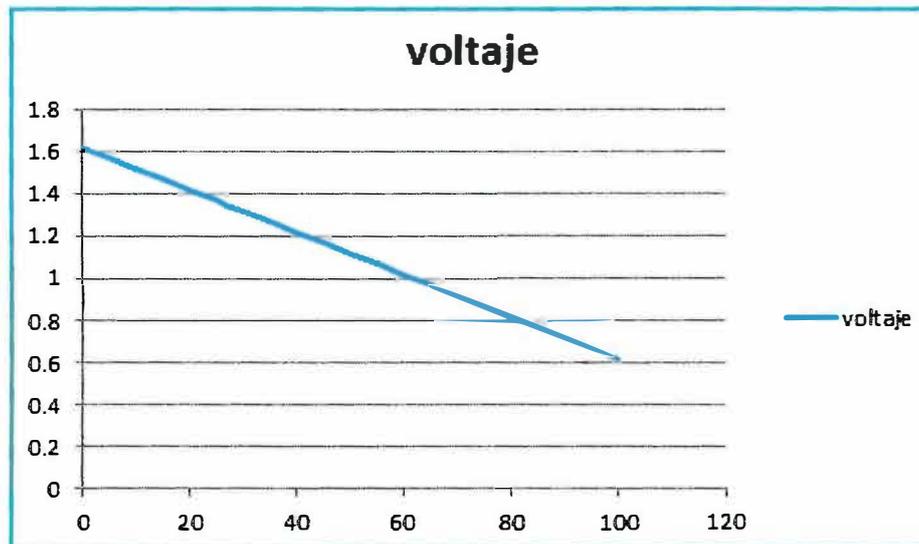


Figura 3.5: Voltaje (v) vs Temperatura (°C) a la salida de la red termilnear.

3.2.3. Etapa de Amplificación

La salida de la etapa previa se encuentra en el rango de [1.617467 – 0.617467 V] con las temperaturas de 0 y 100 °C respectivamente, siendo este rango de voltaje muy pequeño para poder trabajar en el conversor análogo digital y además de ser muy susceptible al ruido se requiere una etapa de amplificación.

El amplificador a elegir deberá tener los siguientes requerimientos:

- El amplificador deberá tener un error de entrada menor a 10 mV, debido a que la pendiente de la etapa de sensado es 10mV/°C y por requerimiento esta etapa debe tener una precisión de 1°C.
- Alto rechazo en modo común (CMRR) para que el voltaje de salida no sea afectado por el voltaje en modo común en la entrada. Esto implica que el voltaje a la salida en modo común sea menor que 10mV x G.

Para el cálculo del CMRR mínimo que deberá tener el amplificador se usa la siguiente ecuación.

$$CMRR \geq \frac{2 V_{cm}}{e}, \quad (\text{ecuación 1}) \quad [31]$$

Donde:

V_{cm}: voltaje en modo común

e: voltaje de interferencia

El voltaje en modo común en la entrada es 1.617467 V.

La señal de interferencia que se permitirá será del 1%.Entonces los $10\text{mV} \times 0.01=100 \mu\text{V}$
 Aplicando la ecuación 1.

$$\text{CMRR} \geq \frac{2 \cdot 1.617467}{100 \mu\text{V}} = 32350$$

$$\text{CMRR min} = 20 \log (32350)=90.2 \text{ dB.}$$

Se buscó amplificadores de instrumentación que cumplan con los requerimientos mencionados, encontrando en el fabricante de Texas Instruments de la familia INA que son amplificadores de instrumentación de precisión.Se elige el INA125. A continuación se muestra el esquema de este amplificador de instrumentación. (ver figura 3.6)

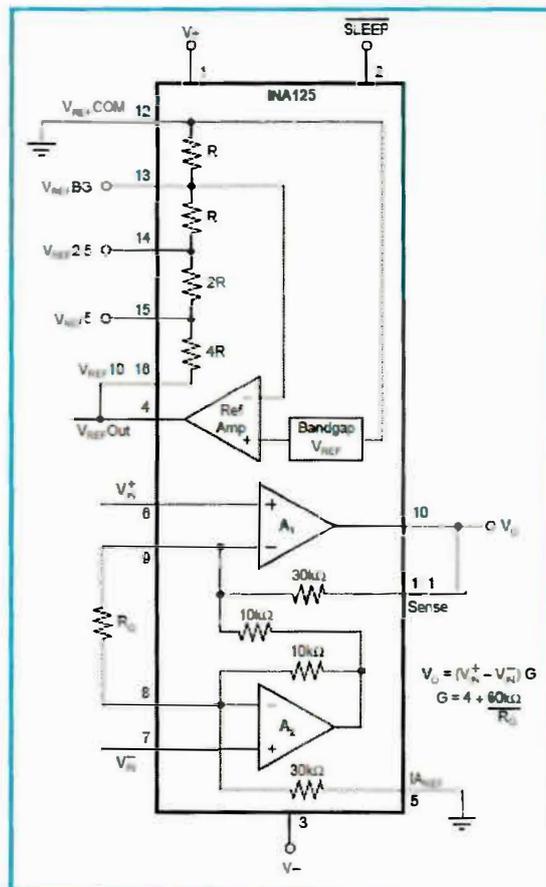


Figura 3.6: Amplificador de Instrumentación INA125 [26].

En la figura 3.4, se muestran las conexiones recomendadas por el fabricante, en el pin 6 irá el voltaje de referencia, que en nuestro caso es de 1.617467v y en el pin 7 va la salida de nuestra red termilnear, estas dos señales se restarán logrando que el rango que antes era de $[1.617467 - 0.617467 \text{ v}]$ a la salida de la red termilnear sea ahora $[0-1\text{v}]$ para un rango de temperatura de $0-100 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego de esta diferencia el amplificador diferencial deberá poner este rango entre los valores de $[0-5\text{V}]$, ya que es en este rango que trabaja el convertidor análogo digital del Microcontrolador.

Entonces por lo anterior mencionado la ganancia debería ser 5.

$$\text{Siendo: } G = 4 + \frac{60 \text{ K}\Omega}{R_g} = 5$$

$$R_g = 60 \text{ K}\Omega$$

Con la utilización del amplificador de instrumentación, en la tabla 3.6, podemos ver los valores de voltaje a la salida V_o .

Tabla 3.6: Valores de V_o a la salida del amplificador de instrumentación.

Temperatura (°C)	voltaje (v)
0	0
5	0.25
10	0.5
15	0.75
20	1
25	1.25
27	1.35
30	1.5
35	1.75
40	2
45	2.25
50	2.5
55	2.75
60	3
65	3.25
70	3.5
75	3.75
80	4
85	4.25
90	4.5
95	4.75
100	5

Elaboración: Propia

A continuación se muestra en la figura 3.7, una gráfica en la cual se puede observar la linealidad a la salida del INA125P.

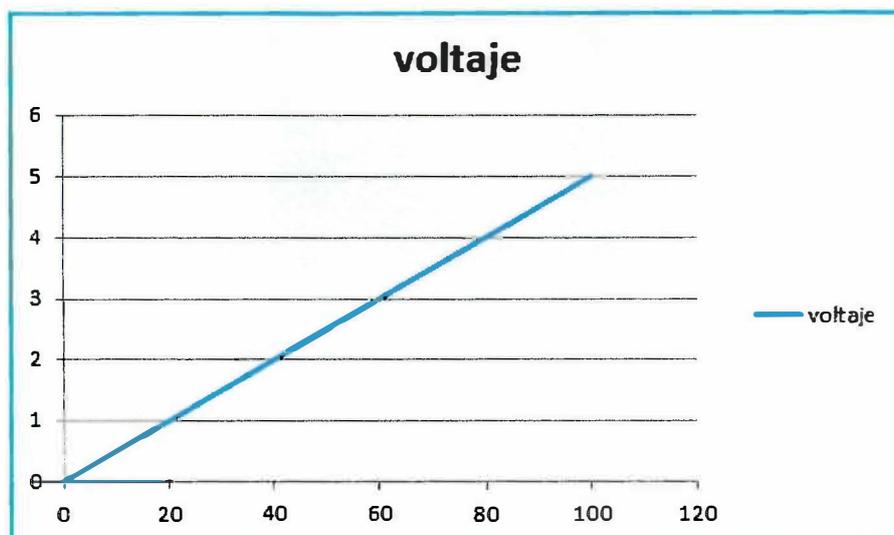


Figura 3.7: Voltaje (v) vs Temperatura (°C) a la salida del amplificador de instrumentación.

3.3. Etapa de Interfaz de Usuario

La etapa de interfaz de usuario involucra la elección e implementación de algún sistema para el ingreso de datos así como la visualización de ciertos datos de interés en el proceso de PCR.

Requerimientos

El proceso de PCR involucra tres etapas, y para cada una de estas etapas se ingresarán sus tiempos como temperaturas respectivas, así también se debe ingresar el número de ciclos de PCR, es decir se debe tener un mecanismo que permita ingresar todos estos parámetros.

Así también se deben poder visualizar todos estos parámetros ingresados que en total son tres pares de temperatura- tiempo, el mecanismo que se implemente deberá tener la capacidad de visualizar todos estos parámetros.

Elección

Por lo mencionado en la parte de requerimientos, se requiere un mecanismo que tenga los números de 0-9 para ingresar los parámetros de temperatura y tiempos así también un botón de OK y clear para borrar algún dato errado, en este sentido la mejor elección recae en utilizar un teclado matricial de 4x4, el cual tendrá 16 teclas controladas por 8 líneas de control.

A continuación se muestra el teclado matricial a utilizar en la figura 3.8.



Figura 3.8: Teclado matricial

Asimismo se debe elegir una pantalla que permita visualizar simultáneamente el ingreso que se realizó de los 3 pares de temperaturas con sus respectivos tiempos, así como las opciones de “enter” y “clear”, motivo por el cual se elige una pantalla LCD de 4x20 caracteres de la marca Systronix modelo J204a que se controlará con 7 líneas. A continuación se muestra en la figura 3.9, esta pantalla LCD.



Figura 3.9: Pantalla LCD de 4 líneas x 20 caracteres

Para un resumen se presenta la siguiente tabla de conexionado.

Tabla 3.7: Tabla de conexionado del interfaz de usuario

	Número de Pines	Pines del Microcontrolador
Sensor de Temperatura	1	Análoga/Digital
Teclado Matricial	8	Digital
LCD 4 x 20	7	Digital
Conversor Serial-USB	2	Digital
Driver de Potencia	1	Digital

3.4. Etapa de control

La etapa de control a usar deberá cumplir con los siguientes requerimientos:

Requerimientos

- Deberá tener un conversor análogo digital para el procesamiento de las señales que entregará la etapa de sensado, este conversor deberá poseer una resolución mínima aceptable, es decir una mínima variación en la entrada que produce un cambio digital. En nuestro caso para un rango de 0-5 V va con el rango de 0-100°C respectivamente, es decir cada 1°C varia 0.05 V, si tomamos como resolución mínima 0.5°C equivaldría a 0.025 V; ahora bien, según lo planteado por Piminchumo, O. Si tomamos una resolución de 0.5°C sería suficiente para la implementación del prototipo, pero siendo más exigentes y tratando de igualar a termómetros digitales del mercado, los cuales tienen una resolución de $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ó $\pm 0.2^\circ\text{C}$, se trabajará con una precisión parecida, con esto lograríamos más exactitud en los datos tomados y curvas más definidas con sus respectivas pendientes.

Con esto procedemos a analizar el número de bits mínimos necesarios para el ADC.

$$\text{Resolución del ADC} = V/2^n, \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

V= voltaje de referencia (5V)

n = número de bits de resolución del microcontrolador

Reemplazando en la ecuación 1, se tiene:

$$2^n = 5/0.005$$

$$2^n = 1000, \quad n = 9.97, \quad \text{entonces aproximado } n = 10$$

Entonces la resolución con la que trabajará el ADC será de 10 bits.

Otro parámetro importante es la velocidad de conversión, un valor aceptable debido a la naturaleza de este proyecto deberá no ser mayor a 500 ms.

- Deberá tener una señal PWM, cuya señal irá a la etapa de potencia para controlar el flujo y dirección de corriente hacia la celda Peltier, lo cual reflejará en un aumento, permanencia o disminución de calor de los microtubos que contienen las muestras de ADN.
- Deberá tener la suficiente cantidad de puertos requeridos, como los mencionados en la etapa de interfaz de usuario.

Alternativas de solución

En la tabla 3.8 se mencionan las principales características del Atmega8L y PIC16F877A.

Tabla 3.8: Características principales del Atmega8L y del PIC16F877A

Característica	Atmega8L	PIC16F877A
Rango de voltaje de alimentación	2.7 a 5.5V	2.5 a 5V
Corriente suministrada	15mA	25mA
Rango de frecuencia del reloj interno	1 a 16MHZ	1 a 20MHZ
Memoria Flash	8K bytes	60K bytes
Memoria EEPROM	512 bytes	256 x 8bytes
Resolución ADC interno	8 a 10 bits	10 bits
Modo de programación	Serial y Paralelo	Serial y Paralelo
numero de puertos seria (USART)	1	1

Elaboración: Hoja técnica Atmega8L y PIC16F877A

Como se puede observar de la tabla 3.7, tanto el microcontrolador Atmega8L como el PIC16F877A cumplen con los requerimientos mencionados; empero, elegimos el PIC16F877A de Microchip porque se tiene mayor experiencia y conocimiento del mismo, ello facilitará el buen uso para la programación en la etapa previa de sensado de temperatura.

CONVERSOR ANÁLOGO DIGITAL

El ADC del PIC16F877 tiene una resolución de 10 bits, es decir:

Resolución del ADC = $\frac{5V}{2^{10}} = 0.0048V/\text{paso}$, lo que corresponde a un bit.

Siguiendo estos lineamientos tenemos que:

$$\begin{aligned} 100^{\circ}\text{C} &<> 5V &<> 1023 \text{ unidades} \\ 0.0977^{\circ}\text{C} &<> 4.88 \text{ mV} &<> 1 \text{ unidad} \end{aligned}$$

A continuación se muestra la tabla 3.9, que ejemplifica lo mencionado:

Tabla 3.9: Etapa ADC

Temperatura sensada	Voltaje que ingresa al ADC	Valor que se graba en registros dentro del PIC16F877
0 °C	0 V	0000 0000
0.0977 °C	4.88 mV	0000 0001
0.1954 °C	9.76 mV	0000 0010

Elaboración: Propia

El valor proveniente del sensor de temperatura (T_{sensor}) ingresa al ADC del PIC 16F877 por el pin RA0/AN0 (pin 2 del PIC), se guarda en los registros ADRESH: ADRESL y luego, de acuerdo a la programación, se compara dicho valor con el de la temperatura ingresada por el usuario (ver figura 3.10). De esta manera se elige el duty cycle del PWM que generará el microcontrolador.

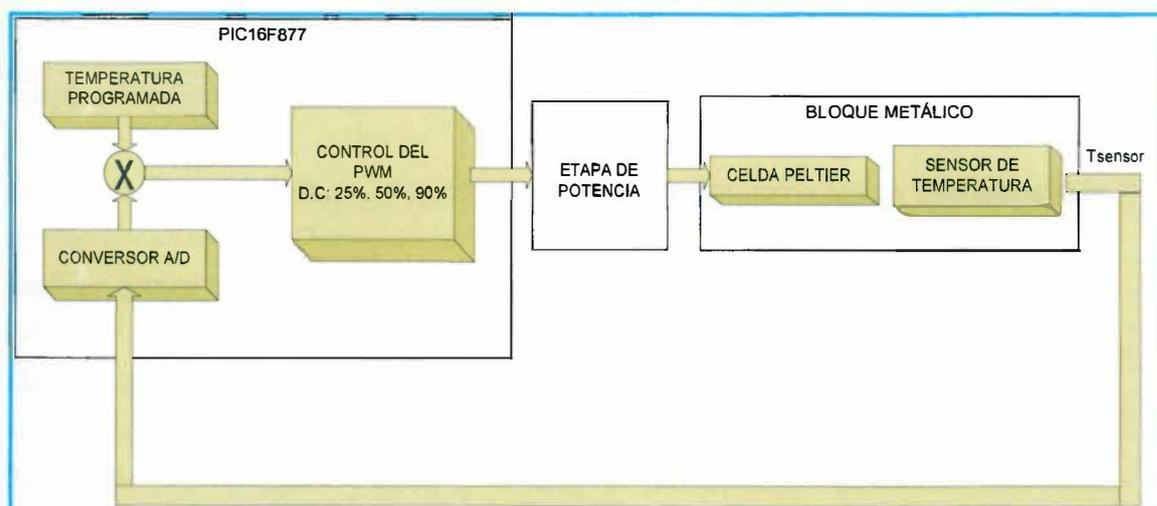


Figura 3.10: Esquema de la forma de control del Duty Cycle del PWM (90%, 50% ó 25%). T_{sensor} se compara con la temperatura programada.

Respecto a la frecuencia de trabajo de la celda Peltier, podemos encontrar diversas consideraciones. Algunos fabricantes recomiendan trabajar dichas celdas con frecuencias alrededor de 5KHz [27] para evitar fatiga mecánica por la inercia térmica que se produce y evitar así su pronta destrucción, mientras que otros como Marlow Industries [28] en la sección Frequently Asked Questions, recomienda que la frecuencia sea mayor a 1KHz. Por otro lado Tellurex Corporation [32] recomienda usar una frecuencia alrededor de 120Hz por cuestiones de compatibilidad electromagnética.

Se decide trabajar con una frecuencia de 2.5KHz, teniendo en cuenta que valores más altos de esta frecuencia producirá un menor valor de los componentes del filtro LC, como se verá más adelante. El periodo de la señal queda definido a:

$$T = \frac{1}{2.5KHz} = \frac{1}{2.5} \times 10^{-3} = 400\mu s$$

Elección del Duty Cycle (ciclo de trabajo)

Para hallar cualquier valor de duty cycle se procederá a demostrar como es el cálculo del mismo empleando la fórmula de la PWM, la tabla 3.10 muestra estos valores.

Tabla 3.10: Elección de Duty Cycle

EFEECTO	DUTY CYCLE
Enfriamiento	25%
Conservación	50%
calentamiento	90%

Elaboración: Propia

El cálculo de los valores de duty cycles se mencionarán como fueron deducidos más adelante y se eligieron, tomando como base los resultados de la tesis de Gerson A., la cual se enfoca hacia el máximo y eficiente desempeño del proceso de replicación de ADN, él llega a estas conclusiones sin utilizar control con PWM, sino conectando directamente la fuente de 12 V y 24 V, en este caso al utilizar control con PWM se requiere calcular los duty cycle con los que se obtienen estos voltajes.

En este sentido se obtiene 12VDC en la etapa de enfriamiento si se tiene un duty cycle de 25% y en la etapa de calentamiento se obtiene 19,2 VDC con un duty cycle de 90%.

Se muestra la fórmula a utilizar para el cálculo de los duty cycle.

$$V_{MEDI\text{A_PWM}} = \frac{2 \cdot V \cdot t}{T} - V \quad [29],$$

Donde:

$V_{MEDI\text{A_PWM}}$ = voltaje que le caerá en promedio a la celda Peltier

V = voltaje de la fuente que alimenta a los puentes H= 24V aproximadamente.

t/T = duty cycle

Para el enfriamiento

$$V_{MEDI\text{A_PWM}} = -12V$$

$t/T = 25\%$

Para el calentamiento

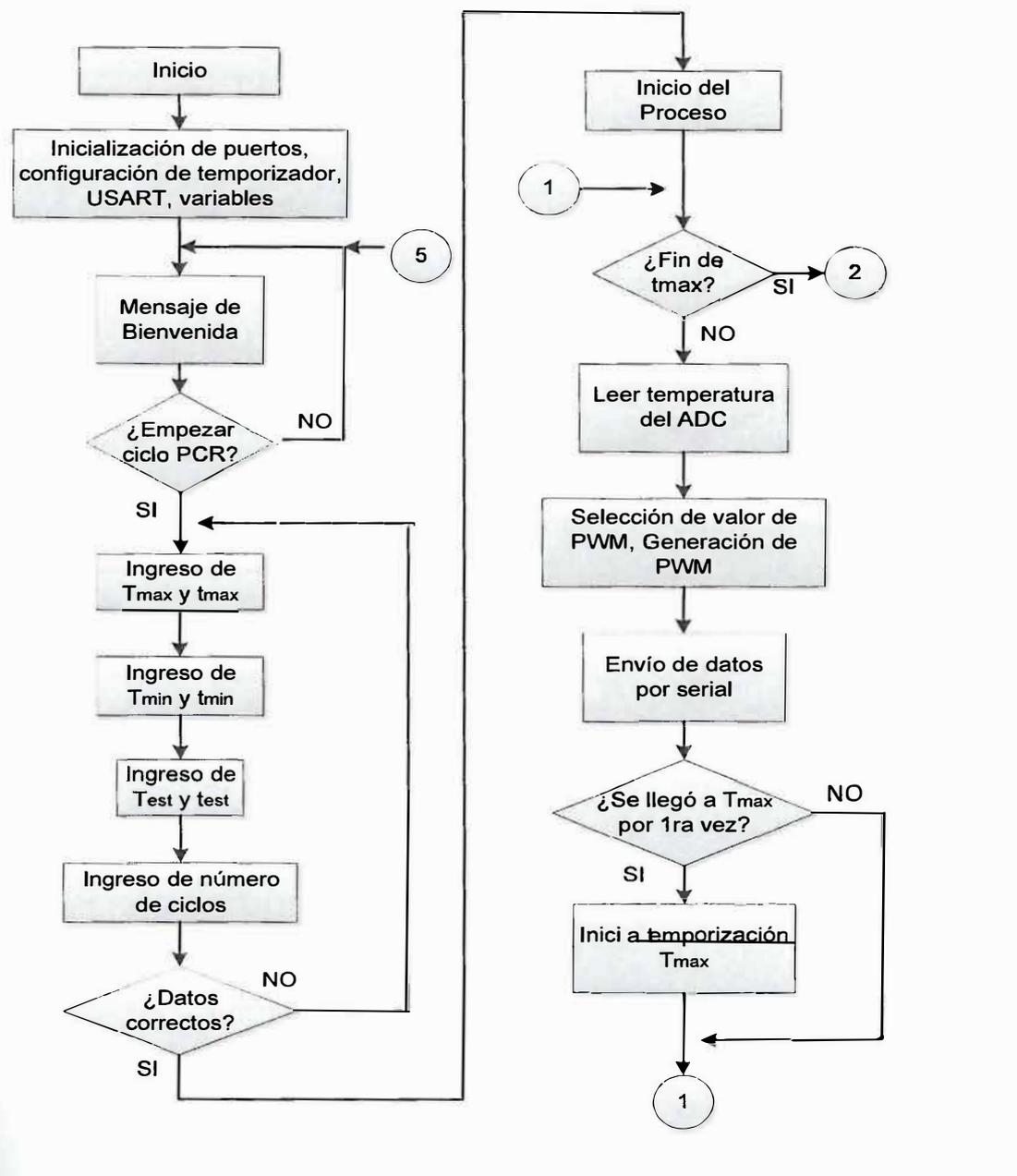
$V_{MEDIA_PWM} = 19.2V$

$t/T = 90\%$

DESARROLLO DEL SOFTWARE DE CONTROL

ESQUEMA GENERAL

El control general del sistema se realiza de acuerdo al siguiente Diagrama de Flujo. (ver figura 3.11)



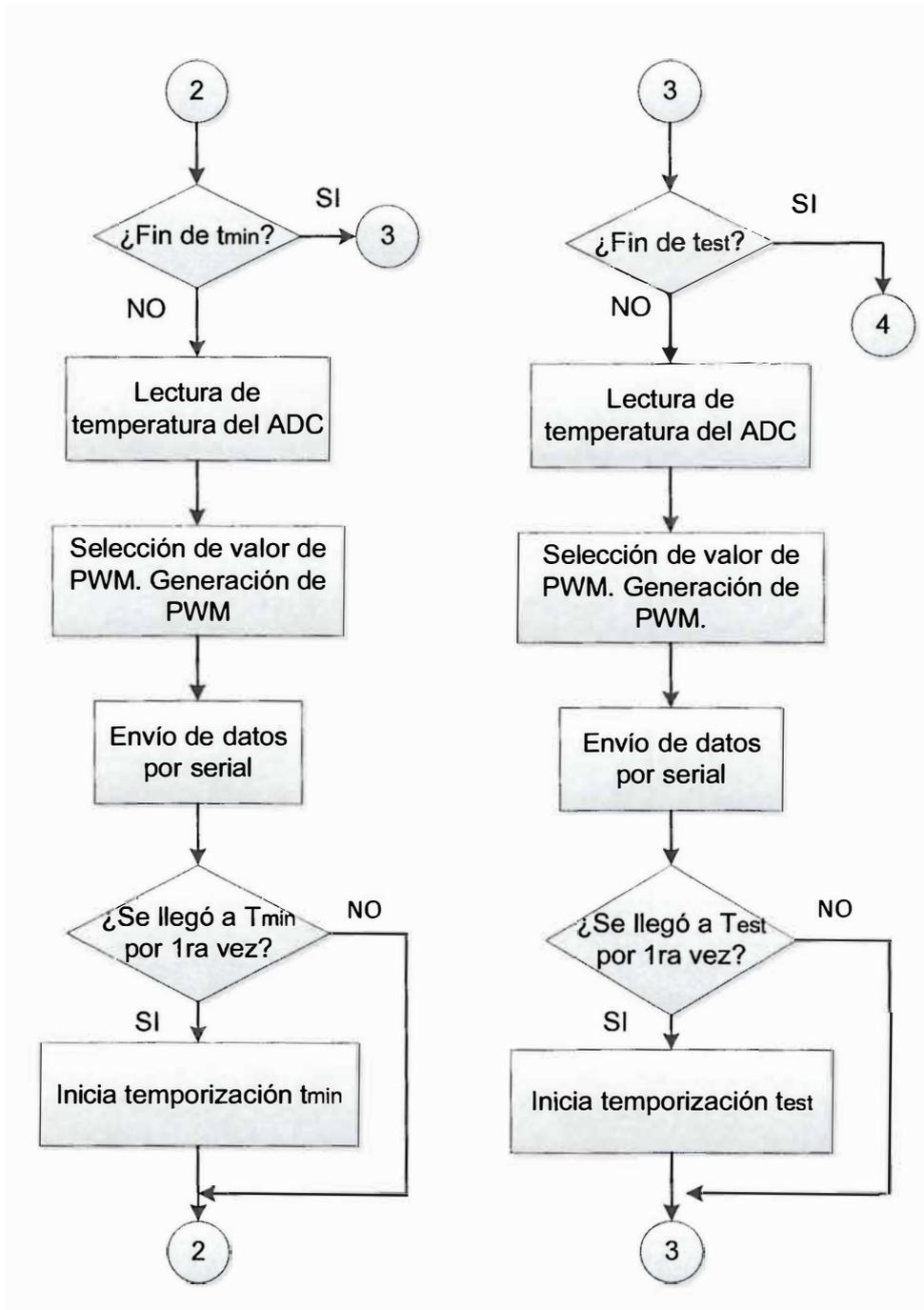


Figura 3.11: Diagrama de flujo del programa del módulo termociclador

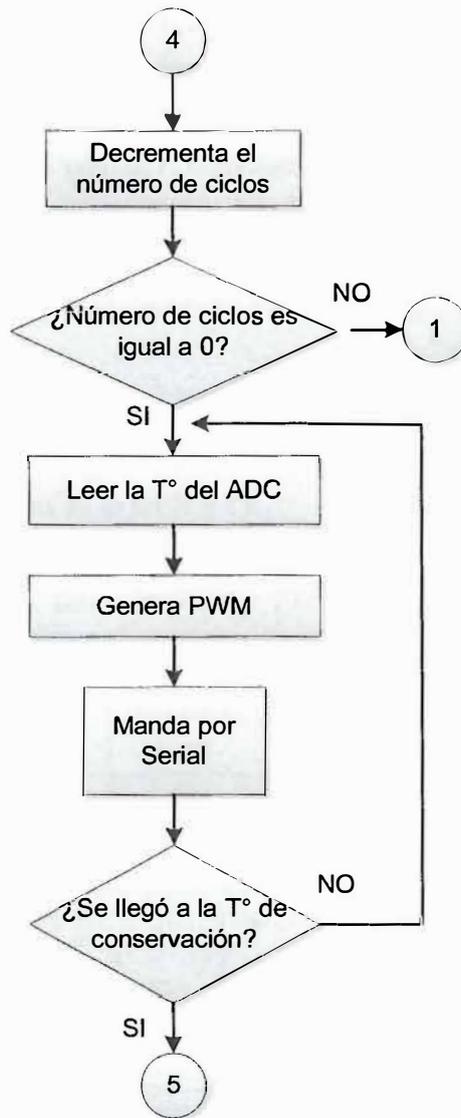


Figura 3.11 (continuación): Diagrama de flujo del programa del módulo termociclador.

3.5. Etapa de Potencia

Una vez implementado el sistema Termomecánico compuesto por la bandeja portamuestras, disipador y ventilador, se tiene que rediseñar la etapa de potencia que manejará la alta corriente que circulará por la celda Peltier y que producirá la transferencia de calor entre dicha bandeja y el disipador; esta transferencia de calor puede tener dos sentidos, dependiendo del sentido de corriente en el Peltier si se quiere enfriar o calentar la bandeja portamuestras, teniendo en consideración que el circuito estará alimentado por una sola fuente de 24VDC. Por otro lado, se podría pensar manejar la celda Peltier con medio puente con control tipo ON/OFF; sin

embargo, según Tellurex Corporation [32] y Grupo LAIRD TECHNOLOGIES [36] no se recomienda trabajarlo de esta manera ya que causa fatiga mecánica en la celda peltier, y esto ocasionaría su pronta destrucción. El método recomendable para estos casos es la utilización de un puente H completo ya que permitiría la circulación de dos sentidos de corriente necesarios para la transmisión de calor y la opción de poder controlarlos mediante una onda PWM.

Esta etapa está conformada por la celda Peltier, excitador de potencia y un filtro DC.

3.5.1. Celda Peltier

La celda Peltier fue heredada por el grupo de investigación Equi-laB y sus principales características se presentan en la tabla 3.11.

Tabla 3.11: Datos del Peltier VT-199-1.4-0.8 seleccionado

I _{max} (amps)	Q _{max} (watts)	V _{max} (volts)	DT _{max} (Th=300K)	DT _{max} (Potted)	A (mm)	B (mm)	H (mm)
-SORT- 5	-SORT-	-SORT-	-SORT-	-SORT-	-SORT-	-SORT-	-SORT
11.3	172	24.6	67	66	40	40	3.2

Elaboración: High Temperature [36]

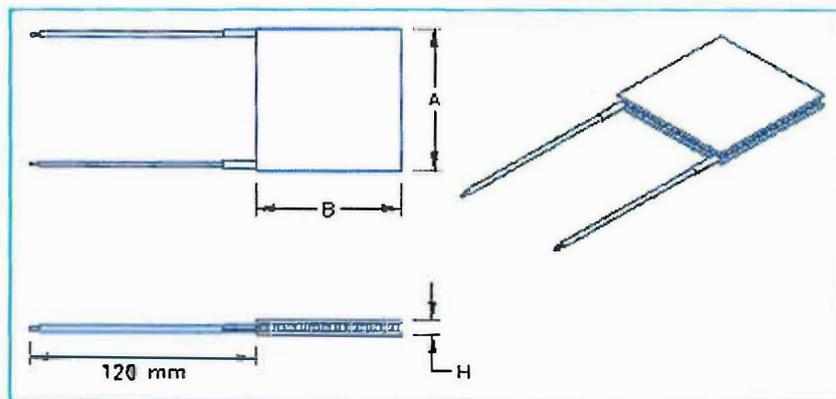


Figura 3.12: Geometría de la Célula Peltier. [36]

3.5.2. Excitador de Potencia

Requerimientos

El excitador debe tener las siguientes características:

- Voltajes de salida hasta +/-24V.
- Corrientes de salida de hasta 11A por Peltier.
- Señal de entrada de 5V y 2.5KHz de frecuencia.
- Aísle de control de potencia.

Alternativas de solución

En la tabla 3.12, se presentan diversas alternativas para el manejo de un puente-H.

Tabla 3.12: Circuitos integrados para manejo de un puente H completo.

FABRICANTE	MODELO	DESCRIPCIÓN	I _{max}
ST Microelectronics	L298	Manejador de Puente-H completo dual	2A
National Semiconductors	LM18298	Manejador de Puente-H completo dual	2A
TOSHIBA	TB6642FG	Manejador de Motor DC de puente completo	4.5A
International Rectifier	IR2184	Manejador de semi-puente de Mosfets de Potencia de canal N	Limitado por Mosfet

Elaboración: Propia a partir de hojas de datos del fabricante.

De los integrados que presenta la tabla anterior quedan descartadas las tres primeras opciones por tener una corriente máxima pico muy por debajo a la corriente que circula por la celda Peltier; sin embargo, se puede salvar las limitaciones con el integrado IR2184 de International Rectifier, que es un manejador (driver del término en inglés) de mosfets de potencia de canal N en configuración de semi-puente H, el cual es la alternativa seleccionada. Estos mosfets son los que definen el límite de corriente para la carga. Para completar la configuración puente-H se deben utilizar dos de ellos [33].

El driver de potencia de cada semi-puente se encargará de activar y/o desactivar cada uno de los dos transistores de potencia mosfet en cada semi-puente.

La característica principal para el driver es el nivel de voltaje que debe manejar a la salida, este voltaje es de 24V. En la figura 3.13, se muestra especificaciones en voltaje y son las siguientes:

Features

- Floating channel designed for bootstrap operation
Fully operational to +600V
Tolerant to negative transient voltage dV/dt immune
- Gate drive supply range from 10 to 20V
- Undervoltage lockout for both channels
- 3.3V and 5V input logic compatible
- Matched propagation delay for both channels
- Logic and power ground +/- 5V offset.
- Lower di/dt gate driver for better noise immunity
- Output source/sink current capability 1.4A/1.8A
- Also available LEAD-FREE (PbF)

Packages

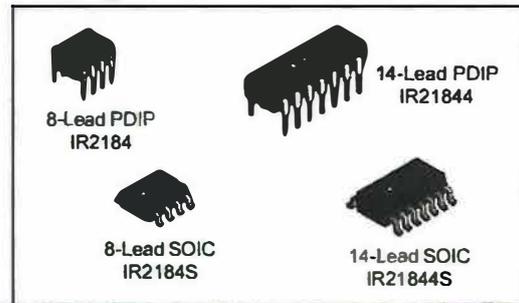


Figura 3.13: Características del IR2184 [33].

Se puede notar entonces que cumple ampliamente con la demanda necesaria. Para completar el puente H necesitamos cuatro mosfets de canal N. Están disponibles comercialmente los modelos IRF540 de ST Microelectronics o el IRFZ44 de International Rectifier en sus encapsulados TO-220. Se elige este último por tener mejores características dinámicas y se adapta a nuestros requerimientos de diseño como se observa en la tabla 3.13.

Tabla 3.13: Mosfets de potencia comerciales

Fabricante	Modelo	V _{DSS} (V)	I _D (A)	R _{DS(on)} (Ω)	T _{d(on)} (ns)
ST Microelectronics	IRF540	100	22	<0.077	60
International Rectifier	IRFZ44	60	50	0.024	20

Elaboración: Propia a partir de hoja de datos del fabricante.

El voltaje entre la compuerta (gate) y el surtidor (source) definido como V_{GS} activa el mosfet y soporta como máximo V_{GSmax} = ±20V teniendo un valor típico de activación de 4V [34].

También será necesaria en esta parte del trabajo una etapa de aislamiento.

La etapa de aislamiento tiene el objetivo de aislar galvánicamente la etapa de control y la etapa de potencia, consiste en la separación de partes funcionales de un circuito eléctrico para prevenir el traspaso de portadores de carga, este aislamiento de tierras se hace por motivos de seguridad. Para esto se utiliza el optocoplador 4N29 de Fairchild, junto con un circuito activo a su salida para eliminar retrasos de señal, esto se logra empleando un transistor adicional en una configuración de realimentación positiva que incrementa la corriente en el colector del transistor, mejorando la velocidad de conmutación del opto-acoplador en un factor de 10 [30].

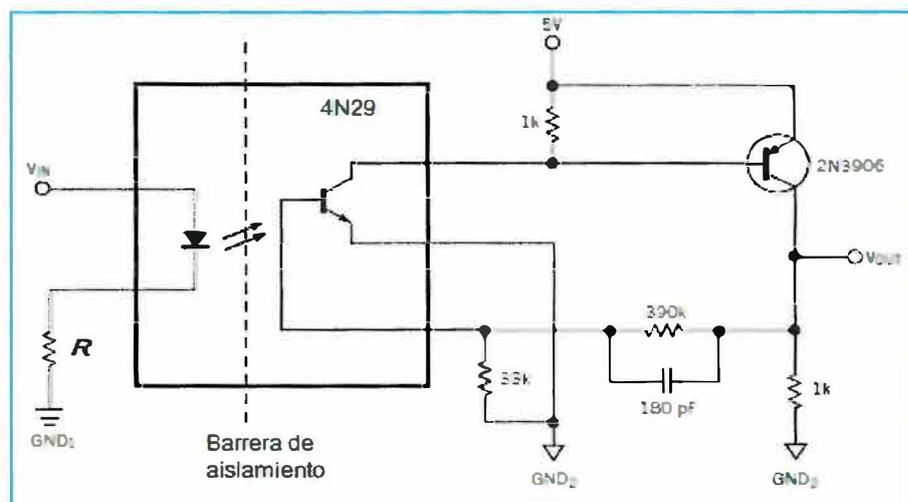


Figura 3.14: Circuito con realimentación positiva que aumenta la velocidad de conmutación de un optoacoplador clásico [30].

3.5.3. Filtro DC:

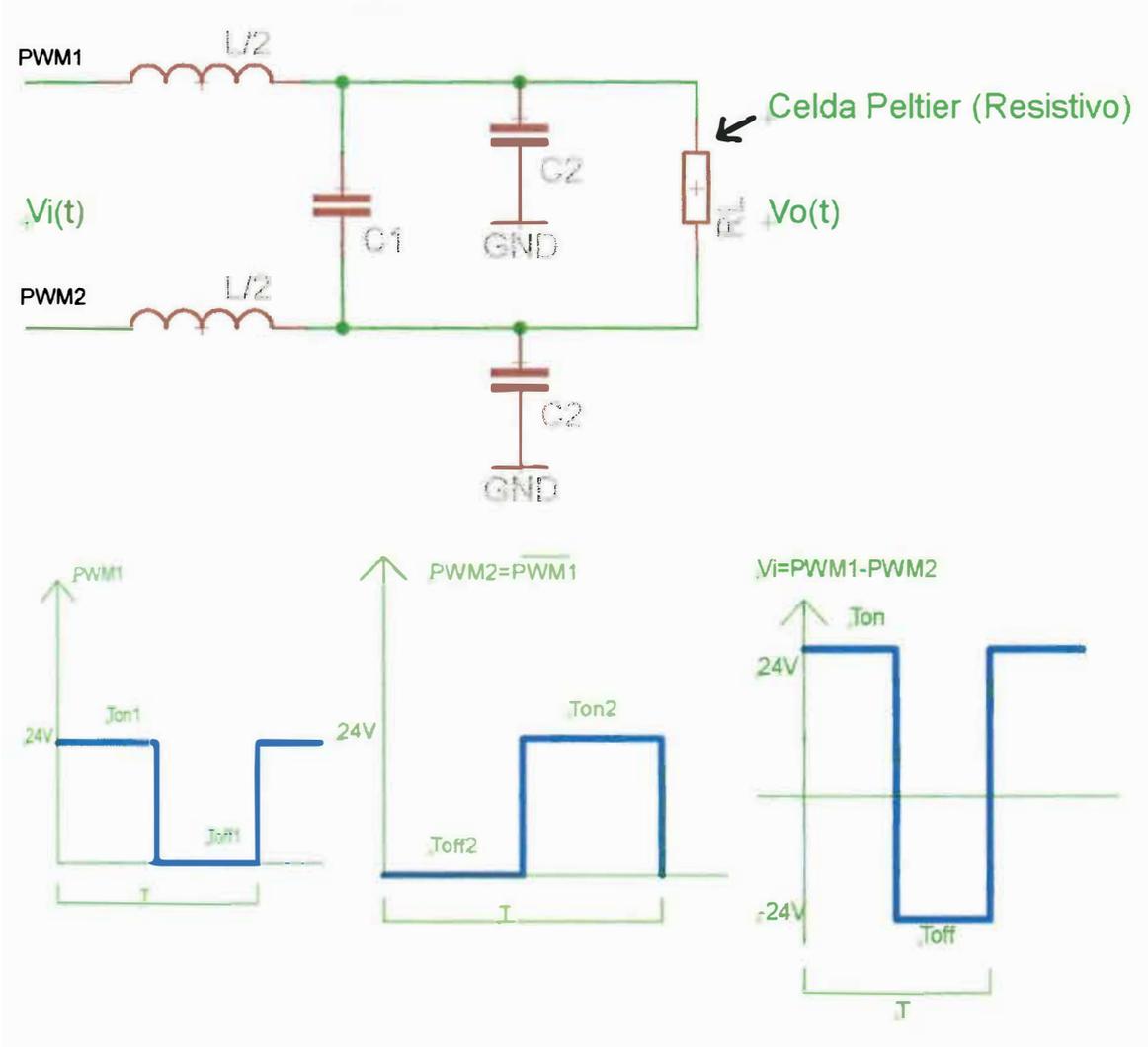
Con todo lo detallado hasta el momento, el voltaje de salida sin este filtro sería una señal PWM de 2.5KHZ de niveles 24V y -24V que dependiendo del ciclo de trabajo variará su voltaje DC entre estos valores, así también cabe mencionar que el uso de la PWM para el control genera armónicos, las cuales son señales no deseadas de frecuencia múltiplo de la frecuencia de la PWM, estas señales no deseadas deben ser atenuadas utilizando filtro pasabajos a la salida de la PWM.

Además de esto, si bien el voltaje DC será el adecuado, el fabricante recomienda voltajes con un rizado menor al 10% a la entrada de la celda Peltier. Esto es la variación de voltaje a la salida respecto al valor nominal de DC.

Para obtener este resultado, haremos un filtro de segundo orden LC, cuyo rizado para un voltaje de 20V (ciclo de trabajo de 90% apróx.) será de aproximadamente 3%.

ÁNÁLISIS DE BOBINAS Y CONDENSADORES.

La onda pwm debe pasar por un filtro pasabajos para suavizar la forma de señal que llega a la celda Peltier; es por ello, que recurrimos a un análisis previo para poder obtener los valores adecuados.



$$\text{Duty Cycle: } D = \frac{T_{on1}}{T} = \frac{T_{off2}}{T} = \frac{T_{on}}{T}$$

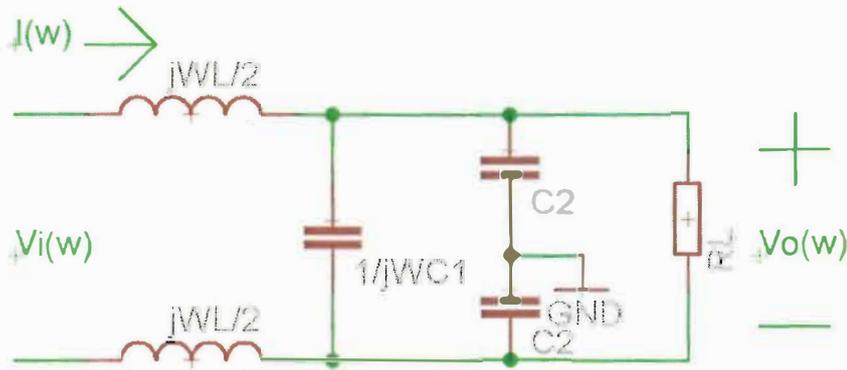
$$0 \leq D \leq 1$$

Para determinar los valores de nuestro filtro, tenemos como requerimiento:

Rizado < 10%

Nuestro objetivo será: rizado \approx 3%

→ Para alcanzar este objetivo, necesitamos hacer un análisis en el dominio de la frecuencia



$$V_i(\omega) = I(\omega) \cdot j\omega L/2 + I(\omega) \cdot \left(\frac{1}{j\omega C_1} \parallel \left(\frac{1}{j\omega C_2} + \frac{1}{j\omega C_2} \right) \parallel R_L \right) + I(\omega) \cdot j\omega L/2$$

$$\underbrace{\frac{R_L}{j\omega(C_1 + C_2/2)R_L + 1}}$$

$$V_i(\omega) = I(\omega) \left(j\omega L + \frac{R_L}{j\omega(C_1 + C_2/2)R_L + 1} \right) \rightarrow I(\omega) = \frac{V_i(\omega)}{j\omega L + \frac{R_L}{j\omega(C_1 + C_2/2)R_L + 1}}$$

Del circuito:

$$V_o(\omega) = I(\omega) \cdot \left(\frac{1}{j\omega C_1} \parallel \left(\frac{1}{j\omega C_2} + \frac{1}{j\omega C_2} \right) \parallel R_L \right)$$

$$V_o(\omega) = I(\omega) \cdot \frac{R_L}{j\omega(C_1 + C_2/2)R_L + 1}$$

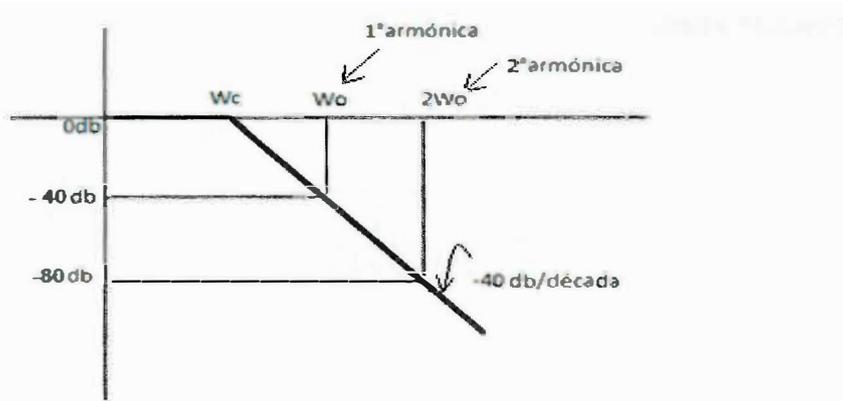
$$V_o(\omega) = \left(\frac{V_i(\omega)}{j\omega L + \frac{R_L}{j\omega(C_1 + C_2/2)R_L + 1}} \right) \cdot \frac{R_L}{j\omega(C_1 + C_2/2)R_L + 1}$$

$$V_o(\omega) = \frac{V_i(\omega)}{\frac{j\omega L - \omega^2 L(C_1 + C_2/2)R_L + 1}{R_L}}$$

$$\frac{V_o(\omega)}{V_i(\omega)} = \frac{1}{1 + \frac{j\omega L}{R_L} - \omega^2 L(C_1 + C_2/2)}$$

Filtro Pasivo Pasabajos de 2° Orden: $\frac{1}{1 + j \frac{\omega}{\omega_c} - \frac{\omega^2}{\omega_c^2}}$

Comparando el 3° término: $-\frac{\omega^2}{\omega_c^2} = -\omega^2 L(C_1 + C_2/2)$



1er Armónico \longrightarrow 40 dB $= 20 \log$ Atenuación1 \longrightarrow Atenuación1 = 100

2do Armónico \longrightarrow 80 dB $= 20 \log$ Atenuación2 \longrightarrow Atenuación2 = 10000

Despreciando el segundo armónico porque es atenuado 100 veces más que el primer armónico:

$$V_o(t) = 48D - 24 + \frac{96 \text{sen}(\pi D)}{\pi} \cdot (\text{atenuación}1) \cos(W_o t)$$

Según esta fórmula en la salida, nuestro rizado sería

$$\text{Rizado} = \frac{[2(\frac{96 \text{sen}(\pi D)}{\pi}) \cdot \text{atenuación}]}{48D - 24} \cdot 100\%$$

Asumiendo un voltaje de trabajo de 20V

$$20 = 48 \cdot D - 24 \rightarrow \text{Duty Cycle: } D = 90\% = 0,9$$

$$\text{Rizado \%} = \frac{[2(\frac{96 \text{sen}(\pi D)}{\pi}) \cdot \text{atenuación}]}{20} \cdot 100\%$$

$$\text{Ahora } \text{sen}(\pi \cdot D) = \text{sen}(\pi \cdot 0,9) \approx 0,3$$

$\text{Sen}(\pi \cdot D)_{\text{máx.}} = 1 \rightarrow$ El valor máximo de un seno es 1 (D = 50%)

$$\text{Luego: rizado\%} = \frac{(2 \cdot 96 \cdot \frac{\text{atenuación}}{\pi})}{20} = 3\%$$

Este rizado es más que suficiente, cumple con que es menor que el 10% establecido como requerimiento del filtro DC.

Asumo una frecuencia de corte la décima parte de nuestra frecuencia de operación ω_0 .

$$\omega_c = \frac{\omega_0}{10} = \frac{2\pi(2500)}{10} = 2\pi(250) = 500\text{rad/s}$$

Pero

$$\omega_c = \frac{1}{\sqrt{L(C_1 + C_2/2)}} = 500\text{rad/s}$$

Cada bobina es de inductancia $L/2$; la que tenemos ahora es de valor 180 μH

$$L/2 = 180 \mu\text{H} \rightarrow L = 360 \mu\text{H}$$

Reemplazando:

$$\frac{1}{\sqrt{360\mu\text{H}(C_1 + C_2/2)}} = 500\pi$$

$$C_1 + C_2/2 = 1125\mu\text{F}$$

C_1 es apolar: 47 μF

C_2 es polar: 2200 μF



Este es el arreglo que usamos para minimizar el valor de C_1 , puesto que un capacitor apolar en μF es difícil de conseguir

Observación:

- Se debe considerar en el diseño de la tarjeta de la etapa de potencia, que **todas las pistas conductoras deben tener considerables valores de grosor** [38] (véase anexo I) y así evitar “voladuras de pistas” por exceso de capacidad de corriente de manejo.

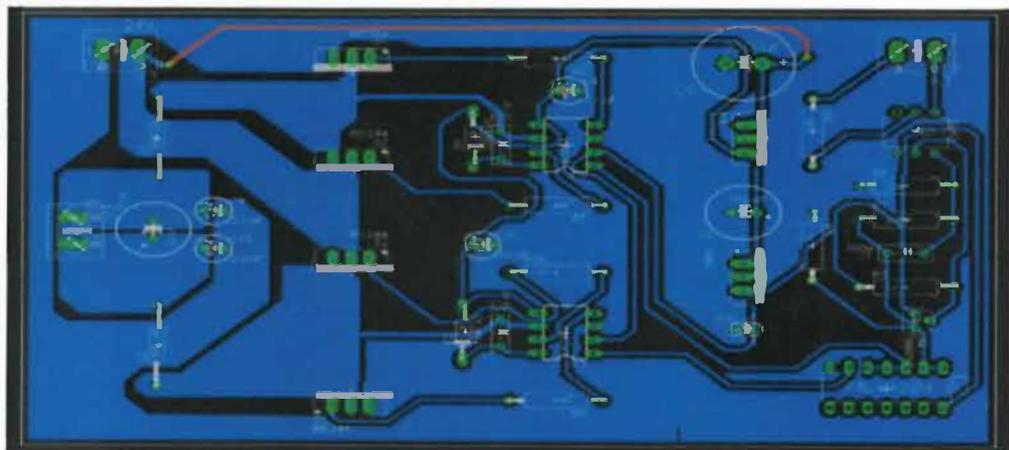


Figura 3.15: Tarjeta de la etapa de potencia

CAPITULO 4

Pruebas y Resultados

Análisis de Resultados

Utilizando la Fuente TDK-Lambda SW600-24 de 24V y haciendo uso de un disipador y ventilador de procesador (figura 4.1) se realizaron las siguientes pruebas:

- Etapa de Desnaturalización: condición con bandeja portamuestras de plata
 - Dos pruebas utilizando una Peltier y dos Peltier en paralelo.
 - Datos de la temperatura y tiempo en el proceso.
- Etapa de Hibridación: condición con bandeja portamuestras de plata
 - Dos pruebas utilizando una Peltier y dos Peltier en paralelo.
 - Datos de la temperatura y tiempo en el proceso.
- Etapa de Extensión: condición con bandeja portamuestras de plata
 - Dos pruebas utilizando una Peltier y dos Peltier en paralelo.
 - Datos de la temperatura y tiempo en el proceso.
- Proceso de la PCR: condición con bandeja portamuestras de plata
 - Una prueba total utilizando una Peltier y dos Peltier en paralelo y en cada una de ellas se programó dos ciclos.
 - Una prueba total utilizando dos Peltier en paralelo y en ella se programó tres ciclos.

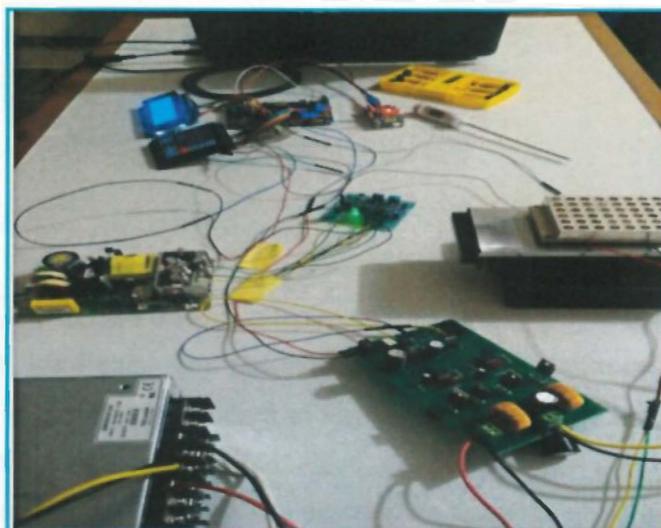


Figura 4.1: Implementación del prototipo de Termociclador.

➤ Procedimiento de conexión (pruebas):

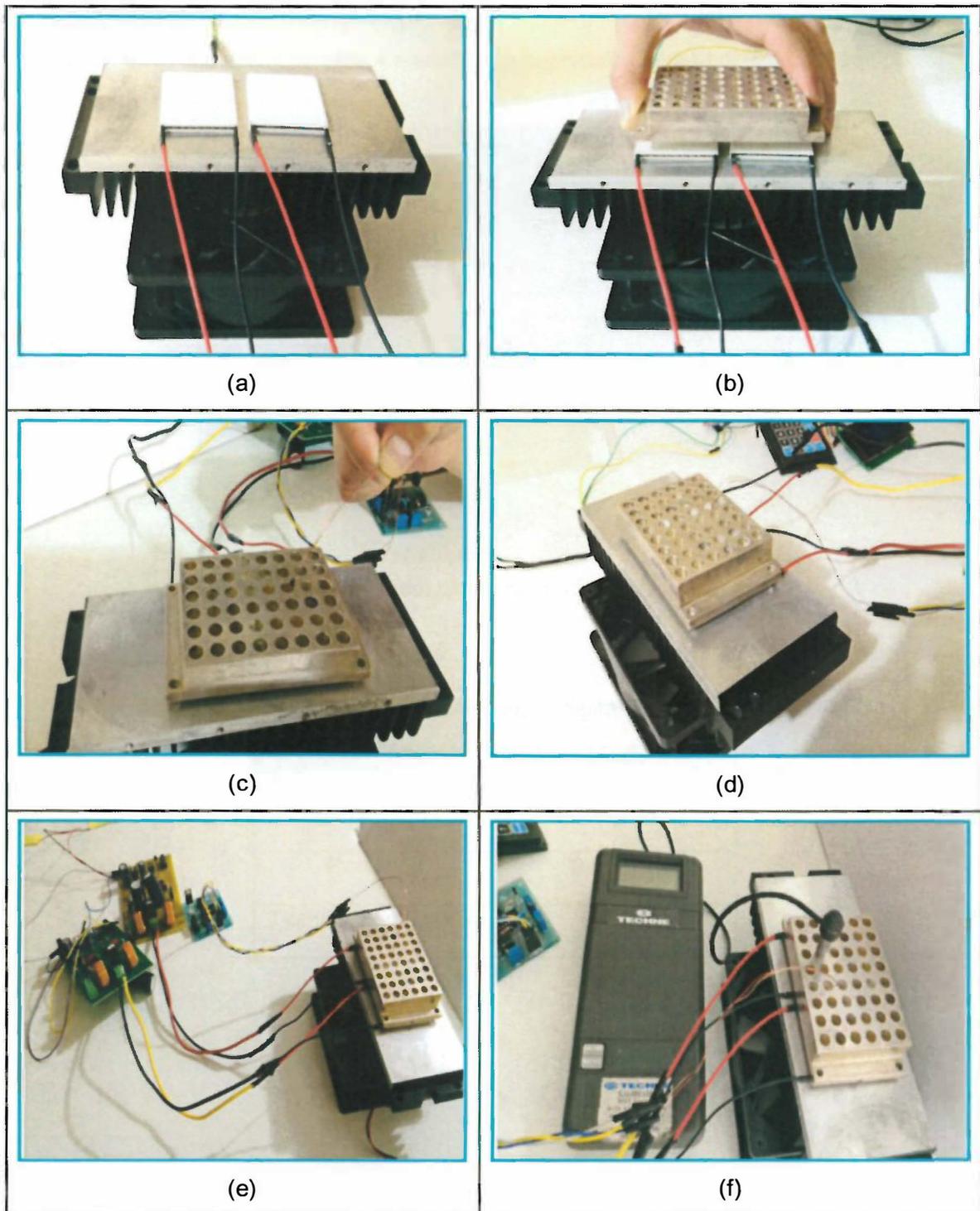


Figura 4.2: Proceso de ensamblaje para las pruebas correspondientes.

(a): posición inicial de los Peltier, (b): posición de la bandeja portamuestra por encima de los Peltier, (c): posición en donde se colocará el termistor, (d): sistema termomecánico, incluye el termistor, (e): imagen del sistema termomecánico, en la imagen se puede observar el termistor y los circuitos de potencia, (f): vista final del proceso de ensamblaje total, se puede observar el termómetro digital de precisión y como es colocado para las pruebas correspondientes.

Para el desarrollo de estas pruebas, se empleó como termómetro de referencia el termómetro digital de precisión TECHNE modelo 4400 (calibrado), cuya imagen se aprecia en la figura 4.3; la tabla 4 muestra las principales características del equipo.

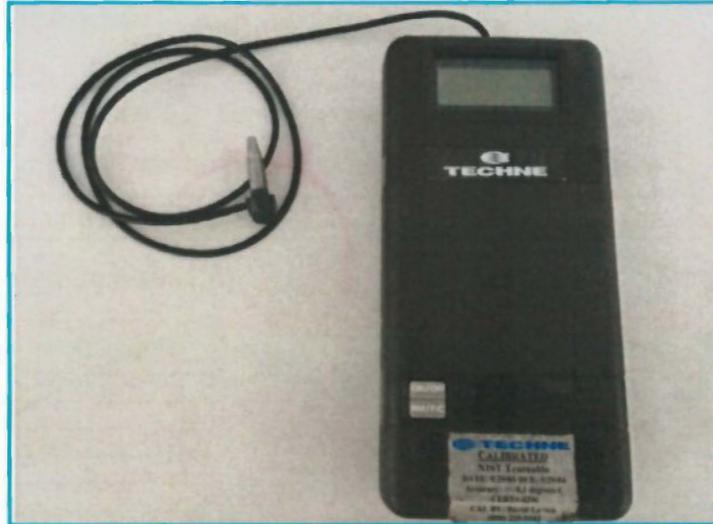


Figura 4.3: Imagen del termómetro digital TECHNE 4400.

Tabla 4.1: Características del termómetro digital TECHNE modelo 4400

Característica	Valor
Rango de medición	4°C a 100°C
Precisión	0.015 °C
Tiempo de muestreo	500ms

4.1. Etapa de Desnaturalización (Fuente: 24V)

En esta etapa se evalúa las celdas Peltier a un voltaje específico de 23.8V. En la Tabla 4.2 se simula la etapa de desnaturalización en el proceso de PCR, que cubre un rango de temperaturas desde 20°C hasta 95°C. Todos los datos son con respecto a Tc (Cara junto con la bandeja Portamuestras).

Tabla 4.2: Temperatura Tc (°C) vs Tiempo (s)
con sus respectivos calentamiento promedios

Con una celda Peltier				Con dos celdas Peltier			
	Prueba 1	Prueba 2	Unidad		Prueba 1	Prueba 2	Unidad
Velocidad de calentamiento total promedio	0.64	0.65	°C/s	Velocidad de calentamiento total promedio	1.11	1.12	°C/s

En la etapa con una sola celda Peltier, las temperaturas de inicio y fin son:

Prueba 1: $T_{\text{inicial } 1} = 29.8^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{\text{Final } 1} = 92^{\circ}\text{C}$ (98s)

Prueba 2: $T_{\text{inicial } 2} = 27.3^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{\text{Final } 2} = 91.8^{\circ}\text{C}$ (99.23s)

En la etapa con dos celdas Peltier en paralelo, las temperaturas de inicio y fin son:

Prueba 1: $T_{\text{inicial } 1} = 24.2^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{\text{Final } 1} = 93.9^{\circ}\text{C}$ (63s)

Prueba 2: $T_{\text{inicial } 2} = 23.8^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{\text{Final } 2} = 90.9^{\circ}\text{C}$ (60s)

4.2. Etapa de Hibridación (Fuente: 24V)

En esta etapa se evalúa las celdas Peltier a un voltaje específico de 23.8V. En la Tabla 4.3 se simula la etapa de hibridación en el proceso de PCR, que cubre un rango de temperaturas desde 96°C hasta 55°C. Todos los datos son con respecto a Tc (Cara junto con la bandeja Portamuestras).

Tabla 4.3: Temperatura Tc (°C) vs Tiempo (s)
con sus respectivos calentamiento promedios

Con una celda Peltier				Con dos celdas Peltier			
	Prueba 1	Prueba 2	Unidad		Prueba 1	Prueba 2	Unidad
Velocidad de enfriamiento total promedio	0.36	0.35	°C/s	Velocidad de enfriamiento total promedio	0.4	0.41	°C/s

En la etapa con solo una celda Peltier, las temperaturas de inicio y fin son:

Prueba 1: $T_{\text{inicial } 1} = 91.8^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{\text{Final } 1} = 60.1^{\circ}\text{C}$ (88.05s)

Prueba 2: $T_{\text{inicial } 2} = 91.5^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{\text{Final } 2} = 60^{\circ}\text{C}$ (89s)

En la etapa con dos celdas Peltier en paralelo, las temperaturas de inicio y fin son:

Prueba 1: $T_{\text{inicial } 1} = 93^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{\text{Final } 1} = 60^{\circ}\text{C}$ (83s)

Prueba 2: $T_{\text{inicial } 2} = 92^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{\text{Final } 2} = 59.5^{\circ}\text{C}$ (80s)

4.3. Etapa de Extensión (Fuente: 24V)

En esta etapa se evalúa las celdas Peltier a un voltaje específico de 23.8V. En la Tabla 4.4 se simula la etapa de extensión en el proceso de PCR, que cubre un rango de temperaturas desde 60°C hasta 72°C. Todos los datos son con respecto a Tc (Cara junto con la bandeja Portamuestras).

Tabla 4.4: Temperatura Tc (°C) vs Tiempo (s)
con sus respectivos calentamiento promedios

Con una celda Peltier				Con dos celdas Peltier			
	Prueba 1	Prueba 2	Unidad		Prueba 1	Prueba 2	Unidad
Velocidad de calentamiento total promedio	0.63	0.64	°C/s	Velocidad de calentamiento total promedio	0.73	0.71	°C/s

En la etapa con solo una celda Peltier, las temperaturas de inicio y fin son:

Prueba 1: $T_{inicial\ 1} = 60.1^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{Final\ 1} = 72.3^{\circ}\text{C}$ (19.3s)

Prueba 2: $T_{inicial\ 2} = 60^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{Final\ 2} = 72.8^{\circ}\text{C}$ (20s)

En la etapa con dos celdas Peltier en paralelo, las temperaturas de inicio y fin son:

Prueba 1: $T_{inicial\ 1} = 59.4^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{Final\ 1} = 72.5^{\circ}\text{C}$ (18s)

Prueba 2: $T_{inicial\ 2} = 60^{\circ}\text{C}$ (0s) $T_{Final\ 2} = 72.1^{\circ}\text{C}$ (17s)

4.4. Proceso de PCR

En esta parte final se evalúa todas las etapas del proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además de los cambios de temperatura para cada una de las etapas del proceso, en las figura 4.4 y figura 4.5 se puede observar el ciclo completo de la PCR, que en nuestro caso se programó 2 ciclos en total tanto para una Peltier y para las dos Peltier en paralelo.

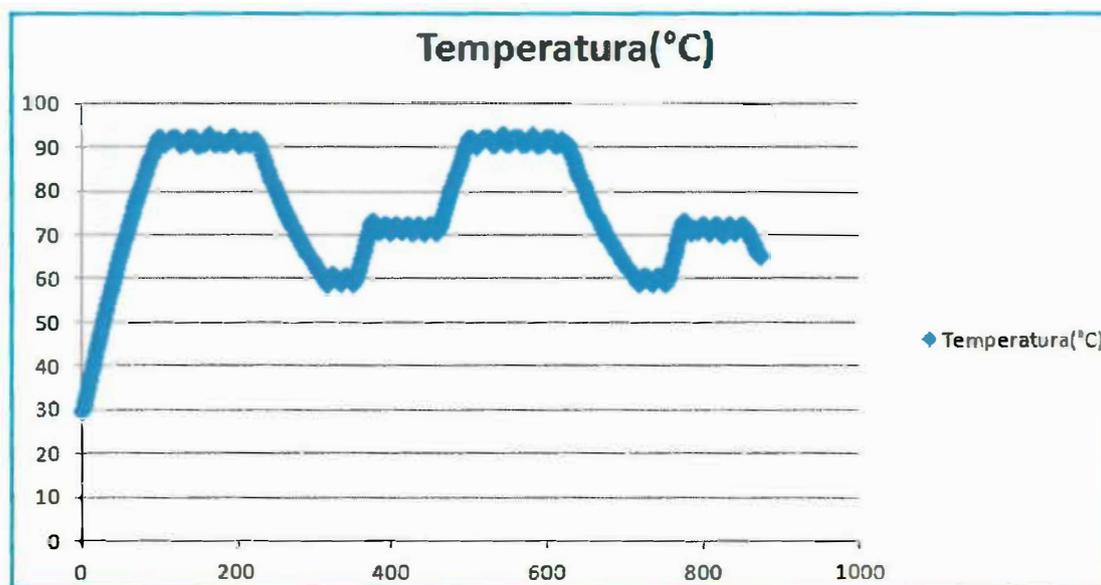


Figura 4.4: Gráfica donde se muestra el ciclo completo del PCR con una celda Peltier, en la imagen se puede observar 2 ciclos.

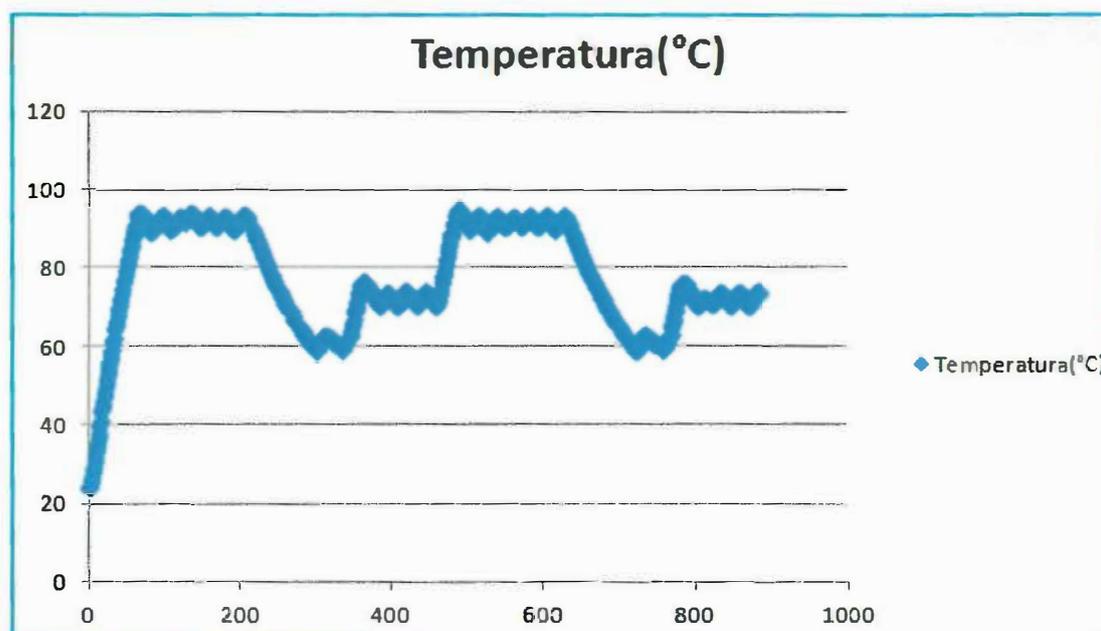


Figura 4.5: Gráfica donde se muestra el ciclo completo del PCR con dos celdas Peltier, en la imagen se puede observar 2 ciclos.

La gráfica 4.6 muestra el proceso final de la PCR con número de ciclos igual a tres.

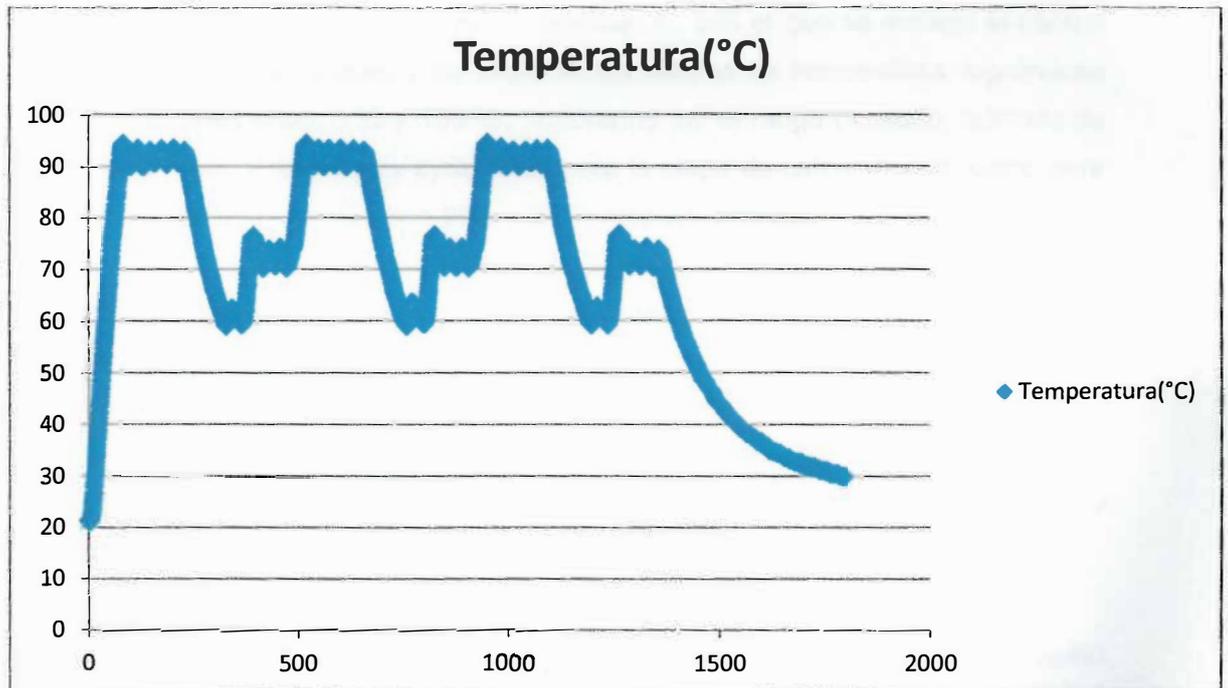


Figura 4.6: Tres ciclos completos de la PCR con dos celdas Peltier.

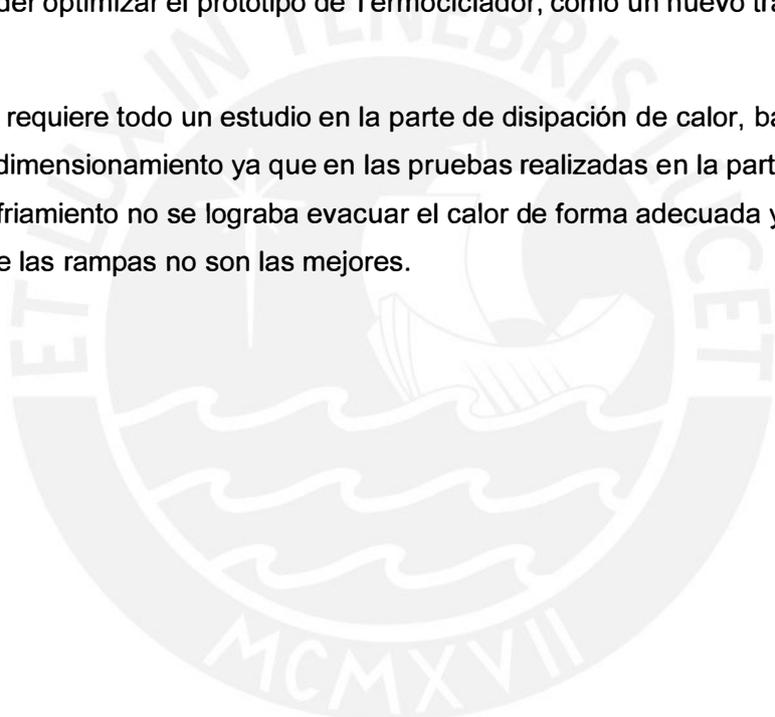
Las tres etapas de cada ciclo se repiten tantas veces como el ensayo lo requiera (número de veces determinado por el laboratorista) y luego se para la reacción bajando la temperatura a 4°C, temperatura a la que se mantiene para que el laboratorista la tome para sus siguientes actividades. En la figura 4.6 hay que mejorar la caída de enfriamiento para 4°C.

Conclusiones

1. Se diseñó un software escrito en lenguaje C, con el que se manejó el control térmico en los bloques y se midieron los valores de temperatura, lográndose variaciones entre 0 °C y 100 °C, superando así el rango deseado; además de programar el mejor duty cycle tanto para la etapa de calentamiento como para la de enfriamiento que son 95% y 25 % respectivamente.
2. Se Implementó la etapa de control del sistema basada en un microcontrolador PIC16F877, y la etapa de potencia basada en un puente H con Mosfets de potencia (ver capítulo 3) y filtro pasabajo LC, cumpliéndose los objetivos propuestos en la tesis; además, esta nueva etapa de potencia soporta 15 Amperios picos probados experimentalmente en las pruebas de laboratorio y probados por una pinza amperimétrica.
3. Se obtuvo una rampa de Temperatura positiva en el proceso: 1.12°C/s, como máximo, y una rampa de temperatura negativa: 0.41°C/s, como mínimo, con voltajes de 20.4 (95% de duty cycle) y 11.1 (25% de duty cycle), respectivamente; con esto se cumple los requerimientos del sistema (1°C/s).
4. El máximo error obtenido en las pruebas de calibración fueron de 0.16 °C y el mínimo error obtenido fue de 0.1 °C (ver anexo F), esta parte cumple ampliamente ya que el arreglo de termistores conocido como red Termilinear posee una precisión y sensibilidad de aproximadamente +/- 0.15 °C.
5. El teclado numérico y la pantalla de cristal líquido (LCD) elegidos, fueron adecuados para el ingreso y visualización de los datos procesados en el Módulo Digital Programable desarrollado, por lo tanto cumple con el requerimiento que se pedía.
6. Una fuente de error en la medición de temperatura del sistema es el contacto no óptimo entre el sensor de temperatura y el bloque metálico de plata. La pasta conductora utilizada no es totalmente eficiente para reducir este error. De igual manera el sistema mecánico total no está fijo y se generan desplazamientos y movimientos entre sus componentes que derivan o pueden derivar en resultados inesperados.

Recomendaciones

- Para hacer el proceso más eficiente, se recomienda utilizar un control PID, lo que permitiría hacer un seguimiento en tiempo real de la temperatura para estabilizarla al momento de llegar a las temperaturas requeridas.
- Se debe tener en consideración el material de la bandeja portamuestra, si bien la plata es un buen conductor térmico, también hay que tener en cuenta que su densidad es mayor al del aluminio en una proporción de 4:1 respectivamente.
- Se recomienda elevar el número de puntos de sensados en el sistema a fin de poder optimizar el prototipo de Termociclador, como un nuevo trabajo de tesis.
- Se requiere todo un estudio en la parte de disipación de calor, básicamente en el dimensionamiento ya que en las pruebas realizadas en la parte de enfriamiento no se lograba evacuar el calor de forma adecuada y es por ello que las rampas no son las mejores.



Bibliografía

- [1] Claude A. Villee (1996)
1996 "Biología". (8ª Edición)
México: Mc Graw Hill
- [2] Alvin Silverstein, Virginia B. Silverstein, Virginia Silverstein, Laura Silverstein Nunn
2009 "DNA"
Enlace: <http://books.google.co.za/books/about/DNA.html?id=yjKBmjAg1QMC>
Fecha de consulta: 10-05-2013
- [3] Mullis, Kary (1990)
1990 "The unusual origin of the polymerase chain reaction".
Usa: "Scientific American" vol. 262, págs. 56-65.
- [4] Aportes para la enseñanza
2013 Enlace: http://www.aportes.educ.ar/sitios/aportes/recurso/index?rec_id=107979&nucleo=biologia_nucleo_arte
Fecha de consulta: 10-05-2013
- [5] Gerald Karp
2008 "Biología Celular y Molecular". (5ª Edición)
México: Mc Graw Hill
Fecha de consulta: 10-05-2013
- [6] Stephen J. Meltzer
1998 "PCR in bioanalysis".
USA, New Jersey: Humana Press Inc.
Fecha de consulta: 10-05-2013
- [7] Empresa de Automatización y Control Industrial
2011 Enlace: http://www.edaci.com/ensayo_pcr.php
Fecha de consulta: 10-05-2013
- [8] Electrónica y automatización Industrial
2011 "Termoelectricidad y Celdas Peltier".
Enlace: <http://web-archiver.com/page/1835306/2013-04-08/http://www.sistelec.com.ar/termoelectricidad.htm>

Fecha de consulta: 10-05-2013

[9] HardSide

2013 "Celdas Peltier".

Enlace: <http://www.hardside.com.ar/utills/peltier.htm>

Fecha de consulta: 10-10-2013

[10] G. Patterson, M. Sobral

2007 "Efecto Peltier", Departamento de Física, Universidad de Buenos Aires.

Enlace: <http://www.df.uba.ar/users/dgrosz/material%20adicional/celda%20Peltier%20Patterson-Sobral.pdf>

Fecha de consulta: 10-10-2013

[11] Velarde Criado, Luis Angelo

2007 "Termociclador térmico programable digitalmente"

Lima: PUCP

[12] Zegarra, David; Ponce, José Luis

2012 "Diseño e Implementación de un módulo para procesos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la Replicación de ADN"

Documento de tesis para optar el título de ingeniero electrónico

Pontificia Universidad Católica del Perú

[13] Omar Renzo Piminchumo Mariños

2009 "Diseño de los Componentes Mecánicos de un Termociclador utilizando el Método de los elementos finitos"

Documento de tesis para optar el título de ingeniero mecánico

Pontificia Universidad Católica del Perú

[14] Gerson Alberto Ayllón Mejía

2012 "Caracterización de la Celda Peltier para un Prototipo de Termociclador"

Documento de tesis para optar el título de ingeniero electrónico

Pontificia Universidad Católica del Perú

[15] Andrés Eloy Andía Paredes

2012 "Diseño, fabricación, ensamblaje y prueba de los componentes mecánicos de un Termociclador"

Documento de tesis para optar el título de ingeniero mecánico

- [16] Cortazar Martínez, Adriana; Silva Rincón, Elsa
2004 "Métodos Físico-Químicos en Biotecnología PCR"
Enlace: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
Fecha de consulta: 05-04-2014
- [17] Guía Web - PCRLinks
Enlace: <http://www.espanol.pcrlinks.com/index.html>
Fecha de consulta: 05-04-2014
- [18] Biotools
LongGeneMG25+
Enlace: <http://www.biotools.eu/esp/pdf/equipment/LongGeneMG25.pdf>
Fecha de consulta: 05-04-2014
- [19] Biotools
LongGeneMG48G
Enlace: <http://www.biotools.eu/esp/pdf/equipment/LongGeneMG48MG48G.pdf>
Fecha de consulta: 05-04-2014
- [20] LabX
Bio-Rad PTC-200 Gradient Thermal Cycler
Enlace: http://www.labx.com/v2/adsearch/detail3.cfm?adnumb=509658#.U4kRL_krem5
Fecha de consulta: 05-04-2014
- [21] Thermo Scientific
Piko Thermal Cycler
Enlace: <http://www.thermoscientificbio.com/pcr-instruments-and-accessories/piko-thermal-cyclers/>
Fecha de consulta: 05-04-2014
- [22] Roche
LightCycler 96
Enlace: http://lifescience.roche.com/campaigns/LC96/dl/LightCycler_96_Specs_Prod_9_LR.pdf
Fecha de consulta: 05-04-2014

- [23] ShineGene
ShyneGene Thermal Cyclers
Enlace: <http://www.synthesisgene.com/lab-equipment.html>
- [24] Universidad Nacional de Asunción
Sensores y Actuadores – Capítulo IV Sensores de temperatura (Termopares)
Enlace: <http://www.pol.una.py/archivos/TSElectronik/Sensores/Termocuplas.pdf>
Fecha de consulta: 05-07-2013
- [25] YSI PRECISION TECHNOLOGY
1998 YSI Catalog, YSI Thermistors and probe
United States of America
- [26] Burr - Brown
1998 INSTRUMENTATION AMPLIFIER with Precision Voltage Reference
United States of America
- [27] SUPERCOOL AB
Thermoelectric Solutions. Hoy es parte de Laird Technologies
Enlace: <http://www.europeanthermodynamics.com/thermoelectrics/Supercool%20PDFs/Supercool%20TEA%20brochure.pdf>
- [28] Marlow Thermoelectric Cooler. Marlow Industries Inc.
www.marlow.com
- [29] Universidad Politécnica de Madrid
Modulación Pwm
Enlace: http://www-app.etsit.upm.es/departamentos/teat/ asignaturas/lab-ingenel/modulacion_pwm_pmdc_v4.pdf
Fecha de consulta 20-01-2013
- [30] Stapleton, H; O'Grady, A.
2001 Analog Devices "Isolation Techniques for high-resolution data-acquisition Systems".
Enlace: <http://m.eet.com/media/1146715/22423-61876.pdf>

Fecha de consulta 20-01-2013

- [31] Universidad Rey Juan Carlos
Desarrollo de un sistema de adquisición, procesado y transmisión de Electrocardiogramas
Enlace: http://dac.escet.urjc.es/PFC/cristina_rodriguez/
Fecha de consulta 20-01-2013
- [32] Tellurex Corporation
2002 Introduction to thermoelectrics. FAQ.
<http://www.tellurex.com/cthermo.html>
<http://www.tellurex.com/12most.html>
<http://www.tellurex.com/pdf/peltier-faq.pdf>
- [33] International Rectifier
2006 Half – Bridge Driver
United States of America
- [34] Fairchild
1999 Advanced Power MOSFET
United States of America
- [35] Marco Antonio González Ortiz
2011 “Optimización del software del desarrollo de un termociclador para la replicación del ADN”
Documento de tesis para optar el título de ingeniero electrónico
Pontificia Universidad Católica del Perú
- [36] TE Technology, Inc.,
“High-Temperature Modules”
Enlace: <https://totech.com/products/vt-199-1-4-0-8/#/>
Fecha de consulta: 28-10-2013
- [37] MELCOR.
Structure and Function. MELCOR es actualmente parte del Grupo LAIRD TECHNOLOGIES <http://www.lairdtech.com>
Thermoelectric Handbook. Archivo actualizado en la web de Laird Technologies.
Enlace: <http://www.lairdtech.com/Products/Thermal-Management-Solutions/>

Thermoelectric-Modules/

- [38] Association Connecting Electronics Industries
Generic Standard on Printed Board Design – IPC 2221A
Enlace: http://sisko.colorado.edu/CRIA/FILES/REFS/Electronics/IPC_2221A.pdf
Fecha de consulta: 05-07-2014

