

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**



**DISEÑO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN ÓPTICO DE UN  
TERMOCICLADOR PCR EN TIEMPO REAL**

**Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Electrónico**

**AUTOR:**

**KEVIN ARNOLD SALAZAR CUSI**

**ASESOR:**

**Mg. Ing. Domingo Vladimir Flores Robles**


**Lima, febrero, 2025**

## Informe de Similitud

Yo, Domingo Vladimir Flores Robles docente de la Facultad de Ciencias e Ingeniería, Sección Electricidad y Electrónica de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor(a) de la tesis/el trabajo de investigación titulado “DISEÑO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN ÓPTICO DE UN TERMOCICLADOR PCR EN TIEMPO REAL”, del autor KEVIN ARNOLD SALAZAR CUSI, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 13%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 25/02/2025.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha: Lima. San Miguel, 25 de febrero de 2025

Apellidos y nombres del asesor: <u>Flores Robles, Domingo Vladimir</u>	
DNI:25796776	Firma 
ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-7413-8454">https://orcid.org/0000-0002-7413-8454</a>	

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo diseñar el sistema de detección óptico de un termociclador en tiempo real, con el que se podrá monitorear la amplificación del ADN en el proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para ser utilizado como una herramienta de diagnóstico de enfermedades infecciosas. El desarrollo de esta tesis, tiene como base el termociclador desarrollado por el grupo de investigación de la PUCP, “Grupo de Desarrollo de Equipos para Laboratorios Biológicos” Equi-LaB, para obtener de dichos avances los conocimientos que se necesitan para la técnica del PCR. La tarea en la que se enfoca este trabajo es diseñar un sistema de detección óptico que se utiliza para monitorear la amplificación del ADN en tiempo real. Todo este proceso se desarrolla para diseñar un termociclador en tiempo real partiendo el prototipo de termociclador en tiempo final de Equi-LaB.

Este trabajo se ha dividido en 4 capítulos y son los siguientes:

En el capítulo 1, se mencionan las bases teóricas que comprenden la técnica del PCR y como están relacionadas con el termociclador. También, las aplicaciones que tiene un termociclador y las ventajas entre los 2 tipos de termociclador que existen, es decir los de tiempo final y tiempo real.

En el capítulo 2, se encuentra las generalidades del termociclador en tiempo real y los componentes necesarios su diseño. Luego de ello después del análisis correspondiente se elabora una propuesta de solución.

En el capítulo 3, se desarrolla los procesos necesarios para la implementación de todos los componentes que se han seleccionado en el capítulo anterior y algunas simulaciones que confirmen el funcionamiento esperado.

En el capítulo 4, se realizan las pruebas correspondientes del sistema de detección óptico, así como una evaluación final.

Finalmente, se presentan las conclusiones obtenidas en todo el procesos y recomendaciones.



*Este trabajo está dedicado a mis queridos padres por su incondicional apoyo en mi etapa universitaria y en memoria del Ingeniero Willy Carrera y la Dra. Sayda Mujica. Sin su ayuda y consejos, no hubiera sido posible realizar esta tesis. Adicionalmente quisiera ser mención a mi gran amigo Jhomer Contreras por las buenas experiencias en el desarrollo de la tesis.*

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1: MARCO PROBLEMÁTICO</b> .....	<b>2</b>
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....	2
1.2 ESTADO DEL ARTE.....	2
1.2.1 Definiciones bases sobre el PCR .....	2
1.2.1.1 Replicación del ADN mediante la técnica de PCR .....	2
1.2.1.2 Termociclador .....	3
1.2.1.3 Termociclador en tiempo final .....	3
1.2.1.4 Termociclador en tiempo real .....	4
1.2.1.5 Ventajas del termociclador PCR en tiempo real vs tiempo final .....	5
1.2.2 Avances del desarrollo de termociclador PCR en la PUCP .....	5
1.2.3 Modelos termociclador en tiempo real comerciales.....	7
1.2.4 Línea de tiempo del Termociclador PUCP .....	8
1.3 JUSTIFICACIÓN .....	9
1.4 OBJETIVOS .....	9
1.4.1 OBJETIVO GENERAL .....	9
1.4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	9
<b>CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 GENERALIDADES DE LOS TERMOCICLADORES</b> .....	<b>10</b>
2.1.1 Celda Peltier .....	10
2.1.2 Sistema disipador ventilador.....	11
2.1.3 Bandeja porta muestras .....	11
2.1.4 Diagrama de procesos del termociclador PCR en tiempo real.....	12
<b>2.2 SISTEMA PARA LA DETECCIÓN ÓPTICA DEL PROCESO DEL PCR EN TIEMPO REAL</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Sistemas de monitoreo de datos usados en la PCR en tiempo real .....	13
2.2.1.1 Fluoróforos con afinidad al ADN.....	13
2.2.1.2 Sondas específicas .....	14
2.2.2 Componentes del sistema de detección óptico utilizados en los termocicladores PCR en tiempo real.....	15
2.2.2.1 Tubos de vacío fotomultiplicadores .....	15
2.2.2.2 Sensores CMOS .....	15
2.2.2.3 Sensores CCDs .....	16
2.2.2.4 Fotodiodo .....	17
2.2.2.5 Fuente de excitación de luz para los fluoróforos .....	17
2.2.2.6 Lámparas halógenas de tungsteno .....	17
2.2.2.7 Diodo emisor de luz.....	17
<b>2.3 COMPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE DETECCIÓN ÓPTICO</b> 18	
<b>CAPITULO 3: DISEÑO DEL SISTEMA ÓPTICO DE DETECCIÓN</b> .....	<b>20</b>
3.1 ELABORACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE FUNCIONES .....	20
3.1.1 Caja negra del sistema óptico del termociclador en tiempo real .....	20
3.1.2 Procesos técnicos .....	20

3.1.3	Estructura detallada de funciones de cada dominio .....	22
3.1.4	Estructura de funciones del sistema óptico del termociclador en tiempo real	24
3.2	ELABORACIÓN DE LA ALTERNATIVA DE SOLUCIÓN ÓPTIMA .....	25
3.2.1	Matriz morfológica.....	25
3.2.2	Desarrollo de las alternativas de solución.....	25
3.2.3	Evaluación técnico-económica .....	27
3.3	ELABORACIÓN DEL DISEÑO DEFINITIVO.....	29
3.3.1	Diseño del dominio eléctrico .....	29
3.3.1.1	Componente para reducir el ruido eléctrico.....	29
3.3.1.2	Componente para acondicionar los niveles de voltaje para los actuadores. 30	
3.3.1.3	Circuito final del dominio eléctrico.....	31
3.3.2	Diseño del dominio de óptico y de actuadores .....	32
3.3.2.1	Elección del fluoróforo.....	32
3.3.2.2	Factores que afectan la intensidad de fluorescencia. ....	33
3.3.2.3	Elección del actuador .....	35
3.3.2.4	Circuito final del dominio de actuadores.....	36
3.3.3	Diseño del dominio de sensores y de procesos .....	37
3.3.3.1	Elección del fotodiodo .....	37
3.3.3.2	Circuito final del dominio de sensores .....	38
3.3.3.3	Elección del microcontrolador .....	39
3.3.3.4	Diseño final del sistema óptico de detección.....	39
<b>CAPITULO 4: PRUEBAS Y EVALUACIÓN DEL DISEÑO DESARROLLADO.</b>		
.....		<b>42</b>
4.1	VALIDACIÓN DEL SISTEMA ÓPTICO .....	42
4.1.1	Análisis del tinte fluorescente .....	42
4.1.2	Pruebas del tinte a diferentes longitudes de ondas de luz .....	43
4.2	VALIDACIÓN DEL DOMINIO DE SENSORES .....	46
4.2.1	Pruebas del dominio de sensores .....	46
4.2.2	Pruebas del tinte frente a una fuente de luz de intensidad variable.....	49
4.2.3	Pruebas de los tubos de ensayo frente a una fuente con intensidad de luz constante .....	51
<b>CONCLUSIONES .....</b>		<b>59</b>
<b>RECOMENDACIONES DE TRABAJOS FUTUROS.....</b>		<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA: .....</b>		<b>61</b>
<b>ANEXO A.....</b>		<b>66</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proceso del PCR [4] .....	3
Figura 2: Resultados gel de agarosa en electroforesis del ADN total extraído de plantas de tomate [4]. .....	4
Figura 3: Curva de amplificación, Florescencia vs ciclos de la reacción [7]. .....	4
Figura 4: Termociclador RT- qPCR MA6000 [16]. .....	7
Figura 5: Real time PCR LRTP-B30 [17]. .....	7
Figura 6: Mygo Mini [18]. .....	7
Figura 7: Línea del tiempo del termociclador PUCP. ....	8
Figura 8: Celda Peltier modelo CP2-31-10L [8]. .....	10
Figura 9: Configuración del sistema termoeléctrico del termociclador [11]. .....	11
Figura 10: Primer prototipo del termociclador PUCP con la tapa levantada [1]. .....	12
Figura 11: Bandeja porta muestras termociclador PUCP [13]. .....	12
Figura 12: Diagrama de procesos del termociclador PCR en tiempo real. ....	13
Figura 13: Fluoróforo con afinidad por el ADN [2]. .....	14
Figura 14: Sondas específicas [2]. .....	14
Figura 15: Esquema general de un tubo fotomultiplicador [12]. .....	15
Figura 16: Diagrama de bloques básico del CMOS [14]. .....	16
Figura 17: Diagrama de bloques básico del CCD [14]. .....	16
Figura 18: Fotodiodo FDS100 [22]. .....	17
Figura 19: Lámpara halógena de doble casquillo lineal [10]. .....	17
Figura 20: LED [23]. .....	18
Figura 21: Dominio eléctrico del sistema óptico. ....	22
Figura 22: Dominio de actuadores y óptico del sistema óptico. ....	22
Figura 23: Dominio de sensores y de control del sistema óptico. ....	23
Figura 24: Estructura de funciones del sistema óptico del termociclador en tiempo real. ....	24
Figura 25: Comparación de los valores técnicos-económicos de las alternativas de solución. ....	28
Figura 26: Filtro de línea 31.224/3 [25]. .....	30
Figura 27: Circuito del LM2576T-V. ....	31
Figura 28: Circuito final del dominio eléctrico. ....	31
Figura 29: Diferentes fluoróforos y su espectro de emisión de acuerdo a su longitud de onda [2]. .....	33
Figura 30: Espectro de emisión y absorción del SYBR GREEN [28]. .....	34
Figura 31: Espectro de intensidad del diodo LED470L [30]. .....	35
Figura 32: Gráfica de corriente vs intensidad relativa [30]. .....	36
Figura 33: Conexiones recomendadas del integrado LM3528 [31]. .....	36
Figura 34: Responsividad vs Longitud de onda [33]. .....	37
Se puede observar en la figura 34 que con la longitud de onda de 520nm la responsividad del fotodiodo es de 0.2 Aw, siendo este valor la sensibilidad del fotodiodo. ....	37
Figura 35: Amplificador de transimpedancia [34]. .....	38
Figura 36: Sistema óptico 3D. ....	40
Figura 37: Sistema óptico vista frontal. ....	40
Figura 38: Líquido fluorescente .....	42
Figura 39: Espectro de emisión y absorción del SYBR GREEN [28]. .....	43
Figura 40: Pruebas a diferentes longitudes de onda. ....	44
Figura 41: Pruebas a diferentes longitudes de onda. ....	45
Figura 42: Integrado BH1750. ....	46

Figura 43: Diagrama esquemático del dominio de sensores (imagen superior) y diagrama esquemático del circuito BH1750 (imagen inferior).....	47
Figura 44: Tubos de ensayo con el tinte fluorescente.....	48
Figura 45: Gráfica en luxs absorbidos por el tinte vs luxs emitidos por el tinte frente a una señal PWM.....	50
Figura 46: Circuito eléctrico de alimentación del LED.....	51
Figura 47: Lux emitidos por el diodo LED.....	52
Figura 48: Lux emitidos por los tubos de ensayo.....	52
Figura 49: Gráfica de fluorescencia de los valores promedios de los tubos de ensayo....	53
Figura 51: Muestras de 10 tubos de ensayo con diferente proporción de tinte y agua. ...	54
Figura 52: Lux emitidos por las 10 muestras de tubo de ensayo.....	55
Figura 53: Gráfica de fluorescencia de los valores promedios de los tubos de ensayo incluido el margen de error.....	56
Figura 54: Gráfica de fluorescencia en milivoltios de los valores promedios de los tubos de ensayo incluido el margen de error.....	57



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA1: VENTAJAS DEL TERMOCICLADOR PCR EN TIEMPO REAL VS TERMOCICLADOR .....	5
TABLA 2: COMPARACIÓN DEL ESTADO DEL TERMOCICLADOR PUCP VS UN .....	6
TABLA 3: MODELOS DE LOS 4 SENSORES ÓPTICOS DE LOS TERMOCICLADORES Y SU PRECIO. ....	19
TABLA 4: MATRIZ MORFOLÓGICA.....	25
TABLA 5: EVALUACIÓN TÉCNICA DE LOS CONCEPTOS DE SOLUCIÓN .....	27
TABLA 6: EVALUACIÓN ECONÓMICA DE LOS CONCEPTOS DE SOLUCIÓN .	28
TABLA 7: FLUORÓFOROS CON AFINIDAD AL ADN Y SONDAS ESPECIFICAS [24].....	32
TABLA 8: RANGO DEL ESPECTRO DE FRECUENCIAS Y LONGITUDES DE ONDAS CORRESPONDIENTE A LA LUZ VISIBLE.....	44
TABLA 9: RESPUESTA DEL TINTE A LONGITUDES DE ONDA DEL COLOR AZUL(A), VERDE(B) Y VIOLETA(C).....	45



## INTRODUCCIÓN

Desde tiempo antiguos, se han desarrollado técnicas médicas para combatir las enfermedades. Pero la medicina no solo se centra en curar enfermedades, sino también en predecirlas para lo cual es necesario tener un buen diagnóstico. Debido a ello, la biología molecular ha desarrollado la técnica del PCR para replicar el ADN y de esta forma ayudar a identificar los patógenos infecciosos que están atacando a los pacientes. La técnica del PCR consta de varias fases que necesitan una temperatura específica para que completen todo su proceso, es ahí donde intervienen la ingeniería electrónica y mecánica para desarrollar un dispositivo denominado termociclador. Este dispositivo permite generar las variaciones de temperatura para cada fase del PCR.

El grupo de investigación Equi-LaB de la Sección de Electricidad y Electrónica y el Grupo INACOM de la Sección Mecánica de la PUCP, han desarrollado un prototipo funcional de un termociclador en tiempo final. Este prototipo se ha comparado con equipos comerciales obteniendo buenos resultados. Sin embargo, en el ámbito de diagnóstico de enfermedades infecciosas, los termocicladores en tiempo final presentan varias desventajas frente a los termocicladores en tiempo real. Teniendo como base al prototipo funcional desarrollado por Equi-LaB se puede diseñar un termociclador en tiempo real.

El objetivo de esta tesis, es diseñar un sistema de detección óptico para monitorear cada fase del PCR en tiempo real. Este sistema de detección óptico se puede acoplar al prototipo de termociclador desarrollado por Equi-LaB, para combinar la amplificación y detección en un solo paso, es decir, diseñar un termociclador en tiempo real.

## **CAPÍTULO 1: MARCO PROBLEMÁTICO**

### **1.1 Descripción del problema**

Durante años, uno de los problemas más grandes de la medicina es el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Un mal diagnóstico puede ser perjudicial para un paciente o en otros casos el diagnóstico puede ser el correcto, pero tardío y cuando ya es difícil ayudar al paciente. Por tal motivo, desde la biología molecular se han desarrollado estudios de diagnóstico basados en la identificación del ADN [1].

Uno de los métodos de diagnóstico tiene como eje fundamental la identificación del ADN/ARN propio de cada patógeno. Esto se debe a que el ADN/ARN es la base del material genético que se encuentra dentro de todos los seres vivos. Entonces, el identificar el ADN/ARN presenta una oportunidad precisa en el campo de diagnóstico de enfermedades infecciosas, pero este conocimiento no es suficiente debido a que al tratarse de elementos tan diminutos y en muy poca cantidad, es necesario aumentar su cantidad sin afectar su código genético; para lo cual la técnica de reacción en cadena de la polimerasa asociada al uso del equipo automatizado, en este caso un termociclador, es de vital importancia [1].

### **1.2 Estado del arte**

#### **1.2.1 Definiciones bases sobre el PCR**

##### **1.2.1.1 Replicación del ADN mediante la técnica de PCR**

El proceso natural de replicación del ADN es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). Para la realización de este proceso en un laboratorio in vitro se ha construido el termociclador que desarrolla las diferentes fases del PCR mediante ciclos de variaciones de temperatura, para separar el ADN y estimular las enzimas en los tiempos requeridos [4]. En la siguiente imagen se muestra las fases del PCR y la temperatura específica que se necesita para que cada fase pueda completar su proceso.

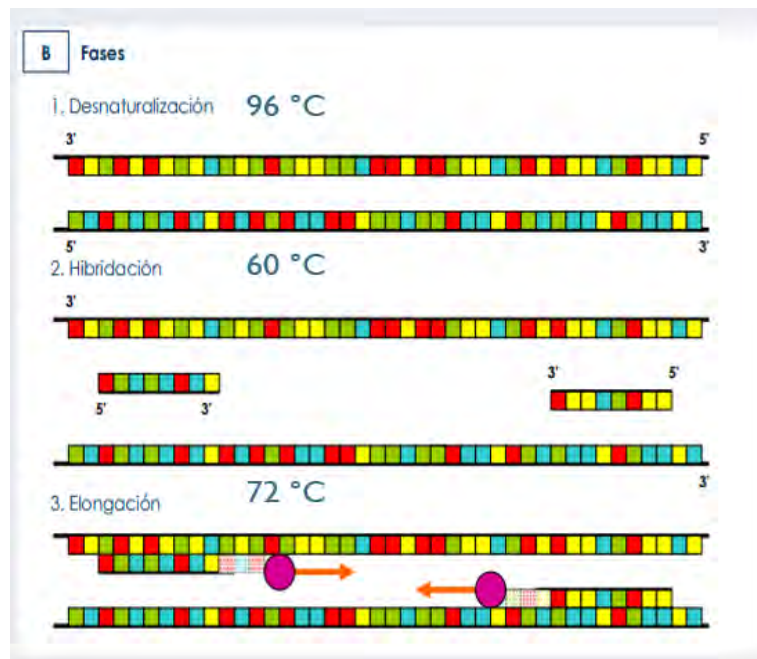


Figura 1: Proceso del PCR [4]

Esta técnica tiene diferentes aplicaciones en diferentes ámbitos. En Paleontología, es necesario debido a que las muestras antiguas presentan cantidades escasas de ADN. En el ámbito médico se utiliza como herramienta de diagnóstico, por ejemplo, en las pruebas moleculares del Covid19.

### 1.2.1.2 Termociclador

Un termociclador es una máquina diseñada para aplicar el ciclo térmico de PCR a una o varias muestras de ADN, logrando de esta forma, aumentar la cantidad de las muestras, es decir, las réplicas. Existen 2 tipos de termocicladores actualmente, el termociclador en tiempo final y el termociclador en tiempo real. La diferencia entre ambos es la forma de visualizar los resultados obtenidos luego del proceso del PCR [1].

### 1.2.1.3 Termociclador en tiempo final

El termociclador PCR en tiempo final o comúnmente llamado termociclador convencional, tiene como principal función realizar variaciones de temperatura para realizar cada fase del PCR. Para poder visualizar los resultados obtenidos, es necesario añadir un proceso de electroforesis en la que la mezcla es colocada en un gel de agarosa. Sin embargo, añadir un proceso adicional indica añadir más reactivo y esto puede tener consecuencias para la mezcla amplificada. Se ha reportado que, para la PCR en tiempo final, la cantidad final de producto amplificado puede verse afectada por inhibidores, saturación de la reacción o bien por falta de una estandarización adecuada. Entonces, los resultados de la PCR tiempo final pueden no tener relación entre la cantidad de ácidos

nucleicos que había al inicio de la reacción y la concentración final del producto amplificado [2]. En la figura 2 se puede observar los resultados obtenidos luego del proceso de electroforesis.

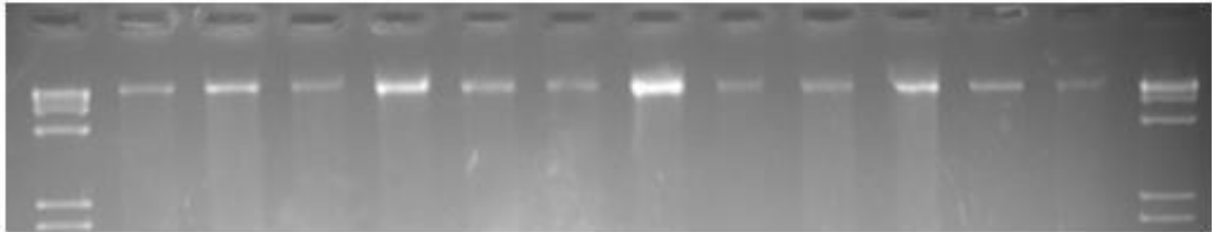


Figura 2: Resultados gel de agarosa en electroforesis del ADN total extraído de plantas de tomate [4].

#### 1.2.1.4 Termociclador en tiempo real

El termociclador en tiempo real permite amplificar y cuantificar simultáneamente el número de hebras de ADN obtenidos en el proceso del PCR. Este termociclador es una modalidad del termociclador convencional debido a que usa los mismos recursos y tecnología para el proceso del PCR, la diferencia radica en que en el tiempo real es necesario añadir fluoróforos al proceso de amplificación para que un sistema de detección óptico pueda registrar los parámetros de su fluorescencia y de esta manera obtener resultados cuantitativos de la muestra final de ADN. Por otro lado, al no necesitar un proceso adicional de electroforesis, se reducen los problemas en la saturación de la reacción y una mayor rapidez en la visualización de los resultados obtenidos [2]. A continuación, se muestra una gráfica de fluorescencia vs ciclos de PCR obtenidas de un termociclador en tiempo real comercial.

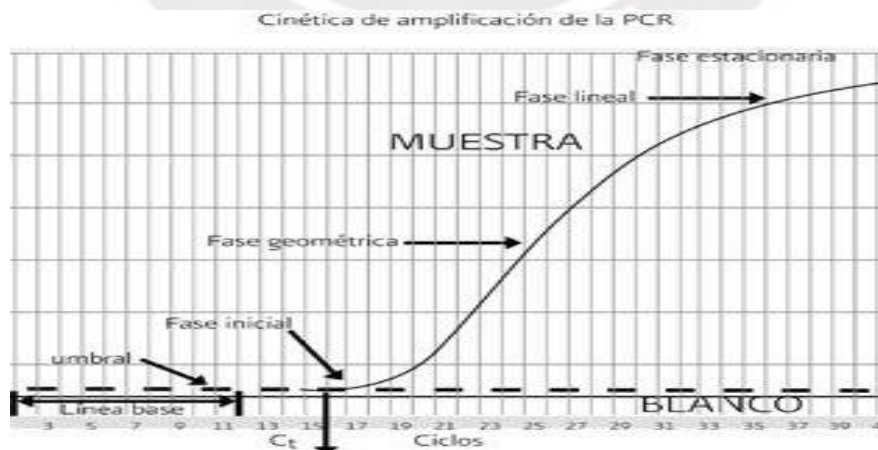


Figura 3: Curva de amplificación, Florescencia vs ciclos de la reacción [7].

### 1.2.1.5 Ventajas del termociclador PCR en tiempo real vs tiempo final

**Tabla1: Ventajas del termociclador PCR en tiempo real vs termociclador en tiempo final [19].**

Termociclador en tiempo real	Termociclador en tiempo final
<ul style="list-style-type: none"><li>• Presenta mayor rango dinámico de detección.</li><li>• No requiere un proceso adicional para visualizar los resultados.</li><li>• Posee un sistema de detección óptico para cuantificar el número de replicas obtenidas.</li><li>• Mayor nitidez.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Baja precisión y sensibilidad.</li><li>• Requiere un proceso de electroforesis adicional para visualizar los resultados.</li><li>• Los resultados no son expresados en números sino en bandas por lo cual no se puede cuantificar el número de replicas.</li><li>• Baja resolución.</li></ul>

### 1.2.2 Avances del desarrollo de termociclador PCR en la PUCP

El grupo de investigación “Equi-LaB - Grupo de Desarrollo de Equipos para Laboratorios Biológicos de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP), formado por ingenieros, biólogos, tesistas y alumnos de la misma casa de estudios, unidos con el grupo INACOM de la Sección Mecánica, vienen desarrollando desde al año 2000 la tecnología que da soporte al desarrollo e implementación de un prototipo de termociclador.

El primer gran avance que se dio en la PUCP respecto a los termocicladores, fue con el proyecto “Termociclador térmico programable digitalmente”, presentado a la Dirección Académica de Investigación, actualmente Dirección de Gestión de Investigación, por Equi-LaB por medio del ingeniero Ángelo Velarde. Con este proyecto se llegó a conocer las características de la celda Peltier como elemento para lograr las variaciones de temperatura.

Posteriormente en la tesis “Diseño de los componentes mecánicos de un termociclador utilizando el método de los elementos finitos” presentada por Omar Piminchumo, estudia lo parámetros de funcionamiento de un termociclador y mediante simulaciones propone a la celda Peltier modelo VT-199-1.4-0.8 de TE Technology como la adecuada para realizar los cambios térmicos. También, diseña y se fabrica una bandeja de porta muestras de plata debido a su alta conductividad térmica y menciona que es necesario acoplar un sistema disipador ventilador para un correcto funcionamiento del sistema termo mecánico [13].




En la tesis “Diseño e implementación de un módulo para procesos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la replicación del ADN” presentada por Ponce y Zegarra en el 2012, se define cada una de las fases del PCR y la temperatura necesaria para completar su proceso, seleccionan un sensor de temperatura YSI 44018 para registrar el comportamiento térmico de las celdas Peltier y cómo afectan al dispositivo. Por último, añaden un sistema de control manejado por el microcontrolador PIC 16F877, llegando a conseguir rampas de temperatura de 0.4 °C/s con una precisión de  $\pm 0.8$  °C [15].

En el año 2014, Jesús Maccasi en su tesis “Implementación de un prototipo de termociclador alimentado con una fuente de 24 VDC”, toma como referencia los resultados obtenidos Ponce y Zegarra para la implementación de un prototipo funcional de termociclador y propone reemplazar la fuente de 12 VDC utilizadas anteriormente por una fuente de alimentación de 24 VDC para aumentar la potencia y mejorar la rampa de temperatura, llegando a conseguir una rampa de 1.7 °C/s [1]. Por último, los tesisistas M. Chávez y J. Bohórquez en el año 2017 y bajo los auspicios de un nuevo proyecto financiado por la DGI-PUCP logran el diseño e implementación de otro prototipo funcional de termociclador comparable con los equipos comerciales brindando buenos resultados, tanto en las rampas de subida y bajada de temperatura con 3.0 °C/s, como también en la nitidez de las imágenes luego de la etapa de electroforesis [6].

**Tabla 2: Comparación del estado del termociclador PUCP vs un termociclador en tiempo final comercial.**

	Termociclador PUCP	Termociclador SCI100-G
Rango de temperatura de operación	[4°C~100°C]	[4°C~105°C]
Rampa de temperatura	3.0 °C/s	3.0 °C/s
Sensibilidad	$\pm 0.8$ °C	$\pm 0.1$ °C
Ciclos de trabajo	35~40	30~99
Material de la bandeja	Plata	Aluminio
Input	Teclado matricial	Panel touch
Alimentación	220V AC	100 ~ 120/200 ~ 240 V AC

### 1.2.3 Modelos termociclador en tiempo real comerciales

		
<p><i>Figura 4: Termociclador RT-qPCR MA6000 [16].</i></p>	<p><i>Figura 5: Real time PCR LRTP-B30 [17].</i></p>	<p><i>Figura 6: Mygo Mini [18].</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rango de control de temperatura: 4°C~100°C</li> <li>Rampa de temperatura máxima: 3.5°C/s</li> <li>Precisión de temperatura:             <ul style="list-style-type: none"> <li>• ±0.1°C</li> </ul> </li> <li>• Detector óptico: CCD</li> <li>Fuente de luz: Halógena</li> <li>Alimentación: 110 ~ 240 VAC (50~60 Hz)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rango de control de temperatura: 4°C~110°C</li> <li>Rampa de temperatura máxima: 4°C/s</li> <li>• Precisión de temperatura:             <ul style="list-style-type: none"> <li>• ±0.1°C</li> </ul> </li> <li>• Detector óptico: PMT</li> <li>Alimentación: 100 ~ 240 VAC (50~60 Hz)</li> <li>• Tecnología del ciclo             <ul style="list-style-type: none"> <li>• térmico: Peltier</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rango de control de temperatura: 37°C~99°C</li> <li>Rampa de temperatura máxima: 3°C/s</li> <li>• Precisión de temperatura:             <ul style="list-style-type: none"> <li>• ±0.25°C</li> </ul> </li> <li>Detector óptico: CMOS</li> <li>Ruido: Silencioso</li> </ul>

Los parámetros del termociclador PUCP son comparables con los termocicladores en tiempo real comerciales. Por lo que con añadir un sistema que pueda monitorear la amplificación del ADN, se podría mejorar el diseño del termociclador PUCP para que posea las características necesarias para ser considerarlo termociclador “en tiempo real” PUCP.

### 1.2.4 Línea de tiempo del Termociclador PUCP

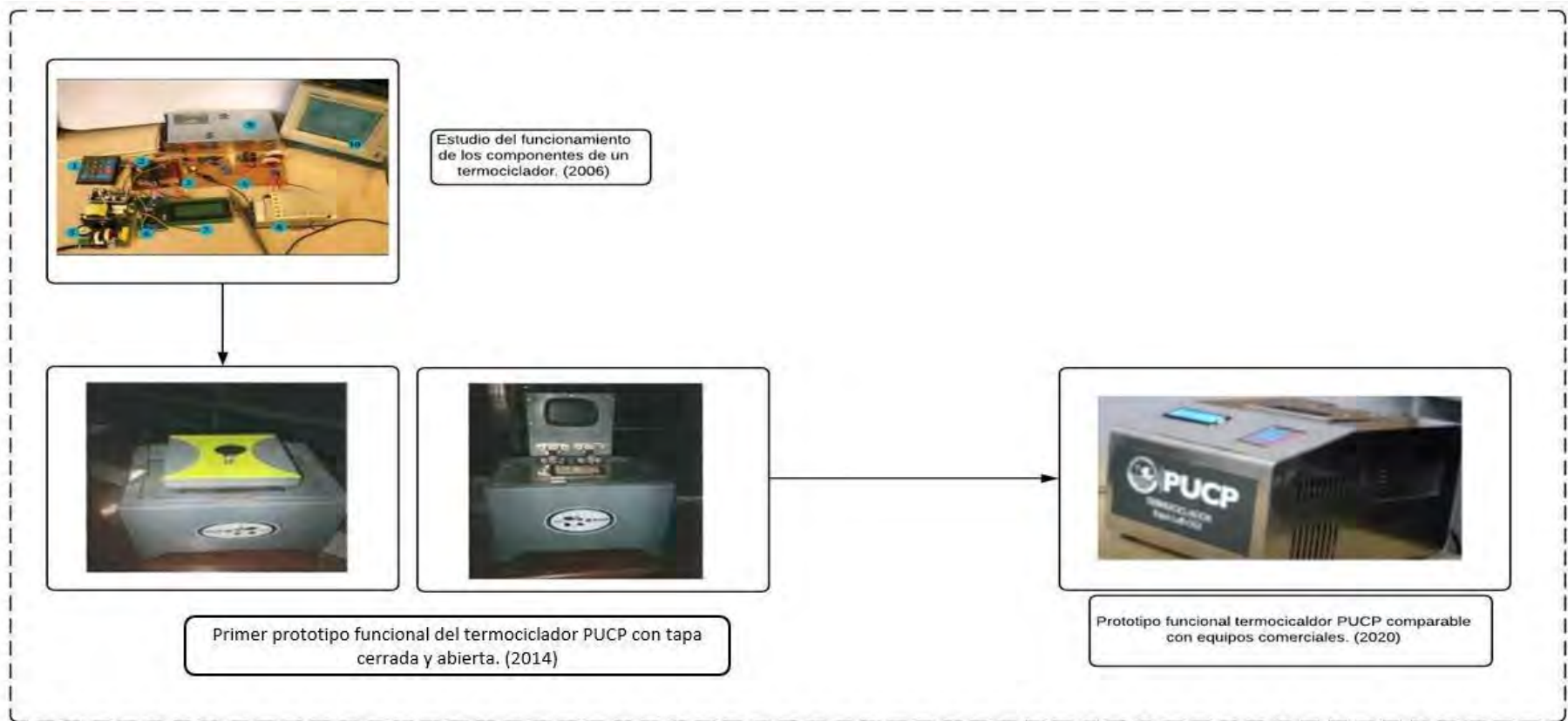


Figura 7: Línea del tiempo del termociclador PUCP.

### **1.3 JUSTIFICACIÓN**

Este estudio, tiene como finalidad diseñar la parte electrónica de un Termociclador PCR en tiempo real partiendo del estudio de un termociclador a tiempo final. El motivo por el cual se toma como base el termociclador PCR en tiempo final es que el grupo de investigación de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Equi-LaB, ha desarrollado un prototipo funcional de este tipo de termociclador, pero este cuenta con un problema, si bien el dispositivo cumple con el propósito de replicar el ADN, no permite cuantificar el número de replicas obtenidas sino solo un estimado que se derivada de cálculos teóricos [1].

En cambio, con un termociclador PCR en tiempo real se puede obtener los datos de que es lo que está ocurriendo en el proceso de PCR dentro del termociclador y cuantificar el número de replicas mediante sensores instalados dentro de este para seguir cada fase [2]. Si bien el termociclador es un excelente elemento tecnológico para el diagnóstico de diversos tipos de enfermedades, en nuestro país no existe la suficiente cantidad de centros de salud que cuenten con este dispositivo. Además, el problema no solo se centra en el manejo o acceso a esta tecnología, sino también al alto costo en su adquisición y conocimiento; dado que, presenta el riesgo de dejarlos de lado después de alguna falla al expirar la garantía.

Finalmente, este estudio contribuye al desarrollo de estos dispositivos para una mejor accesibilidad de esta tecnología a los departamentos de diagnóstico de enfermedades infecciosas de una entidad de salud ya que tendrían acceso al dispositivo a un precio más económico y, por otro lado, contar con personal especializado para el mantenimiento correctivo y preventivo [1],[6].

### **1.4 OBJETIVOS**

#### **1.4.1 OBJETIVO GENERAL**

- Diseñar la electrónica de un termociclador PCR en tiempo real, partiendo de un termociclador PCR en tiempo final.

#### **1.4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Recopilar información del diseño de un termociclador PCR a tiempo final.
- Diseñar un sistema óptico de detección para el desarrollo de un termociclador PCR en tiempo real.
- Simular y calibrar el sistema óptico de detección.

## CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

Gracias a las variaciones de temperaturas que se generan en el termociclador, se consigue realizar la replicación del ADN mediante el proceso del PCR. Teniendo una muestra de ADN replicada, se puede detectar agentes infecciosos como los virus de las hepatitis B y C o el virus del Covid19. De esta manera, el personal médico puede ser efectivo en el diagnóstico.

En el presente capítulo, se desarrollará las técnicas de detección óptica que se utilizan en los termocicladores en tiempo real y también los componentes necesarios para su diseño.

### 2.1 Generalidades de los termocicladores

La diferencia entre los termocicladores en tiempo real y en tiempo final se centra en el sistema de detección óptico para visualizar todo el proceso de replicación. Lo cual indica que el termociclador en tiempo real es un avance dentro de la línea de termocicladores. A continuación, se mencionarán los componentes más importantes de un termociclador.

#### 2.1.1 Celda Peltier

La función principal de un termociclador es variar la temperatura para que se complete cada fase del PCR. Es por ello que en la mayoría de termocicladores comerciales se utiliza el efecto Peltier que se aplican al dispositivo por medio de las celdas Peltier. El principio de funcionamiento del efecto Peltier consta en crear una diferencia de temperatura debida a una corriente eléctrica. Entonces, cuando la corriente eléctrica pasa por un circuito compuesto por 2 metales o semiconductores que presentan una unión, se genera una diferencia de temperatura entre ambos materiales es decir mientras una se enfría el otro se calienta [1]. En la figura 8 se muestra una celda Peltier modelo CP2-31-10L de la empresa Laird Technologies. Los modelos comercializados por estas empresas han servido para desarrollar prototipos funcionales en el ámbito nacional.

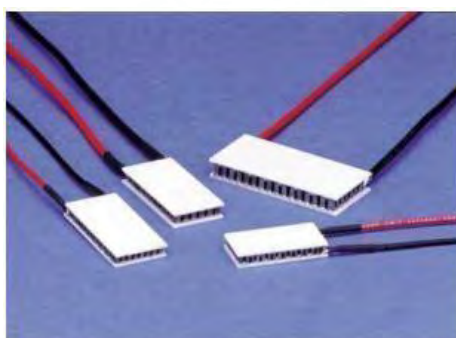


Figura 8: Celda Peltier modelo CP2-31-10L [8].

### 2.1.2 Sistema disipador ventilador

Si bien el termociclador cuenta con la tecnología Peltier para los ciclos térmico de las fases del PCR, también necesita componentes con alta conductividad térmica para permitir agilizar los cambios de temperatura de una fase a otra. Como se mencionó anteriormente que algunas fases del PCR trabajan a temperaturas cercanas a los 100 °C, esto implica un aumento de temperatura en el sistema por lo cual es necesario incluir un disipador para un correcto funcionamiento del dispositivo. Pero convección natural no es suficiente para disipar todo el calor excesivo que podría presentarse. Entonces es necesario añadir un elemento externo como un ventilador que asegure un flujo de aire necesario para evitar que el sistema se sobrecaliente [11]. A continuación, se presenta el sistema termoeléctrico del termociclador en la cual se puede observar que en la parte inferior se encuentra el sistema disipador ventilador.

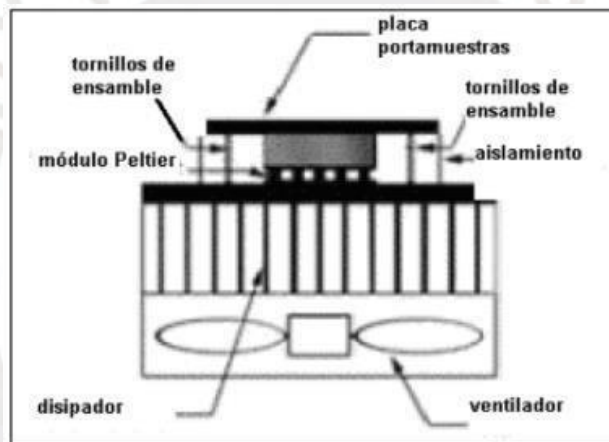


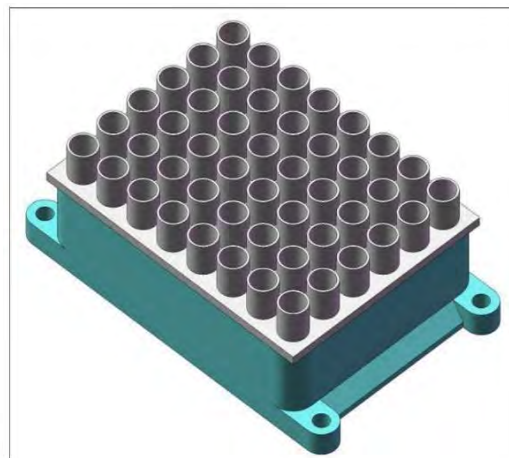
Figura 9: Configuración del sistema termoeléctrico del termociclador [11].

### 2.1.3 Bandeja porta muestras

La bandeja porta muestras es el elemento donde se van a ubicar los tubos de PCR, es en estos tubos en los que se colocaran tanto el ADN como los reactivos necesarios para el proceso de replicación. Por otro lado, su función no solo consiste en contener a los tubos de PCR si no también en la transferencia de calor. Es decir, la bandeja de porta muestras tiene que ser de un material con alta conductividad térmica para que todos los tubos de PCR mantengan una temperatura constante. En la siguiente imagen se puede ver el prototipo funcional de la PUCP con la tapa superior abierta para poder visualizar la bandeja de porta muestras, en la parte izquierda. Este prototipo uso la plata como material de fabricación de la bandeja. En la parte derecha se encuentra la arquitectura de la bandeja porta muestras.



*Figura 10: Primer prototipo del termociclador PUCP con la tapa levantada [1].*



*Figura 11: Bandeja porta muestras termociclador PUCP [13].*

#### **2.1.4 Diagrama de procesos del termociclador PCR en tiempo real**

Las etapas del termociclador en tiempo real una vez recolectadas las muestras son:

- a) Colocarlas las muestras de ADN que se quiere amplificar en la bandeja porta muestras con los reactivos necesarios para su amplificación.
- b) Introducir las características del proceso al programa del equipo.
- c) Inicio del proceso de PCR o arranque de los ciclos térmico
- d) Activación del sistema de detección óptico (monitoreo de datos)
- e) Presentación de los datos y gráficas del proceso en tiempo real
- f) Los procesos c y d se repetirán por 30 o 40 ciclos.
- g) Finalmente, se obtendrán una muestra final amplificada con datos y gráficas correspondientes del proceso PCR.

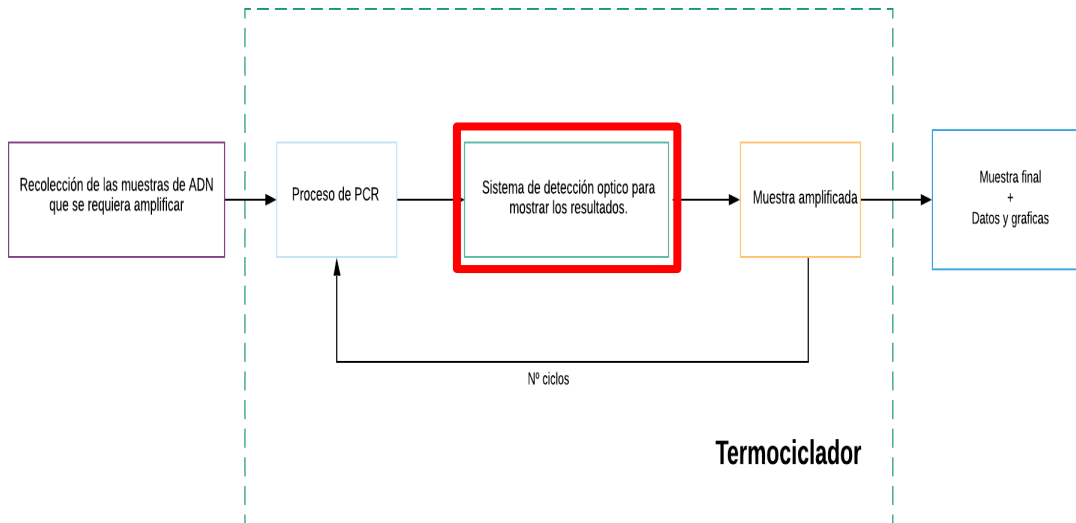


Figura 12: Diagrama de procesos del termociclador PCR en tiempo real.

El prototipo funcional de termociclador de la PUCP cumple con 4 de estos 5 bloques presentados anteriormente. Por ello, este estudio se encarga de desarrollar el sistema de seguimiento y cuantificación óptica en tiempo real del proceso, que luego será acoplado al prototipo funcional y de esta manera obtener un termociclador en tiempo real.

## 2.2 Sistema para la detección óptica del proceso del PCR en tiempo real

### 2.2.1 Sistemas de monitoreo de datos usados en la PCR en tiempo real

Existen dos tipos de fluoróforos que se utilizan para poder monitorear la amplificación del ADN durante el proceso del PCR, estos son: fluoróforos con afinidad por el ADN y sondas específicas para fragmentos del ADN que solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado una zona específica del ADN de interés [2].

#### 2.2.1.1 Fluoróforos con afinidad al ADN

Son fluoróforos que presentan afinidad con el ADN y se unen de forma intercalada. Estos fluoróforos al oxidarse generan señales fluorescentes, que es emitida en la fase de extensión de cada ciclo del PCR. La fluorescencia emitida por estos fluoruros presenta una relación directamente proporcional al número de réplicas de ADN. Es decir, mientras se va amplificando la muestra de ADN inicial, el nivel de fluorescencia será mayor. Teniendo como parámetros la fluorescencia y la relación que mantiene con el número de réplicas, se puede cuantificar el número de réplicas obtenidas en cada ciclo del PCR [2]. En la figura 13 se ilustra la forma como los fluoruros se combinan con el ADN y como aumenta el nivel de fluorescencia en la fase de extensión (síntesis), que es la fase en donde se replica el ADN.

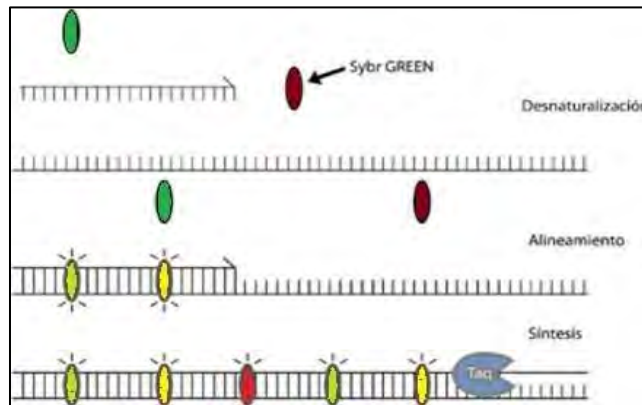


Figura 13: Fluoróforo con afinidad por el ADN [2].

### 2.2.1.2 Sondas específicas

Estos sistemas de detección se desarrollaron dado que en algunos ensayos cuantitativos no es necesario analizar el ADN completo sino solo una zona específica. Por otro lado, el principio teórico de esta técnica es el sistema FRET (por sus siglas en inglés de Foster resonance energy transfer), que radica en la transferencia de energía entre 2 tipos de fluoróforos, un aceptor y un donador. En la figura 9 se puede observar cada fase de esta técnica. En el proceso de desnaturalización del PCR, que se encuentra en la parte superior de la figura 14, los fluoróforos están próximos haciendo que el aceptor absorba toda la fluorescencia del donador. Pero a medida que se van desarrollando las fases del PCR se van separando y es hasta la fase de Extensión, parte inferior de la figura 9, en la cual el aceptor se encuentra a una distancia que ya no puede absorber la fluorescencia del donador y libera esa energía en forma de luz que puede ser detectada por el sistema óptico de detección.

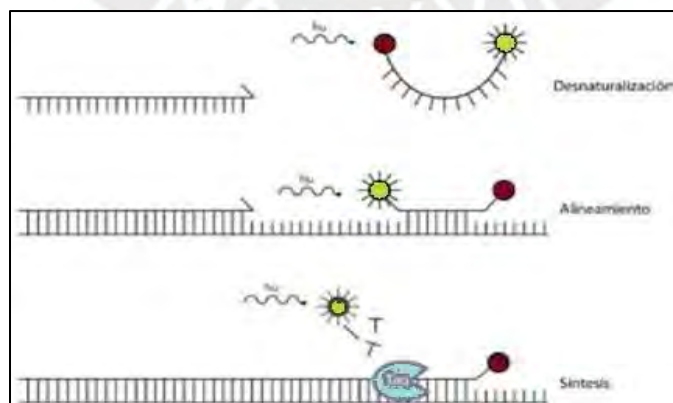


Figura 14: Sondas específicas [2].

## 2.2.2 Componentes del sistema de detección óptico utilizados en los termocicladores

### PCR en tiempo real

Para lograr detectar los parámetros de fluorescencia de los fluoróforos en el proceso de PCR, es necesario contar con sensores con la capacidad de convertir las ondas de luz en señales eléctricas. De esta forma, por medio de una microcomputadora se puedan procesar estos datos para su análisis y cuantificación posterior.

Actualmente los termocicladores comerciales utilizan 3 tipos de sensores el CCDs y el CMOS o un dispositivo PMT y en pocos casos los fotodiodos.

#### 2.2.2.1 Tubos de vacío fotomultiplicadores

Un tubo fotomultiplicador (PMT por sus siglas en ingles “Photomultiplier tube”) es un dispositivo diseñado para la detección de fotones, basado en el principio del efecto fotoeléctrico para convertir la luz en una señal eléctrica. Uno de los beneficios de este dispositivo es la amplificación de las señales de luz, debido que algunas veces las señales de luz o fluorescencia son un poco débiles lo cual hace difícil su detección [12]. Entonces amplificado estas señales se obtienen parámetros eléctricos que se pueden medir con mayor facilidad.

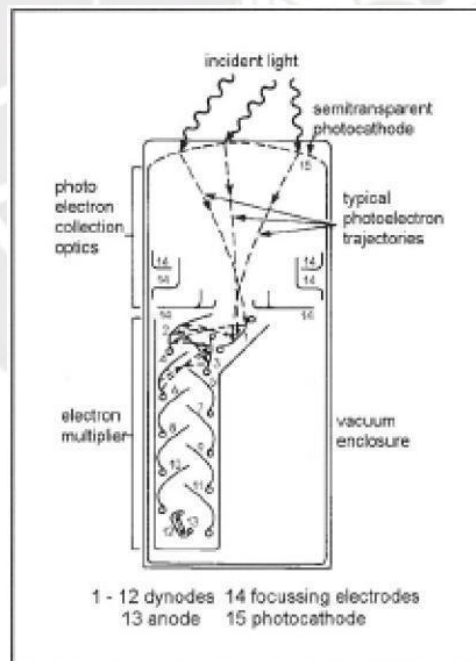


Figura 15: Esquema general de un tubo fotomultiplicador [12].

#### 2.2.2.2 Sensores CMOS

El sensor CMOS al igual que el dispositivo PMT está diseñado para convertir patrones de luz en señales eléctricas. Para esto cuenta con un arreglo de pequeños sensores conocidos

como píxeles. Estos píxeles almacenan la información de la intensidad de luz del ambiente en donde se encuentra y los convierte en cargas eléctrica. Por ello, es necesario que los píxeles se encuentren acoplados a un dispositivo que convierta la señal que se tiene de las cargas eléctricas, que sería analógica, en digital. En la siguiente figura se puede observar el diagrama de bloques básico de un sensor CMOS, en la parte izquierda se encuentra el arreglo de píxeles, en la parte inferior se puede observar una etapa de amplificación y luego de esta el convertidor analógico-digital.

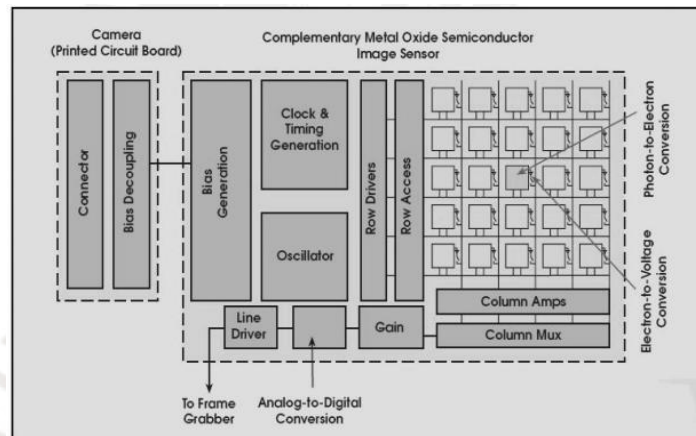


Figura 16: Diagrama de bloques básico del CMOS [14]

### 2.2.2.3 Sensores CCDs

Los sensores CCDs presentan un diseño y funcionamiento similar a los CMOS. Para convertir los patrones de luz en señales eléctricas tienen entrelazados varios condensadores que van a cargarse dependiendo de la señal de luz.

Luego de almacenar las cargas se procede a digitalizarlos con un dispositivo que se encargar de convertir la señal eléctrica en voltaje y luego una etapa de amplificación para no perder la información obtenida. En la siguiente imagen se presenta el diagrama de bloques básico del sensor CCD.

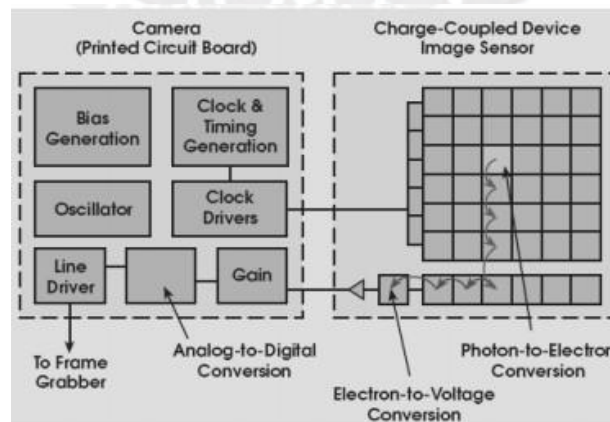


Figura 17: Diagrama de bloques básico del CCD [14]

#### 2.2.2.4 Fotodiodo

El fotodiodo es un conductor con una unión PN. Este conductor es sensible a intensidades de luz con longitudes de onda en el rango visible o infrarrojos. Al polarizarlo inversamente, va a circular corriente por sus uniones cuando exista una fuente externa de energía lumínica.



Figura 18: Fotodiodo FDS100 [22]

#### 2.2.2.5 Fuente de excitación de luz para los fluoróforos

Los fluoróforos necesarios para la cuantificación de las réplicas del ADN necesitan una fuente de luz que pueda proveer energía para que puedan pasar a un estado de excitación y emitan fluorescencia [2].

#### 2.2.2.6 Lámparas halógenas de tungsteno

La lámpara halógena de tungsteno es un tipo de lámpara incandescente, es decir emite luz de forma artificial. Está compuesto por filamentos de tungsteno y pequeñas cantidades de halógenos. Es utilizado en los termocicladores debido al ser sometido a temperaturas elevadas, como en el termociclador que se tiene que trabajar con temperaturas cercanas a los 100 °C, aumenta su eficiencia y emite una mayor intensidad de luz que otras lámparas incandescentes [9]. A continuación, se muestra una lampara halógena de tungsteno lineal.



Figura 19: Lámpara halógena de doble casquillo lineal [10].

#### 2.2.2.7 Diodo emisor de luz

El diodo led es una fuente de luz artificial construida a partir de materiales semiconductores. Estos semiconductores presentan una unión PN. Al aplicarle una tensión a sus terminales liberan energía en forma de luz. El color depende de la longitud de onda y su banda estrecha. En la siguiente figura se puede ver el modelo de un diodo led.



*Figura 20: LED [23].*

### **2.3 Comparación de los componentes de detección óptico**


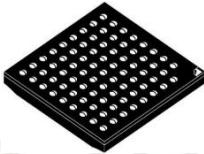


En los puntos anteriores se mencionaron 4 tipos de sensores que se utilizan para detectar las señales lumínicas, fluorescencia en específico, que emiten los fluoróforos en el proceso del PCR.

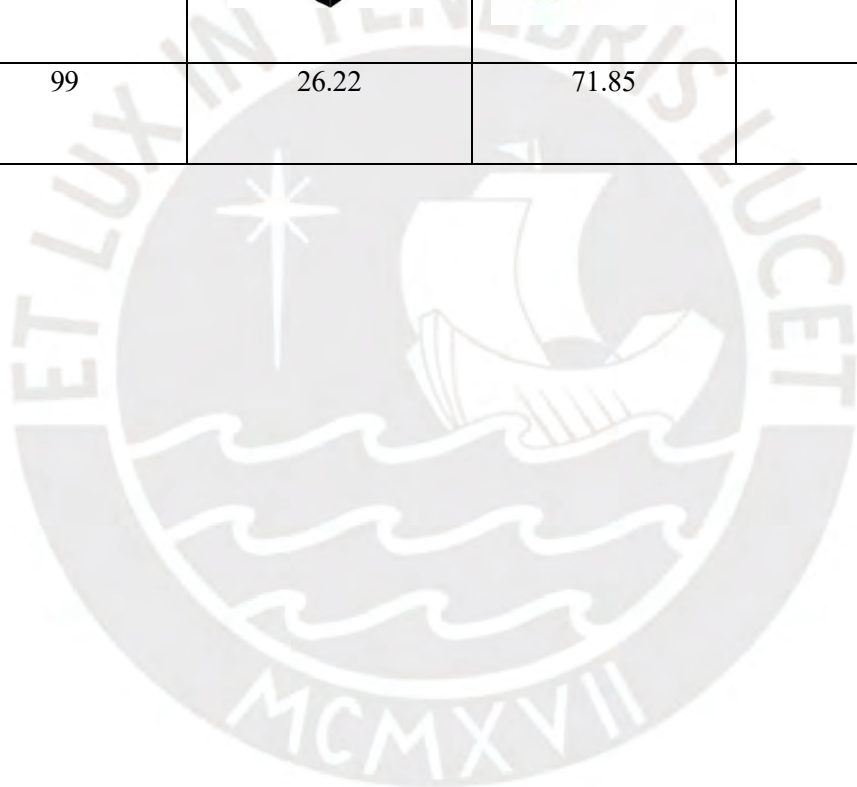
El tubo de vacío es el sensor más usado para la fabricación de termociclador en tiempo real, gracias a su alta ganancia y un alto nivel de cancelación de ruido. Los sensores CCDs presentan mejor calidad de imagen que los sensores CMOS y poco ruido digital [14], pero son menos usados para la fabricación del termociclador en tiempo real debido a que los sensores CMOS consumen menos energía y el tiempo de procesamiento es menor que el CCDs. Respecto a la calidad de imagen, los termocicladores no necesitan una alta resolución de imágenes por la que los sensores CMOS cumplen con esos requerimientos. Pero los sensores CMOS presentan menor área para recibir los patrones de luz y baja respuesta al ruido [14], por tal motivo son menos usados que los tubos de vacío.

Por último, los fotodiodos son la opción menos recomendable debido a que presenta menor calidad que las anteriores opciones.

A continuación, una tabla donde se compara los precios de las 4 opciones con un respectivo modelo de cada uno.

**Tabla 3: Modelos de los 4 sensores ópticos de los termocicladores y su precio.**

	Tubo de vacío (R9220)	CMOS (AR0230CSSC 00SUEA0- DPBR2)	CCD (ELPHIXUS 85is IXY 25is Silver Lens Unit With CCD)	Fotodiodo (FDS100)
				
Precio (\$)	99	26.22	71.85	13



### CAPITULO 3: DISEÑO DEL SISTEMA ÓPTICO DE DETECCIÓN

Para el diseño de sistema óptico, que será acoplado al termociclador, se usará algunos aspectos de la metodología VDI 2206. Esta metodología es recomendada para el diseño de equipos electrónicos en los cuales intervienen dominios de diversas ingenierías, como ocurre en esta tesis. Gracias a los procesos que maneja esta metodología se puede partir de la información que se ha obtenido con la investigación para determinar las características generales del equipo que se desea diseñar para finalmente obtener soluciones optimas.

#### 3.1 Elaboración de la estructura de funciones

Para reducir la complejidad del diseño de sistema óptico, se procede a dividirlo en dominios parciales más sencillas de analizar y resolver. Entonces, partiendo de la lista de exigencias, se realiza una abstracción de lo que queremos desarrollar en un sistema simple de entradas y salidas. Posteriormente, se define los procesos técnicos correspondientes al sistema óptico del termociclador. Finalmente, teniendo bien definido lo anteriormente mencionado, se construye una adecuada estructura de funciones para todo el equipo.

##### 3.1.1 Caja negra del sistema óptico del termociclador en tiempo real



##### 3.1.2 Procesos técnicos

El usuario debe recoger una muestra de ADN que desea amplificar junto con los reactivos necesarios para su amplificación (Polimerasas, cebadores, etc). Estos elementos son colocados en los microtubos de ensayo que se encuentran en el porta muestras del termociclador. Es en este proceso donde se añade el fluoróforo que va a monitorear la amplificación del ADN culminando el proceso de preparación.

Una vez que se tiene todos los elementos necesarios dentro de los microtubos de ensayo, se inicia el proceso del PCR para lo cual el termociclador empezará a realizar el ciclo térmico correspondiente. La temperatura dentro del termociclador será leída constantemente por un termistor (sensor térmico). Al detectar la fase de extensión (fase en la cual la temperatura a la que está expuesta las muestras de ADN es 72 °C), mandará una señal a la unidad de control para que el sistema óptico de detección comience a

funcionar.

Cuando el sistema óptico de detección esté en funcionamiento, la Unidad de control generará las señales necesarias para que las fuentes de emisión de luz enciendan y brinden energía a los fluoróforos para que emitan fluorescencia. Un sensor de luz, que estará colocado en la parte superior de los microtubos de termociclador, va a detectar las señales lumínicas que generan los fluoróforos y estas señales van a ser recibidas por un dispositivo que se encargará de procesar los datos. Finalmente, cuando se detecte que ha culminado la fase de extensión, el sistema óptico se mantendrá en reposo esperando la próxima fase de extensión.

Para mejor detalle, se contará con la siguiente estructura de procesos técnicos basados en 4 fases:

a) Preparación

- Revisar las conexiones y el estado de los microtubos de ensayo.
- Colocar las muestras de ADN y reactivos para la amplificación en los microtubos de ensayo.
- Adicionar los fluoróforos.
- Asegurar la correcta alimentación del termociclador.

b) Ejecución

- Variar la temperatura dentro del termociclador.
- Medir la temperatura dentro del termociclador y enviar la información a la unidad de control
- Encender los diodos LED.
- Medir las señales lumínicas y enviar la información al microcontrolador.

c) Control

- Establecer la temperatura de referencia para la unidad de control.
- Generar las señales para encender los diodos LED.
- Controlar los indicadores visuales.
- Controlar que ha culminado la fase de extensión.

d) Fase final

- Convertir los datos lumínicos en señales que indiquen el estado de la amplificación del ADN.
- Mostrar las señales de datos lumínicos.
- Repetir esta secuencia hasta que culmine el proceso del PCR.

### 3.1.3 Estructura detallada de funciones de cada dominio

Es posible continuar con el proceso de abstracción, al descomponer cada dominio en una caja negra. De esta manera, se muestran las funciones relacionadas a cada dominio que servirán para cumplir determinadas tareas.

- **Dominio eléctrico**

En este dominio se llevan a cabo las tareas para proveer la energía eléctrica necesaria a la electrónica de control, sensores y los actuadores.

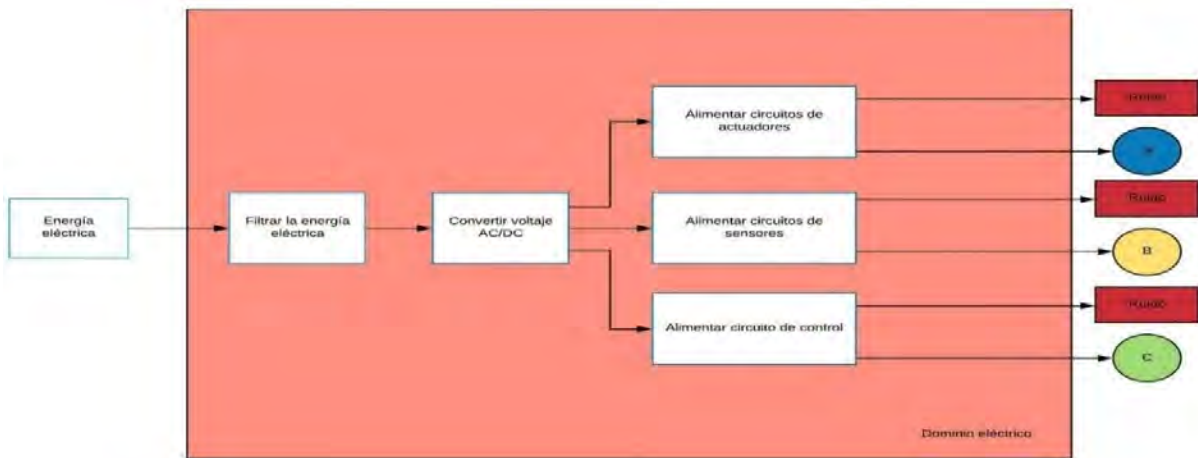


Figura 21: Dominio eléctrico del sistema óptico.

- **Dominio de actuadores y óptico**

En este dominio los actuadores van a recibir energía eléctrica acondicionada y realizarán sus funciones. Por otro lado, las señales lumínicas van a ser filtradas y amplificadas para que sean recibidas por el microcontrolador.

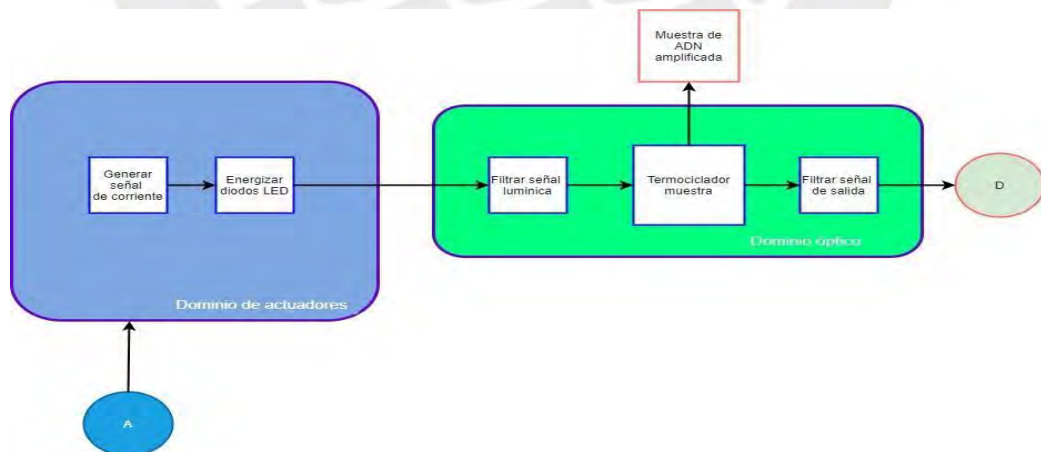


Figura 22: Dominio de actuadores y óptico del sistema óptico.

- **Dominio de sensores y de control**

En este dominio se generan las señales necesarias para controlar que los sensores reciban solo los datos de luminiscencia emitidos por los fluoróforos. Y también trata sobre el funcionamiento de los sensores.

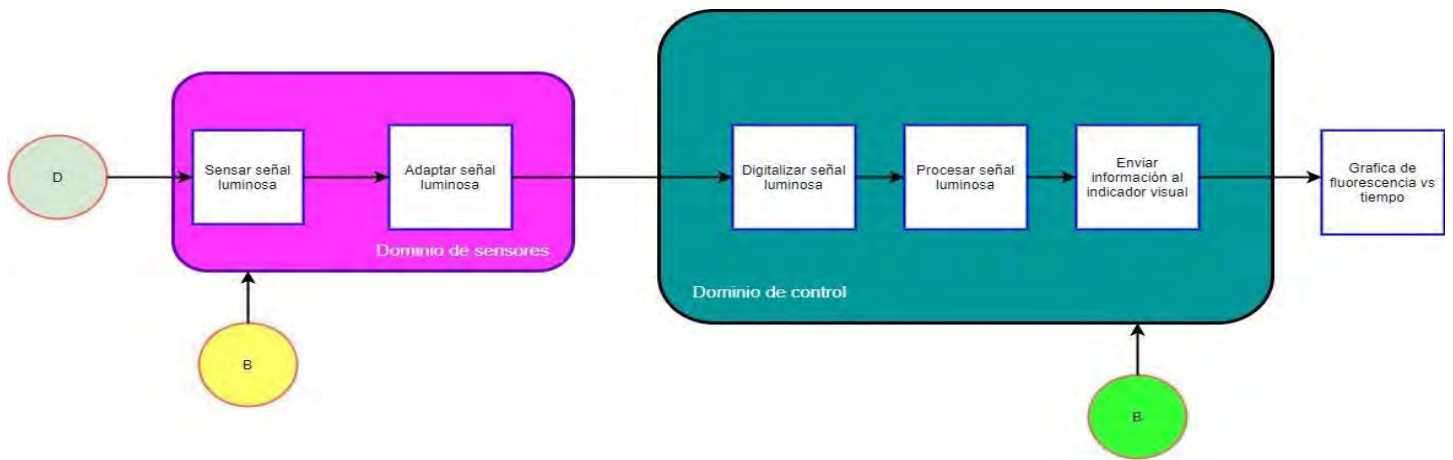


Figura 23: Dominio de sensores y de control del sistema óptico.



### 3.1.4 Estructura de funciones del sistema óptico del termociclador en tiempo real

Teniendo en cuenta la caja negra y los dominios en los cuales se ha dividido esta tesis, se procede a plantear una estructura de funciones que engloba todo lo anteriormente mencionado.

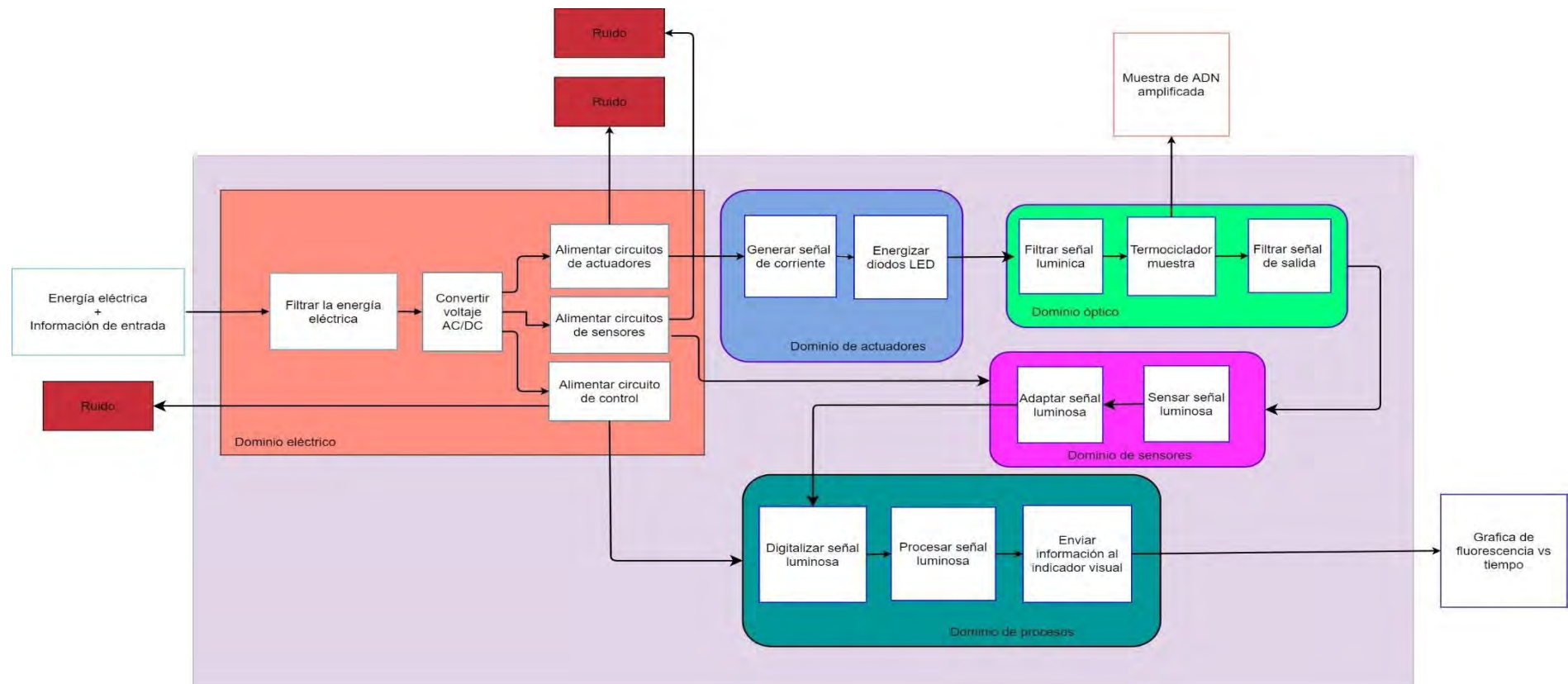


Figura 24: Estructura de funciones del sistema óptico del termociclador en tiempo real.

### 3.2 Elaboración de la alternativa de solución óptima

Una vez que se tiene la estructura de funciones, el siguiente paso es evaluar las posibles soluciones para implementar cada una de las tareas descritas. Posteriormente, estas alternativas deben combinarse para obtener un número de potenciales productos que cumplan con los requerimientos y tengan óptimas prestaciones.

#### 3.2.1 Matriz morfológica

**Tabla 4: Matriz morfológica**

Funciones Parciales	Portadores de funciones		
	Alternativa 1	Alternativa 2	Alternativa 3
Alimentar elementos	Fuente switching	Fuente líneal	
Sensar señal luminosa	Fotodiodo	Tubo de vacío	CMOS
Digitalizar y procesar señal luminosa	Microcomputadora	Microcontrolador	PLC
Indicador visual	Pantalla LED	Pantalla LCD	
Fuente de luz	Diodos	Lampara halógena	
Filtrar señal Luminosa	Filtro polarizador	Filtro dicroico	
Monitorear el ADN	Fluoróforos		
Adaptar señal luminosa	Amplificador de transimpedancia	Integrado convertidor de corriente a voltaje	

#### 3.2.2 Desarrollo de las alternativas de solución

Se procederá a describir las atribuciones de los posibles conceptos de solución desarrollados en la matriz morfológica.

- Alternativa de solución 1 (Color verde)

La temperatura dentro del termociclador será determinada por un termistor, elemento que es parte del prototipo del termociclador PUCP. Las señales del termistor serán leídas por un microcontrolador. Como resultado se generarán señales eléctricas que energicen a los diodos. La luz generada por los diodos pasará por un filtro polarizador logrando que la luz viaje solo en la dirección que se encuentra los microtubos de ensayo. La fluorescencia emitida por los fluoróforos pasará por un filtro polarizador una vez más para garantizar que solo pasen las señales lumínicas con la longitud de onda que deseamos.

El fotodiodo va a detectar señales lumínicas que han pasado por el filtro polarizador y se generará señales eléctricas en forma de corriente. Esta señal pasará por un amplificador de transimpedancia para convertirlo de corriente a voltaje y llevarlo a valores las cuales puedan ser leídos por el microcontrolador.

Luego el microcontrolador va a procesar los datos recibidos para pasar a mostrarse en forma de gráfica en una pantalla LCD.

La alimentación de los componentes estará dada por una fuente de 220V AC las cuales pasarán por fuentes conmutadas para entregarles un voltaje específico.

- Alternativa de solución 2 (Color morado)

En esta alternativa, la temperatura en el interior del termociclador será medida por el termistor del termociclador PUCP. Una vez que el termistor detecte la fase de extensión, esta señal será enviada a la microcomputadora para inicializar el sistema óptico de detección. Una vez iniciado, la microcomputadora va a entregar la energía suficiente para que la lampara halógena pueda emitir señales de luz. La constante luz emitida por la lampara halógena debe pasar por un filtro dicróico para limitar la longitud su longitud de onda y que pasen solo señales con un ancho de banda necesario para la excitación de los fluoróforos.

Las señales lumínicas serán recibidas por el sensor CMOS, pero antes pasarán por un filtro polarizador. El sensor CMOS se encargará de amplificarla las señales lumínicas y entregarlos a la microcomputadora. Una vez en la microcomputadora serán procesadas para crear gráficas uniformes y mostradas posteriormente en una pantalla LED.

Por último, la alimentación de los componentes electrónicos presentes será mediante fuentes lineales.

### 3.2.3 Evaluación técnico-económica

El siguiente paso, de acuerdo con la normativa de diseño referencial, es analizar las alternativas de solución planteadas. Se tomarán en cuenta criterios generales tanto técnicos como económicos. Para la Tabla 3.2 y la Tabla 3.3, G representa el peso ponderado (va de 0 a 3 donde 3 es la caracterización más positiva), P es el valor (va de 0 a 4 donde 4 es el valor que indica mejores prestaciones) y GP es el valor ponderado.

Cabe resaltar que, en el cálculo de los valores técnicos y económicos para cada solución, este parámetro se obtiene al dividir la suma de los valores ponderados entre el producto de la suma de ganancias con la suma de valores ponderados de la solución ideal.

**Tabla 5: Evaluación técnica de los conceptos de solución**

Valor técnico								
N°	Criterios de evaluación	G	Solución 1		Solución 2		Solución Ideal	
			P	GP	P	GP	P	GP
1	Funcionamiento	4	3	12	3	12	4	16
2	Diseño mecánico sencillo	3	2	6	1	3	4	12
3	Uso de energía óptimo	3	3	9	2	6	4	12
4	Velocidad de funcionamiento	3	3	9	3	9	4	12
5	Componentes electrónicos confiables	3	3	9	3	9	4	12
6	Facilidad de uso	3	3	9	3	9	4	12
7	Seguridad	3	3	9	3	9	4	12
8	Lista de exigencias	3	3	9	3	9	4	12
Puntaje máximo		25	23	72	21	66	32	100
Valor técnico			0.72		0.66		1.00	

**Tabla 6: Evaluación económica de los conceptos de solución**

Valor económico								
N°	Criterios de evaluación	G	Solución 1		Solución 2		Solución Ideal	
			P	GP	P	GP	P	GP
1	Número de componentes	2	3	6	2	4	4	8
2	Facilidad de adquisición de los componentes	2	2	4	2	4	4	8
3	Costo de componentes	3	2	6	1	3	4	12
4	Eficiencia energética	3	3	9	2	6	4	12
5	Frecuencia de mantenimiento	2	3	6	2	4	4	8
Puntaje máximo		12	13	31	9	21	20	48
Valor técnico			0.65		0.44		1.00	

Al realizar las tablas con los valores técnicos y económicos de cada solución, se procede a graficar los datos obtenidos para contrastar y comparar ambas alternativas. Visualmente, la alternativa que se ubique más cerca al concepto de solución ideal, será la más óptima para implementarse.



*Figura 25: Comparación de los valores técnicos-económicos de las alternativas de solución*

De la gráfica obtenida anteriormente se infiere que la alternativa 1 es la solución más optima.

### **3.3 Elaboración del diseño definitivo**

#### **3.3.1 Diseño del dominio eléctrico**

Uno de los problemas principales que se encuentra en los sistemas de alimentación usados para aplicaciones de óptica como la microscopia óptica y el sistema óptico de los termocicladores en tiempo real, es el ruido eléctrico. El ruido eléctrico es un factor el que se debe reducir ya que los actuadores que se utilizarán son muy propensos a este problema y necesitan una alimentación constante.

Los actuadores más propensos al ruido eléctrico, que se utilizarán como fuente de excitación de luz para energizar a los componentes que van a monitorear la amplificación (fluoróforos) del ADN cuando se esté desarrollando el proceso del PCR, son los diodos. Los fluoróforos necesitan un espectro de absorción en cual puede ser otorgado por una fuente de luz y puedan emitir fluorescencia. Para el espectro de absorción es necesario que la fuente de luz emita señales lumínicas con longitudes de onda dentro de un rango establecido ya que fuera de ese rango la fluorescencia que puede emitir va decayendo en intensidad hasta el punto de no emitir fluorescencia. Pero si no se incluye un sistema de alimentación que reduzca el ruido eléctrico, la fuente de alimentación utilizado para los diodos emisores de luz pueden variar su valor en el tiempo haciendo que la corriente en ellas varíe y eso puede causar señales lumínicas fuera del rango del espectro de absorción de los fluoróforos y si los fluoróforos no emiten fluorescencia, no se podría monitorear la amplificación del ADN [21].

Por otro lado, el termociclador será alimentado con 220 VAC/60 Hz, por lo cual es necesario añadir componentes que conviertan la señal AC a DC y acondicionar los niveles de voltaje para poder alimentar a todos los componentes electrónicos que se van a incluir en el sistema óptico de detección del termociclador en tiempo como el dominio de control, sensores y actuadores [1].

##### **3.3.1.1 Componente para reducir el ruido eléctrico**

El termociclador, al estar alimentado directamente de una toma de corriente (220 VAC/60 Hz), es sensible al ruido eléctrico provocado por parásitos o por interferencia de otros dispositivos electrónicos. Por este motivo, el primer componente que se debe añadir al sistema de alimentación del termociclador es un filtro de línea.

Los filtros de línea tienen la función de evitar que las señales de alta frecuencia que se generan puedan alcanzar la línea de entrada de corriente y evitar que las señales de

emisión perturbadora del sistema de distribución AC entren en el equipamiento. Entonces, después del filtro de línea tendríamos una alimentación eléctrica más pura.

Para escoger los parámetros del filtro de línea debemos tener en cuenta que, si bien estamos desarrollando el sistema óptico del termociclador en tiempo real, este sistema óptico será acoplado al prototipo funcional del termociclador PUCP desarrollado por el grupo de investigación Equi-LaB, motivo por el cual debemos tener en cuenta el consumo de este equipo.

El prototipo termociclador PUCP, tiene una alimentación de 24V DC y consume una corriente máxima de 16 A. Eso nos da una potencia aproximada de 384 W. Entonces el filtro de línea tiene que soportar un voltaje de entrada de 220 VAC y una potencia mayor a los 384 W, ya que se tiene que considerar la potencia del sistema óptico de detección [1]. Con estos parámetros se escogió un filtro de línea 31.224/3. Este filtro de línea puede soportar una alimentación de entrada hasta los 230 VAC y una corriente nominal de 3 A con lo que nos daría una potencia de entrada de 660 W los cuales son mayores a los 384 W que se requieren dejando un total de 276 W para el sistema óptico de detección, el cual es suficiente ya que está compuesto con elementos que consumen baja potencia [25]. En la siguiente figura, una imagen del filtro de línea a utilizar.



*Figura 26: Filtro de línea 31.224/3 [25].*

### **3.3.1.2 Componente para acondicionar los niveles de voltaje para los actuadores.**

Los actuadores, sensores y sistemas de control necesitan voltajes en el rango de los 5V para su alimentación. Por lo cual, es necesario acondicionar la señal de entrada que son 220VAC a 5 VDC. Pero teniendo en cuenta los circuitos empleados por el prototipo del termociclador PUCP se puede obviar un transformador AC/DC.

El termociclador PUCP utiliza una fuente TDK-Lambda SW600-24, el cual es una fuente conmutada que convierte 220 VAC a 24 VDC [1]. Podemos utilizar la señal de salida de la fuente que utiliza el termociclador PUCP para acondicionar a los niveles de voltajes

que se requieren. Dado que contamos con 24V DC y necesitamos 5V DC se escogió una fuente conmutada LM2576T-5 el cual al ser alimentado con 24V DC nos entrega 5V DC. En la siguiente figura, el circuito del componente LM2576T-5 para convertir 24 V DC A 5V DC. Los valores de los condensadores y el código diodo schottky son recomendaciones del fabricante [26].

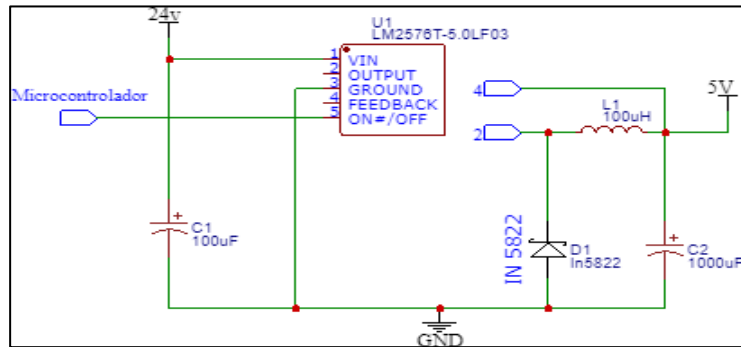


Figura 27: Circuito del LM2576T-V.

### 3.3.1.3 Circuito final del dominio eléctrico

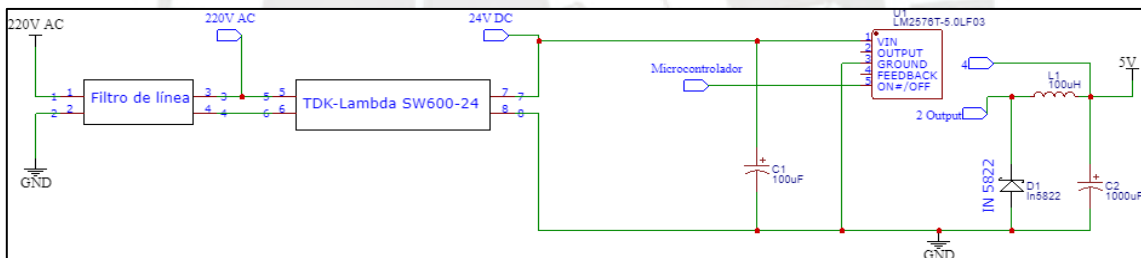


Figura 28: Circuito final del dominio eléctrico.

Se puede observar a la entrada un voltaje de 220V AC que pasa primero por el filtro de línea que filtrará las señales de ruido en la entrada. A su salida también contará con 220V AC el cual será una señal eléctrica más pura y esta a su vez será la alimentación de la fuente TDK-Lambda SW600-24. Finalmente, teniendo los 24V DC a la entrada del LM2576T-5 tendremos a la salida señales eléctricas de 5V DC para alimentar a los componentes que requerimos.

### 3.3.2 Diseño del dominio de óptico y de actuadores

Para el dominio óptico debemos tener en cuenta que fluoróforo se va a escoger debido a que cada fluoróforo tiene parámetros diferentes.

#### 3.3.2.1 Elección del fluoróforo

Como se mencionó en puntos anteriores, los fluoróforos aumentan su fluorescencia a medida que el número aumente el número de réplicas de ADN aumenta. A continuación, una tabla de comparación de las 2 opciones de fluoróforos que se tienen.

**Tabla 7: Fluoróforos con afinidad al ADN y Sondas específicas [24].**

Fluoróforos con afinidad al ADN	Sondas específicas
Se une a las hebras de ADN sin distinguir entre una y otra por lo cual no se puede usar para amplificar varios tipos de ADN a la vez.	Se une a una zona específica del ADN, pero se tiene que usar un tipo de sonda diferente para cada tipo de ADN.
Al presentar afinidad a cualquier tipo de ADN, los costos de funcionamiento son menores.	Permite amplificar varios tipos de ADN a la vez.
Nivel de cuantificación medio.	Alto nivel de cuantificación.
Usado en detección de patógenos.	Usado para expresiones genéticas.

Teniendo en cuenta la tabla anterior, se utiliza para este estudio los fluoróforos con afinidad al ADN, como una primera propuesta de solución debido a que nacionalmente son más accesible que los fluoróforos con sondas específicas, el precio de funcionamiento es menor y como punto más resaltante, es utilizado en ambientes médicos como herramienta de detección de patógenos (diagnóstico de enfermedades infecciosas) [24]. A continuación, en la siguiente imagen se puede apreciar los fluoróforos con afinidad al ADN y su espectro de emisión más utilizados en los termocicladores en tiempo real.

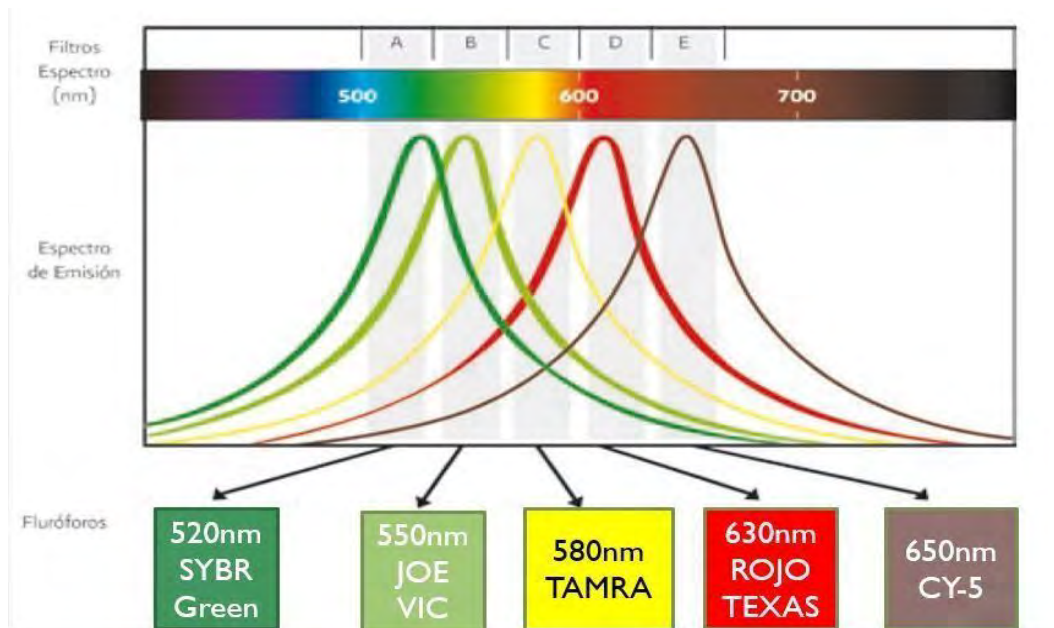


Figura 29: Diferentes fluoróforos y su espectro de emisión de acuerdo a su longitud de onda [2].

De los 5 fluoróforos mostrados en la imagen, el más utilizado es el SYBR Green. Este fluoróforo se une al surco menor del ADN de doble cadena. La unión de estos fluoróforos aumenta a medida que exista un mayor ADN doble cadena. El SYBR Green al ser el más utilizado es el más comercial por ende el más accesible, por tal motivo se selecciona este fluoróforo [24].

Cabe recalcar que este fluoróforo no permite monitorear reacciones múltiples debido a que en estas reacciones se amplifican más de 1 tipo de ADN a la vez. EL SYBR Green se va a unir a todas las cadenas de ADN de doble cadena y va a brindar información la amplificación del ADN en conjunto y no de cada uno en específico. Por tal motivo, se recomienda adquirir muestras con un solo tipo de ADN [2].

### 3.3.2.2 Factores que afectan la intensidad de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia es un factor importante en los diseños del sistema óptico de los termocicladores. Esto se debe a que los sensores que van a detectar las señales lumínicas, en este caso las señales de fluorescencia, detectan la intensidad de radiación que se emite por parte de los fluoróforos. Entonces a mayor intensidad de radiación, mejor será la lectura de los sensores, brindando mejores resultados. Los factores que afectan la intensidad de radiación son la intensidad del haz absorbido por el sistema, la ley del cuadrado inverso y el espectro de absorción y emisión [27].

- **Intensidad de luz absorbida por el sistema y ley del cuadrado inverso**

La siguiente ecuación:

$$I_f = k(I_0 - I)$$

$I_f$  = Intensidad de fluorescencia.

$K'$  = Constante de eficiencia cuántica.

$I_0$  = Intensidad del haz de excitación.

$I$  = Pérdidas de intensidad por la distancia.

Esta ecuación nos indica que la intensidad de emisión de la fluorescencia es proporcional a la intensidad de radiación de la fuente de excitación, en nuestro caso los diodos de emisión de luz. Por lo cual, para tener mayor intensidad de fluorescencia, se debe tener en cuenta para el diseño que la fuente de luz debe brindar alta intensidad de luz.

Por otro lado, la ley del inverso cuadrado explica las pérdidas de intensidad por la distancia. Esta ley indica que a medida que vamos alejando la fuente de luz del lugar que se quiere iluminar, en este caso los fluoróforos, la intensidad va disminuyendo. Entonces para evitar pérdidas de intensidad de radiación se debe colocar la fuente de luz a una distancia apropiada.

- **Espectro de absorción y de emisión**

Un espectro se puede definir como una gráfica de la intensidad de radiación emitida o absorbida por un fluoróforo en función de su longitud de onda.

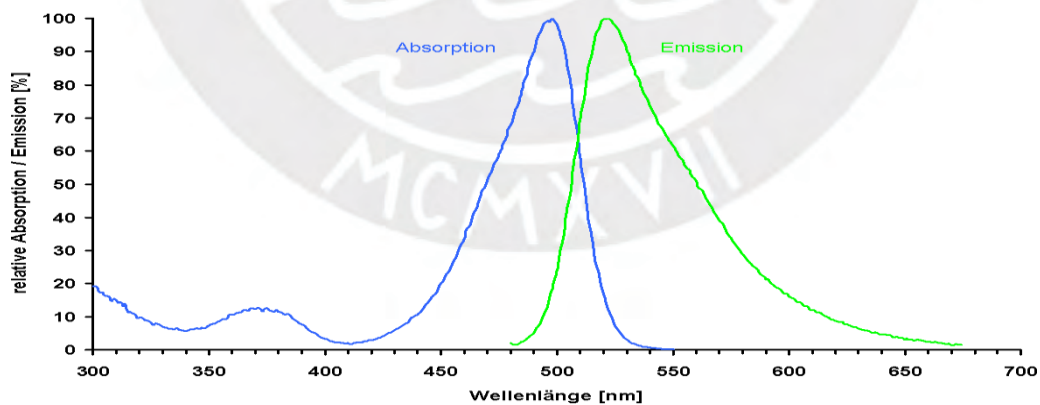


Figura 30: Espectro de emisión y absorción del SYBR GREEN [28].

En la figura 30, se puede observar el espectro de absorción y emisión del fluoróforo SYBR GREEN. Lo que se puede interpretar de ese gráfico es que el fluoróforo SYBR GREEN emitirá la máxima fluorescencia con una longitud de onda de 520 nm. Pero para que puede emitir esa fluorescencia a esa longitud de onda, debe ser excitado con una fuente

de luz que emita luminiscencia con una longitud de onda de 480 nm. A medida que se va alejando de los valores establecidos la intensidad de emisión va disminuyendo. Por lo cual, para la fuente de luz, basándonos en el gráfico, se propone un rango de emisión de luz con longitudes de onda que varíen entre los 465nm hasta los 495nm. En este rango de fuentes de luz con estas longitudes de onda, la intensidad de emisión de fluorescencia va desde el 60 al 100% de su máxima valor.

### 3.3.2.3 Elección del actuador

Como se especificó anteriormente, el espectro de absorción del fluoróforo SYBR GREEN está en un rango de 465nm hasta los 495nm. Por lo cual, la fuente de luz debe de ser capaz de emitir señales de luz con esa longitud de onda. De la matriz morfológica se escogió a los diodos como fuente de luz

Existen 2 tipos de diodos que emiten luz, los diodos LED y los diodos laser. Los diodos laser poseen mayor precisión en la longitud de onda y posee mayor eficiencia óptica. Pero los diodos LED son más baratos, la potencia de salida es mucho menor a la de los diodos laser y la vida útil es mayor por lo que no se necesitará estar cambiando periódicamente el componente. Para este proyecto, se escogió un diodo LED código LED470L con las siguientes características.

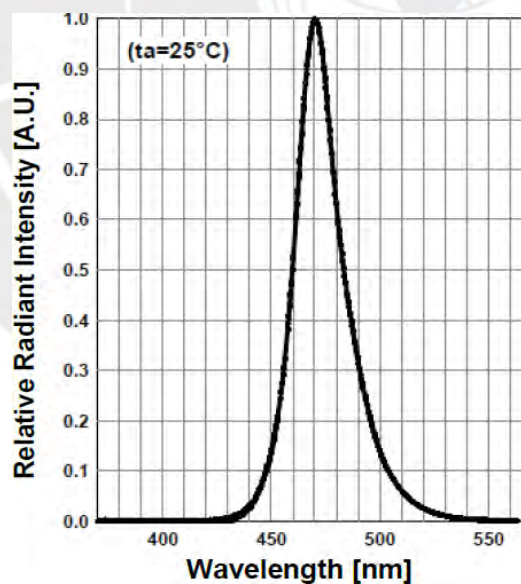


Figura 31: Espectro de intensidad del diodo LED470L [30].

La emisión de luz del diodo LED está centrado en 470nm lo cual se encuentra dentro del rango establecido para el espectro de absorción del fluoróforo SYBR GREEN. Por otro lado, para tener la máxima intensidad de emisión para aumentar la fluorescencia se tiene la siguiente figura.

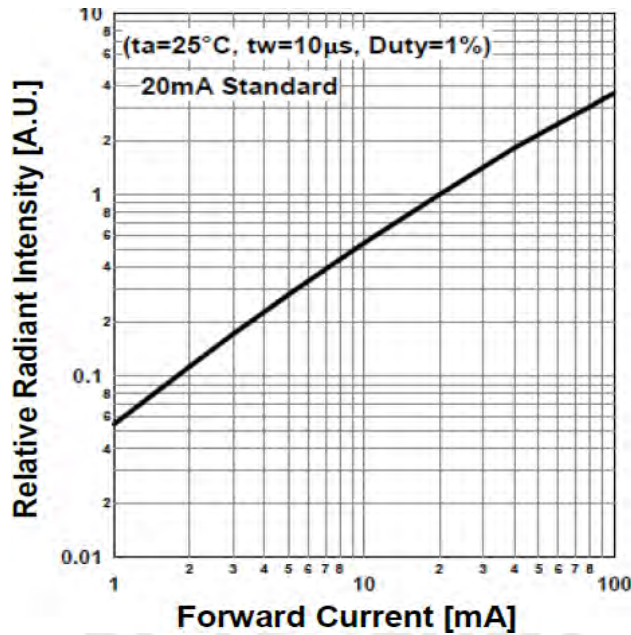


Figura 32: Gráfica de corriente vs intensidad relativa [30].

Se puede observar de la figura 32 que, a partir de los 20 mA, la intensidad relativa emitida por el diodo LED470L empieza a aumentar, por lo que para su diseño es necesario asegurar que la corriente que pase por el diodo LED sea 20 mA o mayor a este valor.

### 3.3.2.4 Circuito final del dominio de actuadores

Como se mencionó en el punto anterior, se requiere un nivel de corriente específico para los diodos LED. Si ese nivel de corriente sufre variaciones, estas variaciones de corriente generarán cambios en la intensidad de radiación de luz. Por otro lado, por cada microtubo de termociclador tiene que haber un diodo led como fuente de excitación de los fluoróforos. Teniendo en cuenta estas 2 problemáticas, se ha escogido el circuito LM3528.

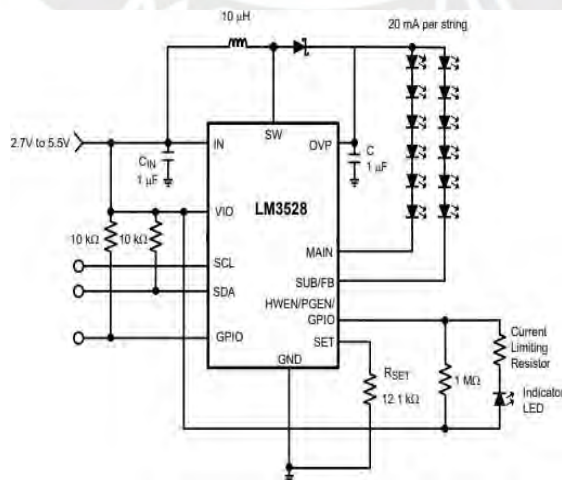


Figura 33: Conexiones recomendadas del integrado LM3528 [31].

Este circuito posee 2 canales en los cuales puede entregar un voltaje máximo de 20V con una corriente constante de 20 mA. Cada diodo LED470L tiene una caída de voltaje de 3.2 V. Por lo que se podría poner 6 de estos diodos por cada canal, teniendo así una capacidad de 12 diodos LED. Teniendo en cuenta el número de microtubos de termociclador que posee el termociclador PUCP, una cifra de 12 diodos LED es una cifra aceptable.

### 3.3.3 Diseño del dominio de sensores y de procesos

#### 3.3.3.1 Elección del fotodiodo

Los fotodiodos son los encargados de transformar las señales lumínicas en señales de eléctricas, específicamente en corriente. La corriente producida por los sensores se puede calcular de la siguiente ecuación [32]:

$$I_p = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} A_{chip} \cdot S_{chip}(\lambda) * E_{source}(\lambda) d\lambda \quad \dots (1)$$

$I_p$  = Corriente del fotodiodo (A).

A = Área activa del fotodiodo ( $mm^2$ ).

S = Responsividad ( $\frac{A}{W}$ ).

E = Irradiancia Espectral ( $\frac{mW}{cm^2 * nm^2}$ ).

Pero si tenemos en cuenta que solo se va a trabajar con señales de luz dentro del rango visible (380 a 750 nm), se puede reducir esa expresión a la siguiente expresión.

$$I_p = A_{chip} * S_{chip} * E_{\lambda} * 10,000 \quad \dots (2)$$

Lo reducimos más aún para tener la corriente en variables eléctricas más utilizadas.

$$I_p = S * P \quad \dots (3)$$

$I_p$  = Corriente del fotodiodo (A).

S = Responsividad ( $\frac{A}{W}$ ).

P = Potencia de incidencia de la luz (W).

Como el espectro de emisión del fluoróforo SYBR GREEN está centrado en 520 nm. Es necesario que el fotodiodo a escoger pueda detectar señales de luz con esa longitud de onda. Por lo cual, se ha escogido el fotodiodo FDS100 el cual puede detectar señales de luz en un rango de 350nm hasta los 1100nm.

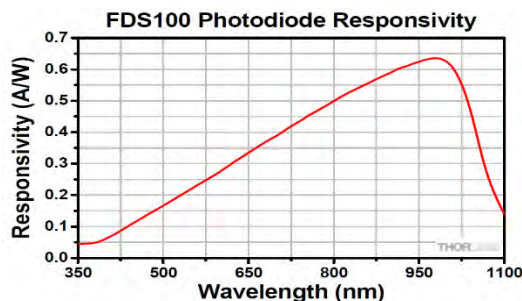


Figura 34: Responsividad vs Longitud de onda [33]

Se puede observar en la figura 34 que con la longitud de onda de 520nm la responsividad del fotodiodo es de  $0.2 \frac{A}{W}$ , siendo este valor la sensibilidad del fotodiodo.

### 3.3.3.2 Circuito final del dominio de sensores

El fotodiodo FDS100 va a registrar las señales de fluorescencia y las convertirá en señales eléctricas, específicamente en corriente. Por ello, es necesario incluir un amplificador de transimpedancia como la figura 8 [21]. Con este amplificador se convertirá la corriente registrada por el fotodiodo a voltaje y será elevada hasta un rango que pueda leer el microcontrolador para poder procesar la información.

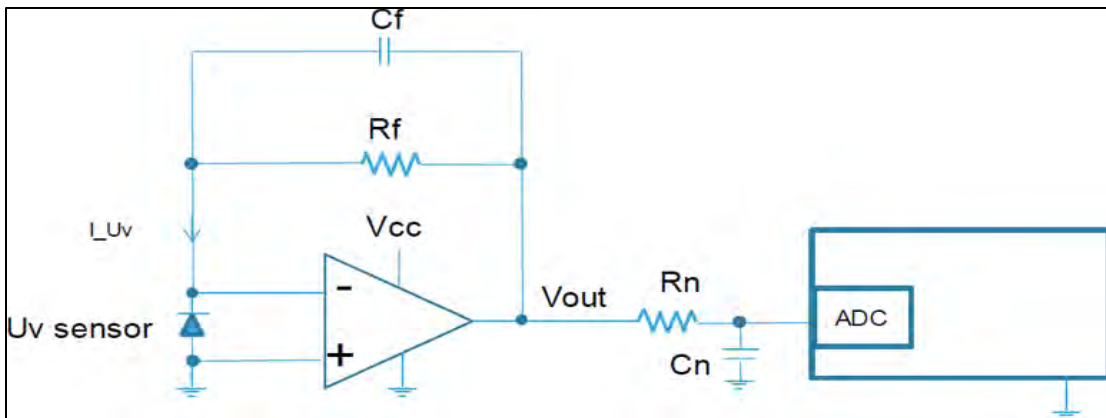


Figura 35: Amplificador de transimpedancia [34].

Para el diseño del amplificador de transimpedancia primero se debe seleccionar el amplificador operacional específico.

Como requerimiento del amplificador operacional, este debe tener una tensión de alimentación de 5v los cuales serán brindados por el dominio de energía. Luego, como los niveles de fluorescencia van a seguir un crecimiento exponencial a medida que los amplicones de ADN se van replicando, es necesario que el amplificador operacional sea de característica *rail to rail* ya que la corriente que va a emitir el fotodiodo es proporcional al nivel de fluorescencia. De esta manera, el voltaje a la salida del amplificador operacional será cercano a la alimentación de salida. Con lo anterior mencionado, se escogió un amplificador operacional de código OA1MPA. Este operacional puede tener una alimentación máxima de 6v, característica rail to rail con un VOH de 80 mV por lo que a la salida se tendría un voltaje máximo de 4.92 V.

La ganancia del amplificador viene dada por la resistencia Rf. Para hallar calcular la ganancia, es necesario primero saber la resolución del microcontrolador (Arduino Uno para pruebas) y el rango de corrientes del fotodiodo en las etapas iniciales.

$$R_{ADC} = \frac{5}{2^{10}} = 4.88mV$$
$$R_f = \frac{4.88mV}{2nA} = 2.44M$$

La resolución del ADC sería los 5V de alimentación entre los 11 bits de resolución del microcontrolador lo que nos da 4.88mV los cuales es el valor mínimo que va a detectar el microcontrolador. Luego se tiene que dividir este valor entre la corriente que detecta el fotodiodo. De acuerdo a la literatura, la potencia óptica de los fluoróforos está en el rango de los nano Watts [34]. Poniendo de ejemplo 10 nW y la responsividad de 0.2 AW del fotodiodo FDS100, se tendría 2nA. Al final el valor de la ganancia es de 2.44MΩ. Lo que indica que la ganancia del amplificador está en el rango de los mega ohm. El valor de 2.44MΩ se ajustará a medida que se tomen las pruebas necesarias.

### **3.3.3.3 Elección del microcontrolador**

Para elegir el microcontrolador, se debe tener en cuenta la frecuencia de muestreo de las señales de fluorescencia de los fluoróforos. Para lo cual, se emplea la siguiente información obtenida de los ensayos realizados del termociclador PUCP respecto a los tiempos que demora el proceso del PCR.

Todo el proceso del PCR se dio en 1 hora con 20 minutos divididos en:

5. a Desnaturalización inicial 95 °C por 5 min.

5. b (35 Ciclos)

Desnaturalización 95 °C por 30 segundos.

Hibridación 60 °C por 30 segundos.

Extensión 72 °C pro 30 segundos.

5. c Extensión final 72 °C por 5 minutos.

Y 17 minutos de preparación. Por lo que cada ciclo de PCR demora 90 segundos y es en cada ciclo donde el ADN se replica. Entonces, en cada ciclo debe muestrearse la fluorescencia. Con 1000 muestras de fluorescencia en cada ciclo de PCR se tendría una tendrían los valores necesarios para establecer un promedio de fluorescencia del ciclo. Lo que implica que no se necesita un microcontrolador con alta frecuencia de muestreo ya que con una frecuencia de muestreo de 12 Hz se pude obtener las 1000 muestras requeridas por ciclo. Para las pruebas realizas en este proyecto se usará el microcontrolador Arduino UNO.

### **3.3.3.4 Diseño final del sistema óptico de detección.**

Teniendo en cuenta los criterios anteriormente expuestos se desarrolló un diseño del sistema óptico de detección.

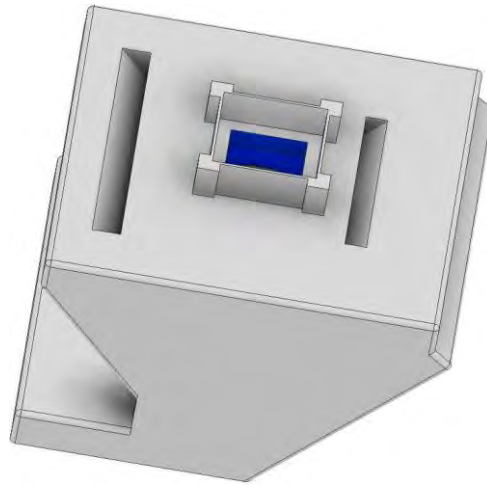


Figura 36: Sistema óptico 3D.

En la parte superior se puede observar una zona azul. Esta zona corresponde a la parte del reactivo que ira colocada dentro de los microtubos de ensayo del termociclador, en el lateral izquierdo irán colocados la fuente de luz ( los diodos LED) y en el lateral derecho el fotodiodo que captará la fluorescencia emitida de la reacción de PCR ante la fuente de luz.

En la figura 37, se tiene una mejor vista del diseño final del sistema óptico de detección.

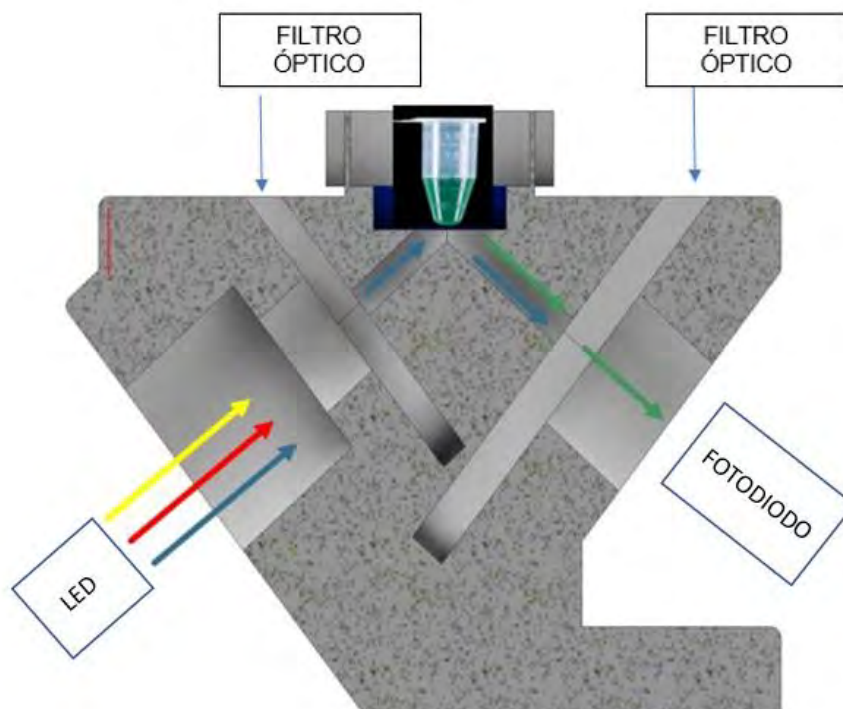
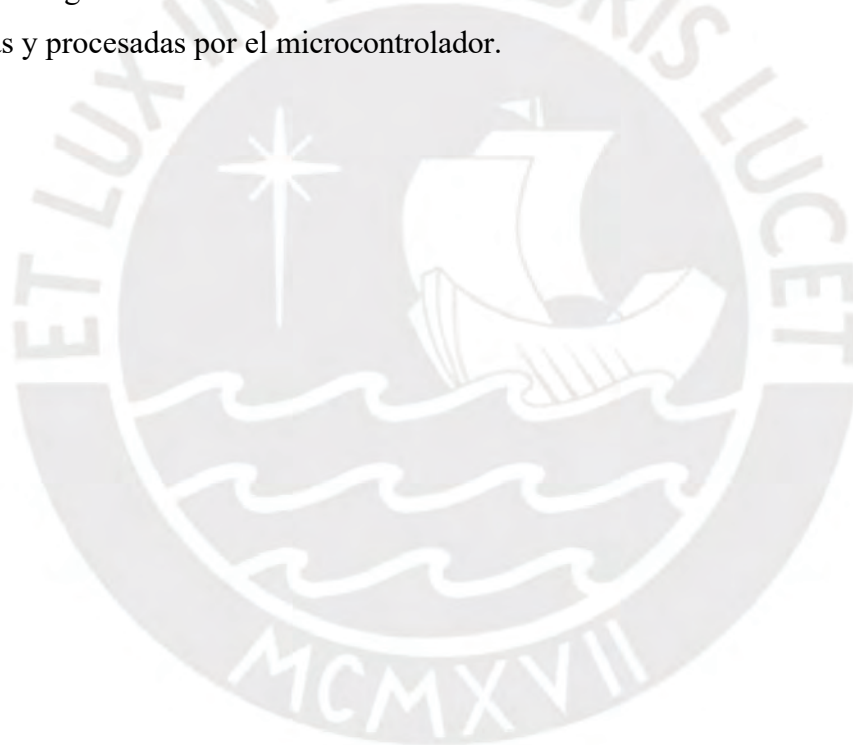


Figura 37: Sistema óptico vista frontal.

Se puede observar que el diodo led emitirá luz con una longitud de onda correspondiente al color azul, pero debido a la interferencia de otras luces, no será la única señal de luz que entrará al sistema por lo cual, en las rendijas correspondientes a los filtros, serán colocados filtros ópticos que solo permitirán pasar señales de luz con la longitud de onda que brinde el diodo LED. Luego estas señales de luz van a llegar a los microtubos de ensayo y excitarán a los fluoróforos. Los fluoróforos al ser excitados van a empezar a emitir fluorescencia las cuales serán detectadas por el fotodiodo. El diodo led y el fotodiodo están colocados con una diferencia de ángulos de 90 grados para evitar que el fotodiodo reciba señales de luz directamente del diodo LED. Pero debido a la refracción, algunas señales de luz van a rebotar hacia el fotodiodo por lo cual es necesario añadir otro filtro óptico para que el fotodiodo reciba señales de luz solamente de la emisión del fluoróforo. Luego el fotodiodo convertirá estas señales de luz a señales eléctricas que serán leídas y procesadas por el microcontrolador.



## **CAPITULO 4: PRUEBAS Y EVALUACIÓN DEL DISEÑO DESARROLLADO.**

En este último capítulo se presentan las pruebas experimentales utilizando el modelo óptico experimental implemento en la figura 37 con el objetivo de analizar el crecimiento proporcional de la fluorescencia al replicarse el ADN en cada ciclo del PCR.

Los resultados incluyen comparar los parámetros lumínicos en la fase de elongación del PCR, evaluar los márgenes de error y si la tendencia corresponde a una curva exponencial mencionada en el estado del arte de esta tesis.

### **4.1 Validación del sistema óptico**

Para el sistema óptico, el elemento que se usa para el monitorio de la amplificación del ADN es el fluoróforo, específicamente el fluoróforo SYBR GREEN. Pero debido a las condiciones actuales, no es posible tener acceso a este elemento, ya que requiere estar en un ambiente de laboratorio controlado. Motivo por el cual, para simular el comportamiento del sistema óptico se debe usar un material con características similares al fluoróforo escogido.

#### **4.1.1 Análisis del tinte fluorescente**

El tinte seleccionado para las pruebas correspondientes es la tinta de los marcadores con tinta fluorescente o comúnmente llamado “resaltadores”. Al combinar la tinta de estos marcadores con agua, proporciona un líquido con características fluorescentes. En la figura 39 se puede observar el líquido fluorescente.



*Figura 38: Líquido fluorescente*

Una de las principales características del fluoróforo SYBR GREEN es su espectro de absorción y de emisión, el cual se puede observar en la figura 39.

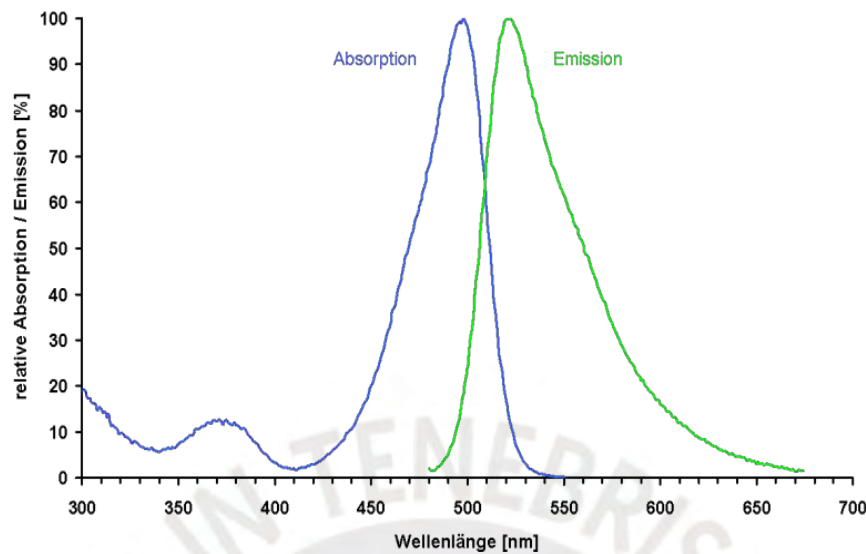


Figura 39: Espectro de emisión y absorción del SYBR GREEN [28].

Como ya se mencionó en capítulos anteriores, los fluoróforos necesitan una fuente de luz que les brinde la energía para poder generar fluorescencia. Lo que podemos observar en la gráfica es que cuando el fluoróforo recibe una señal de luz de una respectiva longitud de onda, emitirá fluorescencia de un color correspondiente a una longitud de onda de mayor dimensión. Las gráficas de absorción y emisión son gráficas recíprocas lo cual indica que, si queremos saber con qué longitud de onda emitirá fluorescencia respecto a una longitud de onda de absorción, tenemos que marcar una línea horizontal desde el punto donde corresponde la longitud de onda absorción y ver a que punto de la curva de emisión llega. El tinte a escoger para las pruebas, debe respetar el espectro de absorción y de emisión.

#### 4.1.2 Pruebas del tinte a diferentes longitudes de ondas de luz

Para comprobar si el tinte seleccionado tiene las características de fluorescencia del fluoróforo SYBR GREEN, se expuso el tinte a diferentes haces de luz con diferentes longitudes de onda. En la figura 40 se puede observar una fuente de luz emitida por el diodo LED hacia el tinte fluorescente, con una longitud de onda que le corresponde al color azul. Este experimento se realizó con 2 diodos LED adicionales de diferentes longitudes de onda como fuente de luz y las pruebas se realizaron en un ambiente con poca luz debido a que los reactivos del proceso del PCR se encontrarán en un ambiente cerrado.



Figura 40: Pruebas a diferentes longitudes de onda.

Los 3 diodos LEDS fueron de los colores siguientes: azul, verde y violeta. Teniendo como referencia la tabla 8, podemos ver los rangos de longitud de onda y frecuencia de los colores seleccionados.

**Tabla 8: Rango del espectro de frecuencias y longitudes de ondas correspondiente a la luz visible.**

Color	Frecuencia	Longitud de onda
Violeta	[668 ~ 789] THz	[380 ~ 450] nm
Azul	[631 ~ 668] THz	[450 ~ 490] nm
Verde	[526 ~ 606] THz	[520 ~ 570] nm
Amarillo	[508 ~ 526] THz	[570 ~ 590] nm
Naranja	[484 ~ 508] THz	[590 ~ 620] nm
Rojo	[400 ~ 484] THz	[620 ~ 750] nm

De la gráfica 39 del espectro de absorción y emisión se puede ver que si usamos una fuente de luz con una longitud de onda que corresponde al color azul, emitirá fluorescencia con una longitud de onda referentes al color verde. En la siguiente figura se puede observar de forma más detallada.

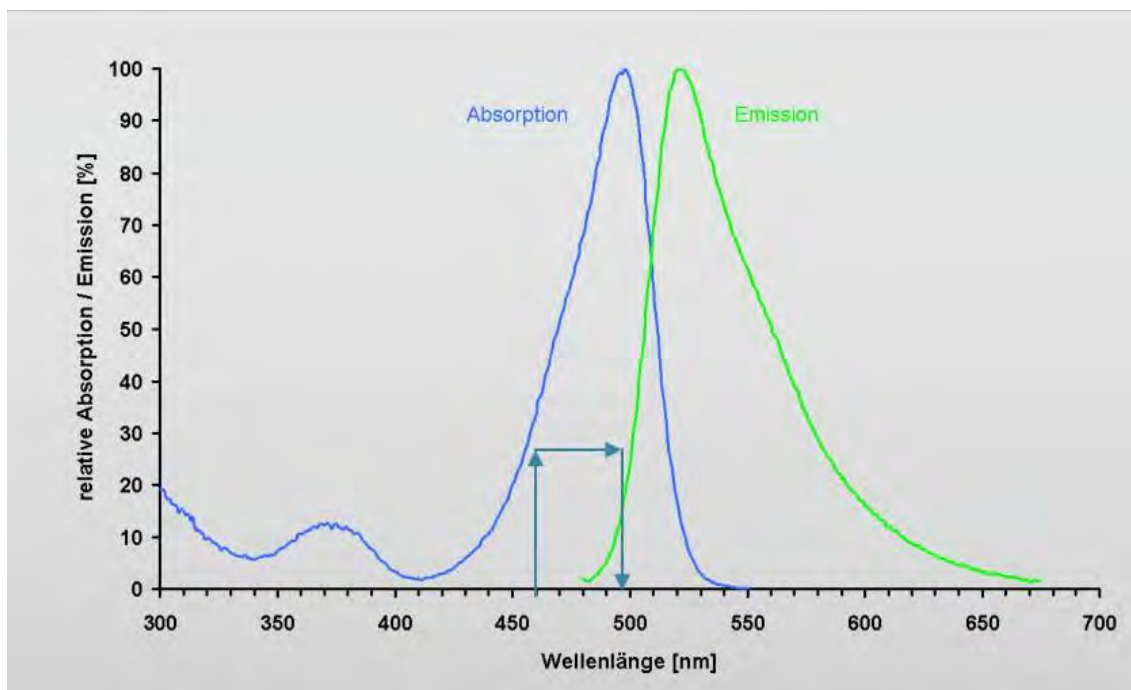
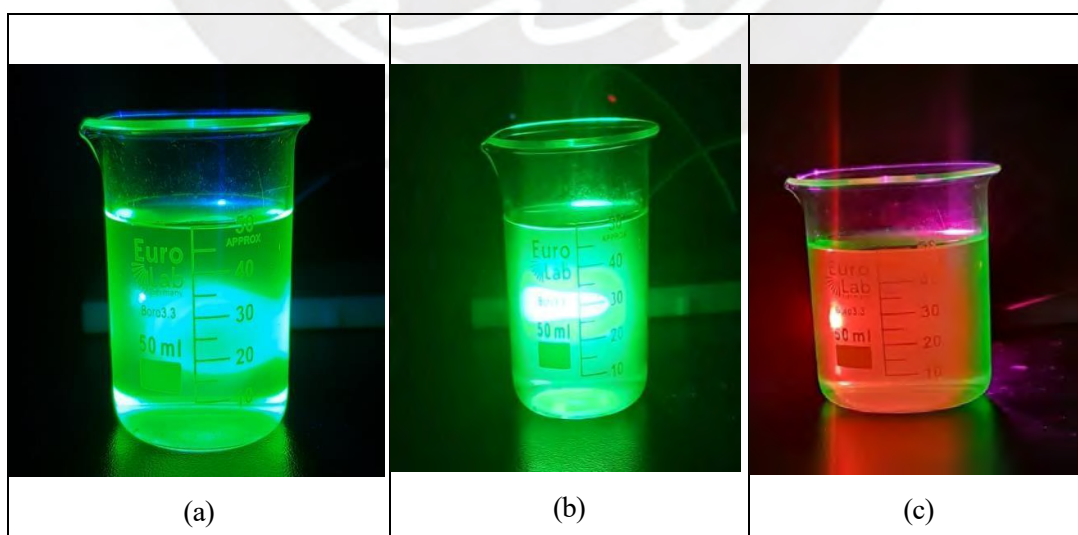


Figura 41: Pruebas a diferentes longitudes de onda [28].

La longitud de onda de la luz azul está en un rango de los 450 a 475 nm, tomando como referencia una longitud de onda de 460nm, se marca una recta horizontal respecto a esa longitud de onda, existe una intersección en la curva del espectro de emisión a una señal de luz de longitud de onda aproximadamente de 500 nm que corresponde al color verde. De la misma manera se analizó la gráfica para los colores verde y violeta dando como resultado que deben emitir fluorescencia del color verde y rojo respectivamente.

Tabla 9: Respuesta del tinte a longitudes de onda del color azul(a), verde(b) y violeta(c).



En la tabla 9, se puede observar como el tinte cumple con el espectro de emisión y

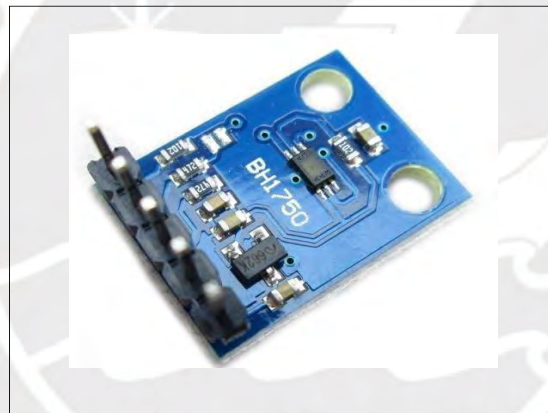
absorción del fluoróforo SYSBR GREEN ya que al excitarlo con longitudes de onda referentes al color azul, verde y violeta nos brinda fluorescencia con longitudes de onda respectivos al color rojo en caso del color violeta y verde en el caso del color verde y azul. Pero, en la gráfica de la figura 40 también se pudo observar que otra de las características del fluoróforo SYSBR GREEN es que atenúa la intensidad de fluorescencia que se alejen de su punto de máxima intensidad de fluorescencia que corresponde a los 490 nm, mientras que el tinte sigue emitiendo a alta intensidad para colores alejados de los 490 nm. Para las pruebas se utilizará el diodo LED de color azul que esta más próximo a los 490 nm ya que cerca a este valor de longitud de onda, la intensidad es del 100%.

#### **4.2 Validación del dominio de sensores**

El dominio de sensores corresponde a medir y adaptar las señales de luz correspondiente a la fluorescencia del fluoróforo, en este caso el tinte.

##### **4.2.1 Pruebas del dominio de sensores**

Para la simulación de las pruebas del dominio de sensores se utilizó el integrado BH1750.



*Figura 42: Circuito BH1750.*

Este circuito tiene la facultad de recibir señales lumínicas y calcular su equivalente en la unidad de lux (lx). Se utiliza este circuito ya que su diagrama esquemático tiene gran similitud al diagrama del dominio de sensores que se plateó en el capítulo anterior.

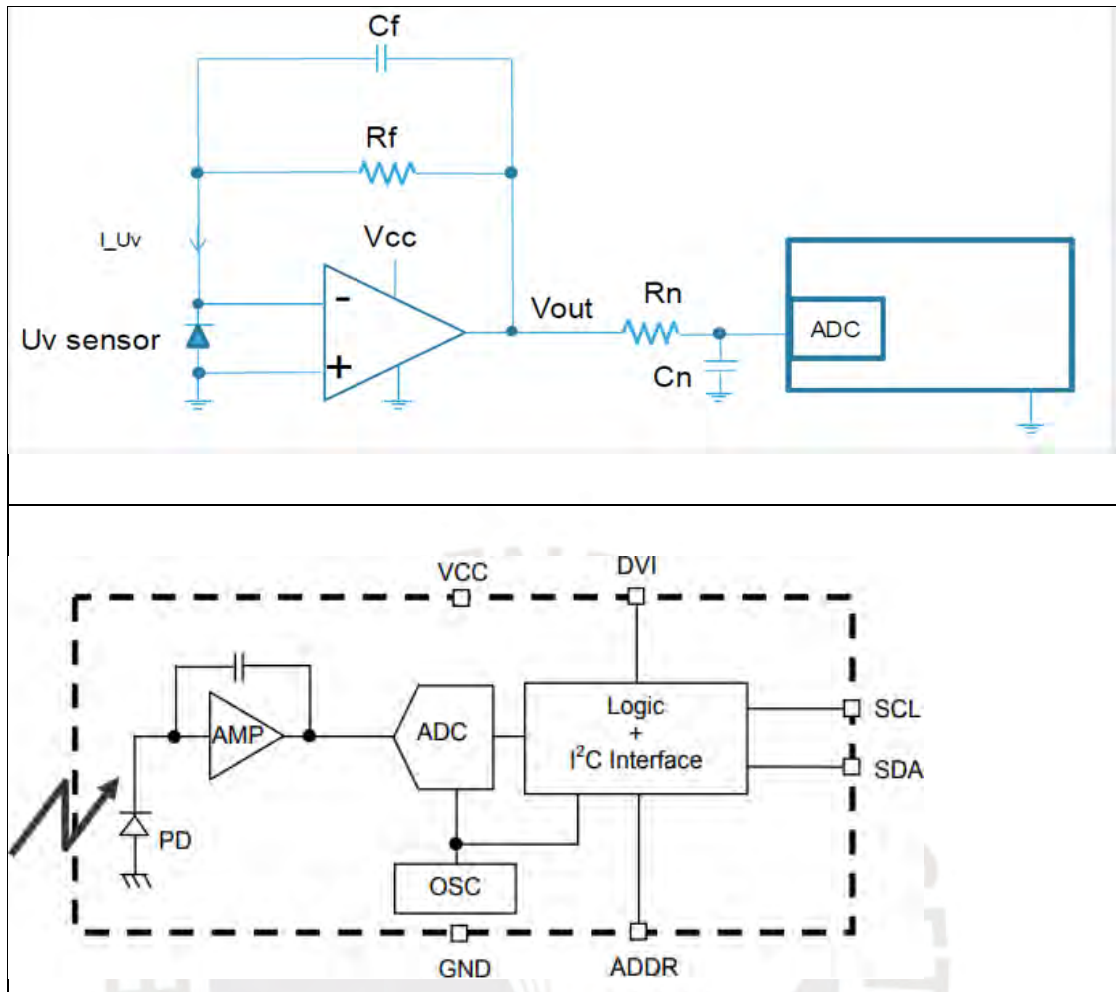
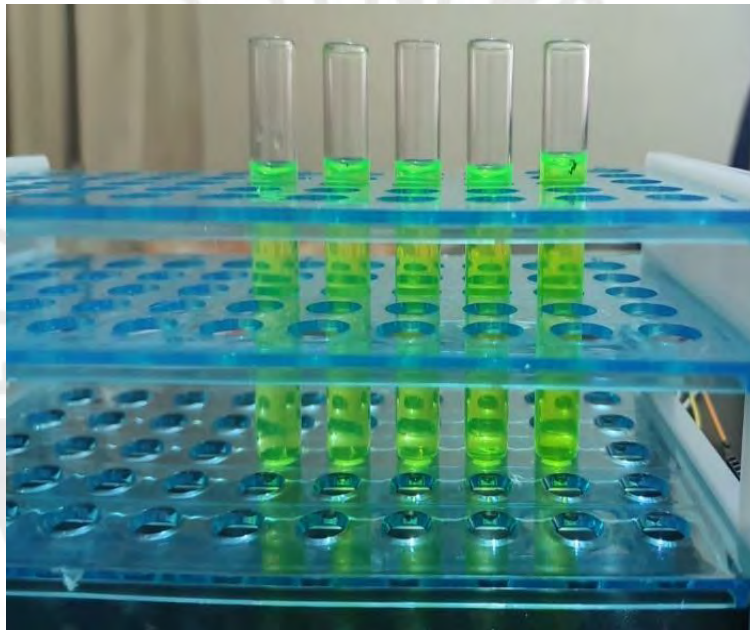


Figura 43: Diagrama esquemático del dominio de sensores (imagen superior) y diagrama esquemático del circuito BH1750 (imagen inferior).

En la figura 3 se puede observar la similitud que presente en ambos diagramas esquemáticos, por parte del dominio de sensores se tiene un fotodiodo que convierte las señales lumínicas en corriente para luego pasar por un amplificador de transimpedancia que convierte la corriente a voltaje, seguido de un filtro y por último al ADC del microcontrolador. Por parte del del circuito BH1750 se tiene que después del ADC se presenta una lógica que se encarga de establecer que valor de lux corresponde al voltaje obtenido por el amplificador de transimpedancia y una interfaz I2C para la comunicación con el microcontrolador. Si bien el propósito de esta tesis es mostrar las señales de fluorescencia en voltios vs el tiempo, con el circuito BH1750 se puede obtener gráficas de lux vs tiempo, pero teniendo en cuenta que a mayor cantidad de luxs implica que el fotodiodo del circuito está captando mayores señales de intensidad de luz lo cual se representa eléctricamente como mayor voltaje, habiendo así una relación directamente proporcional entre los luxs y los voltios.

Por otro lado, en los capítulos anteriores se mencionó que la técnica de PCR está diseñada para amplificar el número de ADN. Para ello se coloca muestras de ADN junto con reactivos para su amplificación y fluoróforos para su monitoreo, dentro de los microtubos de termociclador. Los fluoróforos emiten fluorescencia cuando se unen a las hebras doble hélice del ADN por lo cual, al inicio del proceso del PCR, el número de ADN es muy bajo por lo cual la fluorescencia es baja. Pero a medida que el proceso del PCR se va desarrollando, el número de amplicones de ADN empiezan a aumentar combinándose con los fluoróforos y aumentando la fluorescencia.

Debido a que no se puede tener acceso a los laboratorios, por ende, no se puede tener acceso al termociclador, para simular el comportamiento anteriormente mencionado se ha utilizado el tinte seleccionado y agua, de la siguiente manera.



*Figura 44: Tubos de ensayo con el tinte fluorescente.*

En la figura 44 se puede observar 5 tubos de ensayo, de izquierda a derecha los tubos de ensayo están distribuidos de la siguiente manera:

- 1Tubo de Ensayo:1 ml de tinte y 4ml de agua.
- 2Tubo de Ensayo:2 ml de tinte y 3ml de agua.
- 3Tubo de Ensayo:3 ml de tinte y 2ml de agua.
- 4Tubo de Ensayo:4 ml de tinte y 1ml de agua.
- 5Tubo de Ensayo:5 ml de tinte.

Al aumentar el número de amplicones de ADN, los fluoróforos libres, tienen a donde poder unirse. Entonces, se utilizó el tinte para simular el comportamiento del fluoróforos que se unieron con el ADN, mientras que se utilizó el agua para simular el

comportamiento de fluoróforos que están esperando que se amplifique el ADN para poder unirse. Al inicio del proceso del PCR existe poco ADN por lo cual pocas uniones de fluoróforos con el ADN y los fluoróforos que no están unidos al ADN abundan, en otros términos, habrá poca presencia de tinte y más de agua. Pero mientras el proceso del PCR se desarrolló, aumentará el número de uniones de fluoróforos y ADN, es decir aumentará la presencia de tinte respecto al agua en los tubos de ensayo. Al final, cuando se acabe el reactivo para la amplificación del ADN, todo el ADN amplificado presentará uniones con los fluoróforos lo cual se representa como el tubo de ensayo relleno completamente de tinte.

#### 4.2.2 Pruebas del tinte frente a una fuente de luz de intensidad variable

Del capítulo anterior, se tiene la siguiente ecuación: La siguiente ecuación:

$$I_f = k(I_0 - I) \quad \dots (4)$$

$I_f$  = Intensidad de fluorescencia.

$k'$  = Constante de eficiencia cuántica.

$I_0$  = Intensidad del haz de excitación.

$I$  = Pérdidas de intensidad por la distancia.

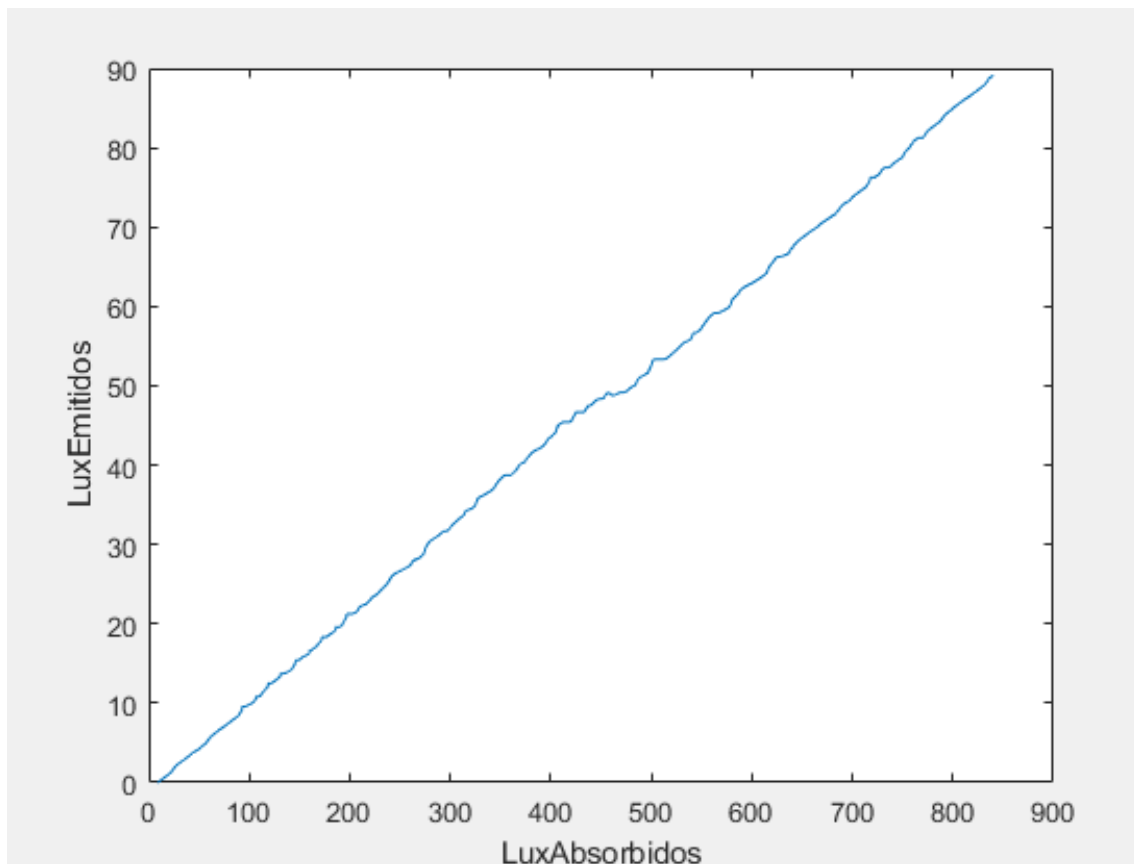
La relación entre fluorescencia emitida por el fluoróforo y la intensidad de luz de la fuente de emisión sigue una gráfica lineal de primer orden.

Para las pruebas del tinte frente a una fuente de luz de intensidad de variable, se utilizó como fuente de luz el diodo LED y se aplicó una señal de alimentación PWM generada por el microcontrolador Arduino.

La señal PWM está controlada por un contador el cual varía desde 0 hasta 255, siendo 0 referente a una señal de duty cycle de 0% y 255 con un duty cycle del 100%.

Luego, esa fuente de luz fue expuesta al tinte ubicado dentro del vaso de precipitado como en la figura 41 y el circuito BH1750 fue ubicado en la parte superior del vaso de precipitado, de esta forma se reduce que el circuito detecte fuentes de luminiscencia ajenas a la fluorescencia del tinte.

Para la gráfica a construir, se midió la cantidad de lux que emite el diodo LED a lo largo de la variación de la señal PWM y la señal de emisión de fluorescencia del tinte también en lux con un periodo de muestreo de 100ms por cada variación del contador que controla el PWM. Los resultados se pudieron observar en el monitor serial del Arduino y se obtuvo los datos y estos datos fueron exportados a la plataforma Matlab para hacer las gráficas requeridas, obteniendo lo siguiente:



*Figura 45: Gráfica en luxs absorbidos por el tinte vs luxs emitidos por el tinte frente a una señal PWM.*

Se puede observar que la gráfica tiene un comportamiento lineal de primer orden lo cual cumple con lo explicado teóricamente. Por lo cual se puede concluir que a medida que aumenta la intensidad de luz de la fuente de excitación, aumenta la intensidad de fluorescencia del tinte fluorescente. Por lo cual, para tener la mayor sensibilidad en el sistema óptico de detección se ha diseñado el circuito de alimentación del diodo emisor de luz para que entregue la máxima intensidad de luz y esto está relacionado con la corriente.

Para obtener los datos eléctricos de voltaje y corriente del diodo emisor de luz, se puso en serie una resistencia de 100 Ohm para que la caída de voltaje sea mínima y poder obtener la corriente de forma más sencilla utilizando la ley de Ohm. En la siguiente figura se puede observar el circuito eléctrico de alimentación del diodo led y la resistencia en serie, el voltaje de alimentación fue entregada por el pin Vin del Arduino que entrega 5v y un máximo de 200 mA.

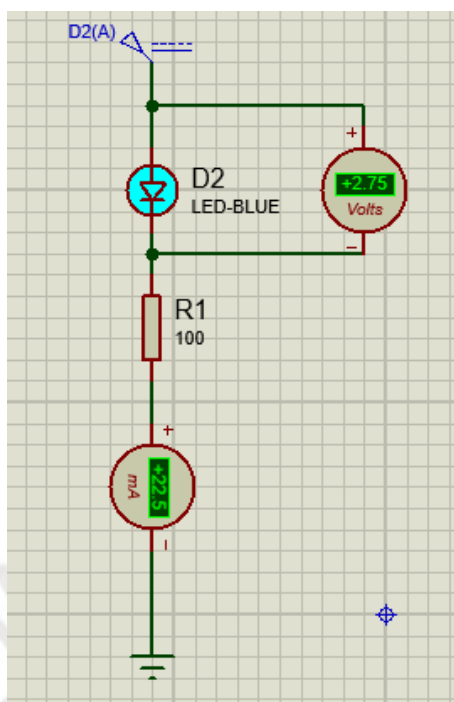


Figura 46: Circuito eléctrico de alimentación del LED.

Los parámetros obtenidos de esta prueba dieron de resultado que la corriente varía de 0 a 22.5 mA para el diodo comercial que se utilizó, siendo 22.5 mA la corriente en la cual alcanza su máxima intensidad y un voltaje máximo de caída en el LED de 2.75 V. En el caso de utilizar el diodo led LED470L, se debe asegurar que su corriente sea 20 mA o mayor.

#### 4.2.3 Pruebas de los tubos de ensayo frente a una fuente con intensidad de luz constante

Como se mencionó en el punto anterior, el diodo LED que utilizamos alcanza su máxima intensidad de luminiscencia cuando la corriente que pasa por sus terminales es 22.5mA por lo cual se hizo las pruebas con ese valor de corriente constante y se expuso a cada uno de los 5 tubos de ensayos con concentraciones diferentes entre tinte fluorescente y agua. Teóricamente, la intensidad de emisión de fluorescencia será mayor mientras la concentración de tinte frente al agua sea mayor por lo que el primer tubo de ensayo deberá emitir una señal lumínica baja en fluorescencia y debería ir aumentando esta señal a media que se hace las pruebas con los tubos de ensayo posteriores, siendo el quinto tubo de ensayo en que debería emitir mayor señal de fluorescencia.

Para estas pruebas, se colocó nuevamente el circuito BH1750 en la parte superior del tubo de ensayo debido a las condiciones que se mencionó en el punto anterior. Los

datos una vez más fueron exportados a la plataforma de Matlab para su análisis. Primero se analizó los lux emitidos por parte de la fuente de excitación, el diodo LED y los resultados lo podemos ver en la figura 47. Esta figura nos muestra la cantidad de lux emitidos por el diodo LED en un tiempo de 2.5 segundos que duro el muestreo.

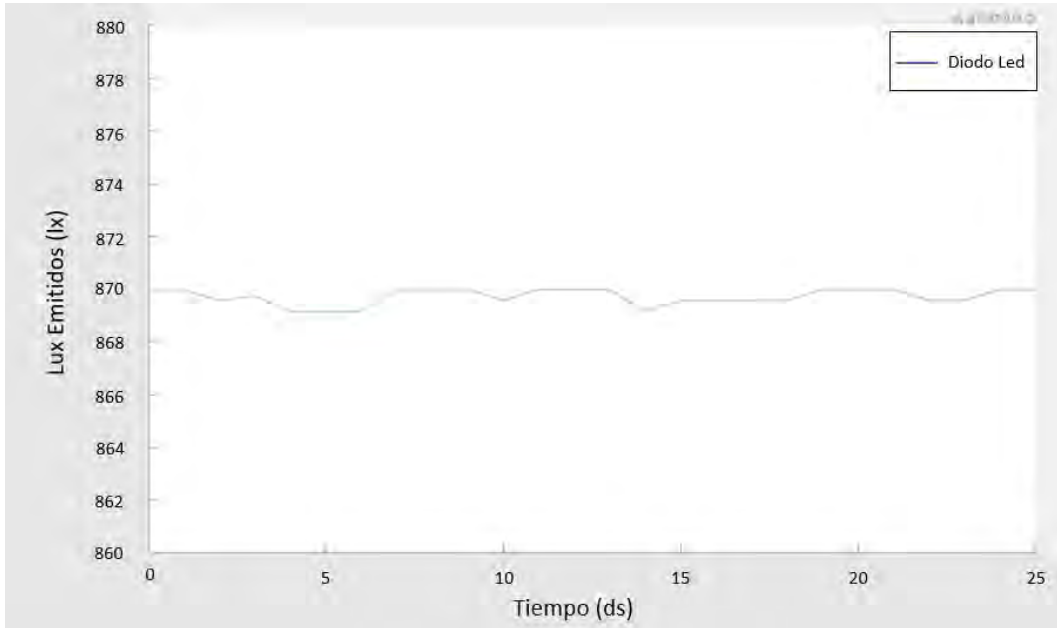


Figura 47: Lux emitidos por el diodo LED.

Los lux emitidos por el diodo LED no se mantuvieron constantes debido a que no estaba en una posición fija y que no tiene un circuito de control de corriente, por lo cual, es importante resaltar que se debe incluir un circuito de control de corriente como se especificó en el capítulo anterior.

Luego, se pasó a analizar la intensidad de fluorescencia de cada uno de los tubos de ensayo y los resultados se pueden observar en la figura 48.

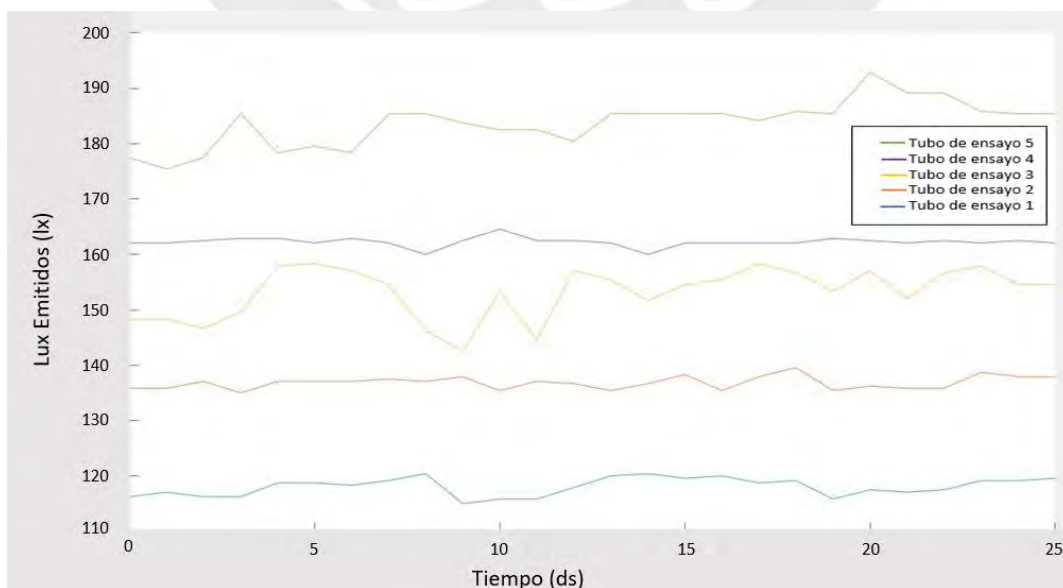
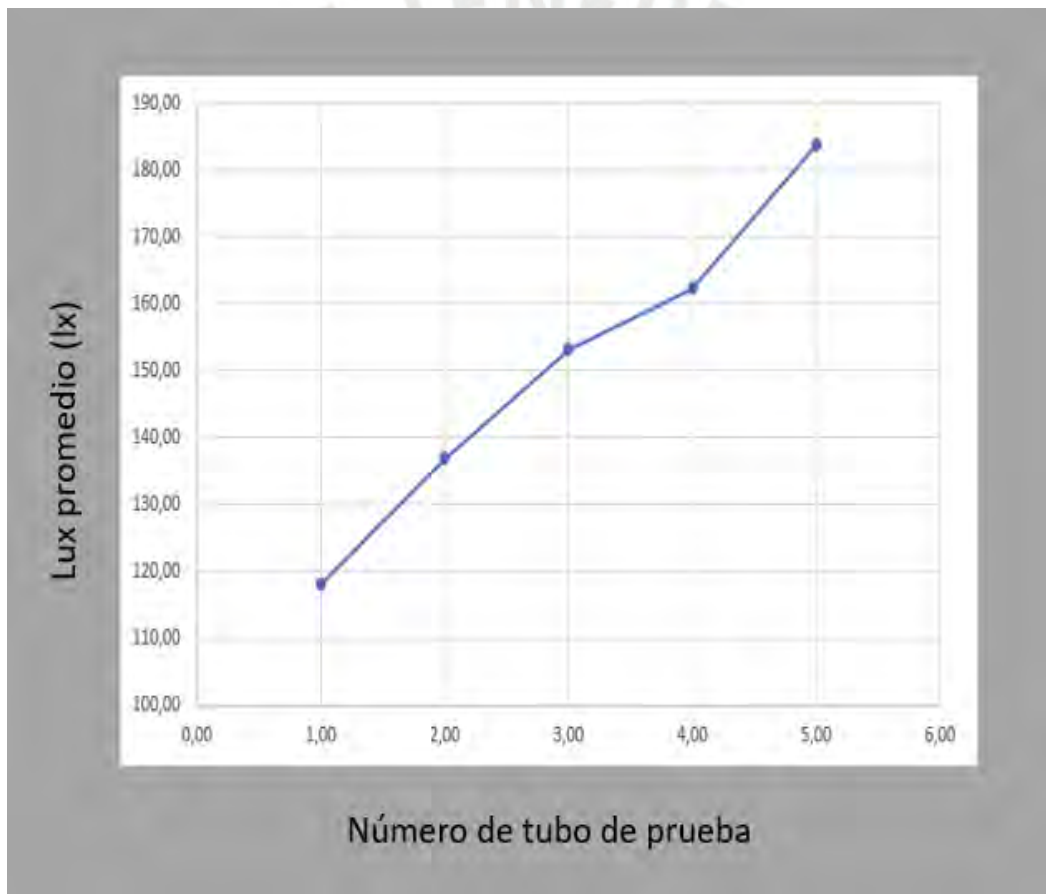


Figura 48: Lux emitidos por los tubos de ensayo.

Se puede observar que la intensidad de fluorescencia de emisión de los tubos de ensayo corresponde a la teoría ya que el tubo de ensayo 1 emite menor fluorescencia que el resto. Se analizaron los valores promedios en lux de cada uno de los tubos de ensayo para hacer una gráfica posterior. Los valores promedios fueron los siguientes:

- 1 Tubo de Ensayo: 118.05 lux.
- 2 Tubo de Ensayo: 136.84 lux.
- 3 Tubo de Ensayo: 153.19 lux.
- 4 Tubo de Ensayo: 162.26 lux.
- 5 Tubo de Ensayo: 183.74 lux.

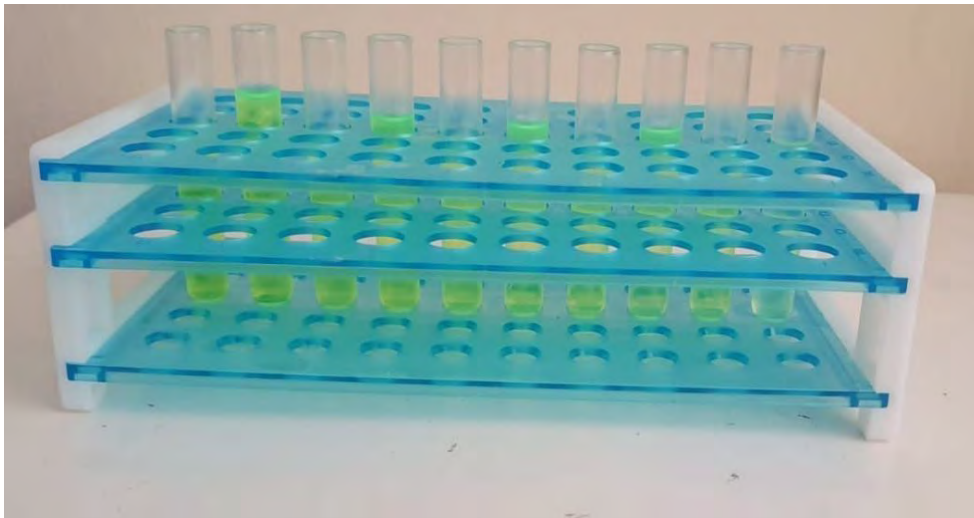
La gráfica se realizó en la plataforma de Excel y el resultado fue el siguiente:



*Figura 49: Gráfica de fluorescencia de los valores promedios de los tubos de ensayo.*

Como se puede ver en la figura 49, un aumento lineal en el tinte fluorescente (1ml de tinte adicional en cada tubo de ensayo) produce un aumento lineal en los valores obtenidos por el sistema óptico propuesto. Por lo cual se procedió a realizar más pruebas que sustenten esta hipótesis.

Pruebas con 10 muestras.

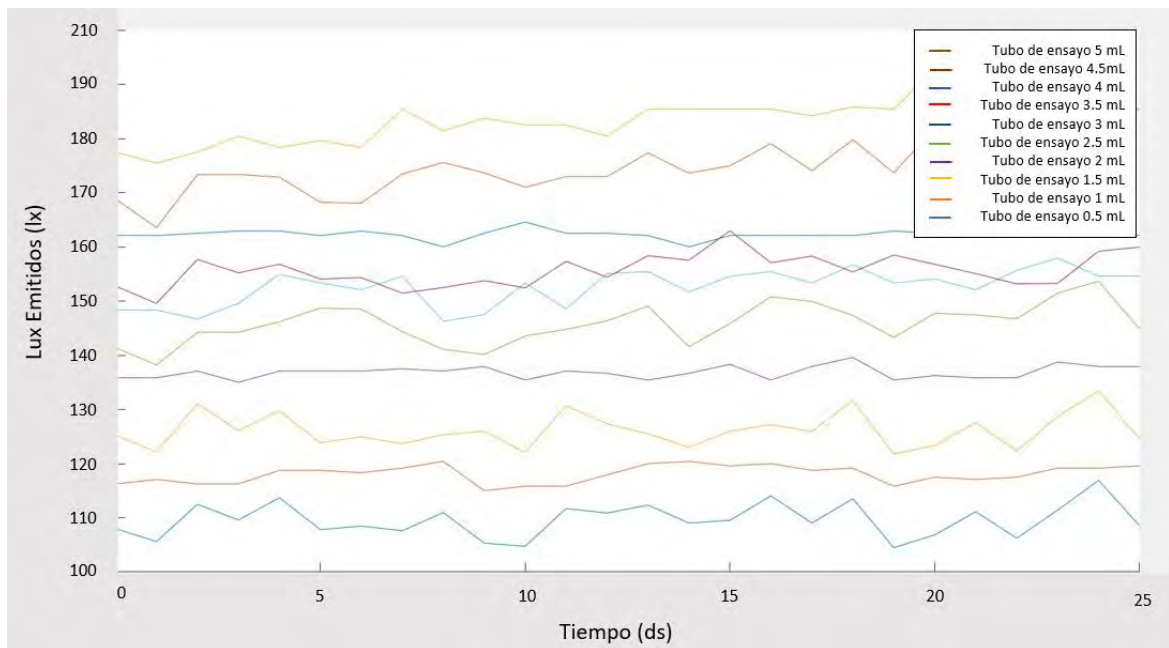


*Figura 51: Muestras de 10 tubos de ensayo con diferente proporción de tinte y agua.*

La distribución de los 10 tubos de ensayo son los siguiente (de izquierda a derecha):

- 1Tubo de Ensayo:0.5 ml de tinte y 4.5ml de agua.
- 2Tubo de Ensayo:1 ml de tinte y 4ml de agua.
- 3Tubo de Ensayo:1.5 ml de tinte y 3.5ml de agua.
- 4Tubo de Ensayo:2 ml de tinte y 3ml de agua.
- 5Tubo de Ensayo:2.5 ml de tinte y 2.5 de agua.
- 6Tubo de Ensayo:3 ml de tinte y 2ml de agua.
- 7Tubo de Ensayo:3.5 ml de tinte y 1.5ml de agua.
- 8Tubo de Ensayo:4 ml de tinte y 1ml de agua.
- 9Tubo de Ensayo:4.5 ml de tinte y 0.5ml de agua.
- 10Tubo de Ensayo:5 ml de tinte.

Los lux emitidos por la fuente de excitación son los mismos. Con esto aclarado, se procede a mostrar los resultados obtenidos en la plataforma Matlab.



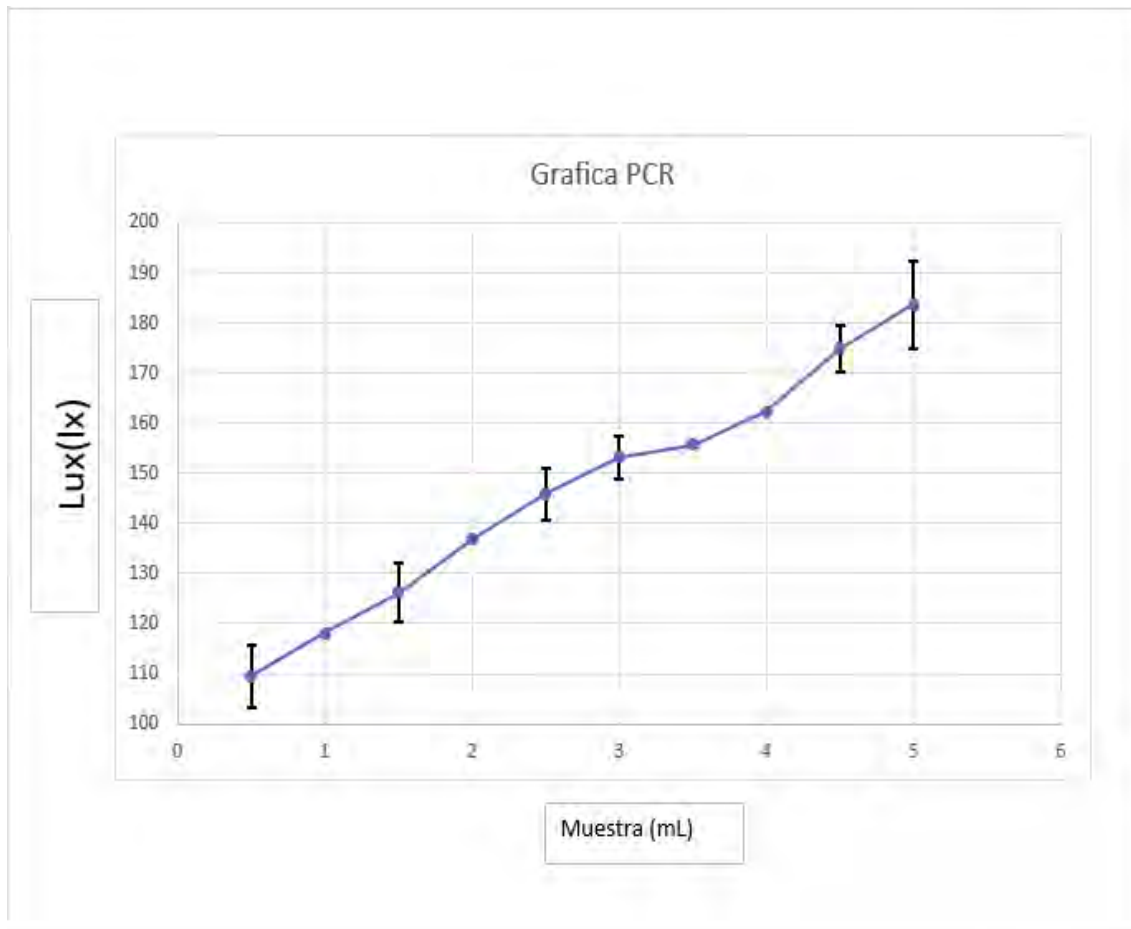
*Figura 52: Lux emitidos por las 10 muestras de tubo de ensayo.*

Se puede observar que hay valores similares en los tubos 6 y 7 lo cual se debe a imprecisión de una de las 2 muestras ya que se puede haber tomado mas mililitros del tinte que se especificó y también por que no se contaba con el control de corriente establecido en el capítulo 3.

Una vez más se trabajó con los valores promedios los cuales son los siguientes:

- 1Tubo de Ensayo: 109.02 lux.
- 2Tubo de Ensayo: 118.06 lux.
- 3Tubo de Ensayo: 126.12 lux.
- 4Tubo de Ensayo: 136.84 lux.
- 5Tubo de Ensayo: 145.82 lux.
- 6Tubo de Ensayo: 153.19 lux.
- 7Tubo de Ensayo: 155.68 lux.
- 8Tubo de Ensayo: 162.26 lux.
- 9Tubo de Ensayo: 174.93 lux.
- 10Tubo de Ensayo: 183.74 lux.

La gráfica reconstruía teniendo en cuenta el margen de error:

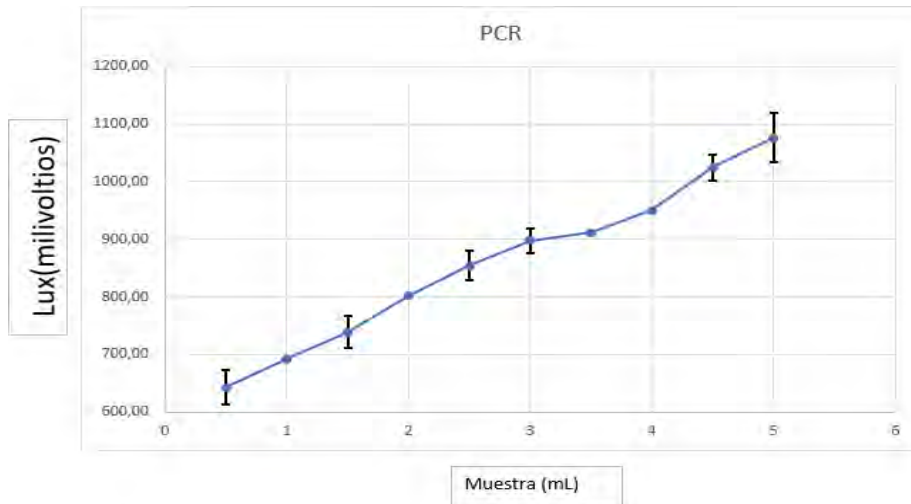


*Figura 53: Gráfica de fluorescencia de los valores promedios de los tubos de ensayo incluido el margen de error.*

Ahora con 10 muestras, la gráfica presenta mayor similitud con la figura 50. Como uno de los objetivos de la tesis es mostrar la señal de fluorescencia, pero en unidades de voltaje. Debido a ello, se procedió a analizar la hoja de datos del circuito BH1750 para obtener el voltaje referente a la cantidad de lux emitidos y se obtuvo los siguientes niveles de voltaje para la intensidad de fluorescencia de los tubos de muestra:

- 1Tubo de Ensayo: 642.29 mV.
- 2Tubo de Ensayo: 691.76 mV.
- 3Tubo de Ensayo: 738.98 mV.
- 4Tubo de Ensayo: 801.81 mV.
- 5Tubo de Ensayo: 854.43 mV.
- 6Tubo de Ensayo: 897.59 mV.
- 7Tubo de Ensayo: 912.19 mV.
- 8Tubo de Ensayo: 950.73 mV.
- 9Tubo de Ensayo: 1024.97 mV.
- 10Tubo de Ensayo: 1076.57 mV.

Luego de obtener las gráficas de lux vs número de muestras, procedió a hacer la gráfica de fluorescencia en milivoltios vs el número de muestras de los tubos de ensayo:



*Figura 54: Gráfica de fluorescencia en milivoltios de los valores promedios de los tubos de ensayo incluido el margen de error.*

Si bien los datos obtenidos muestran que hay una relación directamente proporcional entre la fluorescencia y el aumento de ADN (simulado con el aumento de tinte fluorescente), la amplificación del ADN tiene un aumento exponencial, si lo llevamos a una expresión matemática sigue la función  $K * 2^x$  (Donde K es la constante de la cantidad de ADN presente antes del proceso de PCR). Con lo anteriormente expuesto, se procedió a realizar pruebas que simulen el comportamiento exponencial teórico que presentan las curvas de PCR, para lo cual en los tubos de ensayo se agregó el tinte en forma de gotas de la siguiente manera:

- 1 Tubo de Ensayo: gotas de tinte (25 ul) y 4.975 ml de agua.

En los siguientes tubos de ensayo se continuó agregando gotas de tinte y agregando agua hasta completar los 5ml del tubo de ensayo, pero de manera exponencial (Primero 1 gota de tinte, luego 2, luego 4, etc). Se tomaron 9 muestras los cuales dieron los siguientes datos:

- 1 Tubo de Ensayo: 42.39 lux.
- 2 Tubo de Ensayo: 49.38 lux.
- 3 Tubo de Ensayo: 51.49 lux.
- 4 Tubo de Ensayo: 65.95 lux.
- 5 Tubo de Ensayo: 76.76 lux.
- 6 Tubo de Ensayo: 106.97 lux.
- 7 Tubo de Ensayo: 123.67 lux.

- 8Tubo de Ensayo:139.83 lux.
- 9Tubo de Ensayo:183.95 lux.

Se procedió a analizar los datos obtenidos en la plataforma Matlab para ver si la tendencia es exponencial o no. Para lo cual se utilizó el siguiente comando:

```
función = [42.39, 49.38, 51.49, 65.95, 76.76, 106.97, 123.67, 139.83, 183.95];  
h = lillietest(funcion,'Distribution','exponential')
```

Utilizando la función "lillietest" en MATLAB, obtenemos un resultado de 1, lo que sugiere que el nivel de significancia es mayor al 5%. Esto significa que no contamos con suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula, que establece que los datos no siguen una distribución exponencial.

Aunque la trayectoria no sigue un patrón exponencial, podemos observar en los datos previos que hay un incremento en la intensidad de la fluorescencia emitida por el tubo de ensayo con mayor cantidad de tinte en comparación con el otro. Esto sugiere que el comportamiento del tinte utilizado no es similar al del fluoróforo SYSBR Green en términos de crecimiento exponencial de fluorescencia. Teóricamente, la fluorescencia emitida por el fluoróforo seleccionado, SYSBR Green, aumenta su intensidad proporcionalmente en relación a las hebras de ADN, las cuales van creciendo de forma exponencial en el proceso del PCR lo cual genera que la intensidad luminosa aumente de manera exponencial. Sin embargo, teniendo en cuenta el aumento proporcional de fluorescencia observado en las pruebas anteriores, podemos inferir que estamos acercándonos a la respuesta deseada.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los aspectos abordados mediante la metodología empleada en esta tesis (VDI 2206), se concluye que es posible diseñar el sistema óptico de detección de un termociclador en tiempo real que permita monitorear la amplificación y comportamiento de las hebras de ADN en todo el proceso del PCR. Esto se pudo evidenciar en el capítulo 4 con los resultados y gráficas presentadas respecto a la intensidad de luz que se logró medir en los diversos experimentos que se hizo en esta investigación. Partiendo de estos resultados se puede afirmar que el diseño planteado cumple con los objetivos específicos y generales propuestos en esta tesis.

Del dominio eléctrico, actuadores y óptico, se puede concluir que es necesario reducir al mínimo el ruido presente en las fuentes de alimentación, para que los componentes funcionen en condiciones óptimas y se eviten datos erróneos. Mediante el análisis que se hizo en la plataforma Matlab, se observó que las señales obtenidas presentaban variaciones con un margen de error respecto a su valor promedio de  $\pm 5$  lux como máximo y esto se puede reducir con el control del ruido. Por otro lado, del dominio de procesos, con las 10 muestras tomadas en el tiempo de 2.5 segundos se pudo construir gráficas que seguían la linealidad que se planteaba en las hipótesis de que la intensidad de luz emitida por los fluoróforos es proporcional a la cantidad de ADN presente en las muestras. Si bien los resultados presentan variaciones respecto a su valor promedio, se pudo concluir que es necesario tomar una buena cantidad de muestras para realizar las gráficas posteriores ya que, al tener pocas muestras, las gráficas presentan puntos de inflexión que distorsionaban el comportamiento de las gráficas. Por eso se propuso en el capítulo 3 tomar 1000 muestras en los 90 segundos que dura el cada ciclo de PCR.

Otra conclusión referente al sistema óptico, es que se deben realizar diversas modificaciones al termociclador PUCP. También, se logró confirmar que la tendencia obtenida en el último experimento realizado, indica que el líquido utilizado no presenta una tendencia exponencial al simular el comportamiento del termociclador, pero si un comportamiento similar al deseado.

## RECOMENDACIONES DE TRABAJOS FUTUROS

Por cuestiones de seguridad debido a la pandemia del coronavirus, no se realizó las pruebas con los componentes establecidos en el capítulo 3. El fluoróforo SYSBR GREEN solo puede ser manipulado en ambientes controlados de laboratorio, por lo cual se sugiere que, en trabajos futuros, se realicen pruebas con los componentes indicados y compararlos con los resultados obtenidos en esta tesis. Asimismo, se puede realizar ensayos con el termociclador PUCP para ver el comportamiento en tiempo real del sistema óptico de detección.

Los componentes seleccionados en el capítulo 3 fueron evaluados debido al área donde serán expuestos, pero es recomendable realizar un análisis de su funcionalidad antes de ser implementados. Otra recomendación es evaluar si el ancho de banda que se calculó para la curva de absorción y emisión del fluoróforo SYSBR GREEN es el indicado para obtener la mayor intensidad de fluorescencia.

Algunas de los cambios que se deben considerar para poder implementar el sistema óptico en el prototipo funcional del termociclador PUCP son los siguientes: en primer lugar, se debe incluir un nuevo filtro de línea ya que el filtro de línea del termociclador PUCP se puede saturar teniendo en cuenta el consumo de potencia adicional que se requiere para el sistema óptico de detección. En segundo lugar y último lugar, la bandeja porta muestras del termociclador PUCP tiene un diseño plano el cual no ayuda con la implementación del sistema óptico, motivo por el cual se debe incluir cortes y otras modificaciones

Por último, el objetivo de esta tesis es diseñar el sistema óptico de detección de un termociclador en tiempo real y expresar la señal de fluorescencia medida en voltaje versus el tiempo. Para el ámbito comercial es importante diseñar un algoritmo que permita cuantificar el número de replicas obtenidas al final del proceso del PCR y partiendo de esta tesis se puede realizar ese algoritmo en un futuro.

## BIBLIOGRAFÍA:

- [1] Macassi Quispe J. Tesis para optar el Título de Ingeniero Electrónico. Pontificia Universidad Católica del Perú, Feb. 2017. Acceso: mayo 11, 2021. [Online].
- [2] P. Aguilera, M. Ruiz Tachiquín, M. G. Rocha Munive, B. Pineda Olvera, and M. E. Chánez Cárdenas, “PCR en tiempo real,” Herramientas moleculares aplicadas en ecología. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf> (acceso mayo 11, 2021).
- [3] “Termociclador – PUCP - Mes de la Investigación.” <https://investigacion.pucp.edu.pe/mes-investigacion/investigacion/termociclador-pucp/> (acceso mayo 11, 2021).
- [4] A. M. Pérez de Castro, “Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).” ETSIAM, Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf> (acceso mayo 11, 2021).
- [5] “Reactivos, reacciones y urgencias | IDL Reporteros.” <https://www.idl-reporteros.pe/reactivos-reacciones-y-urgencias/> (acceso mayo 11, 2021).
- [6] “Termociclador Equi LaB - YouTube.” <https://www.youtube.com/watch?v=RsGiQ53BDq4&list=LL&index=7&t=4s> (acceso mayo 11, 2021).
- [7] L. Tamay de Dios, C. Ibarra, and C. Velasquillo, “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real,” *Investigación en Discapacidad*, vol. 2, no. 2, pp. 70–78, 2013, Accedido: May 20, 2021. [En línea]. Disponible en: [www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx).

- [8] “Thermoelectric Cooler CP2-31-10.” Accessed: May 20, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://docs.rs-online.com/97c4/0900766b80485671.pdf>.
- [9] L. Magnolia Oshiro Chinen, “FICHA ESTÁNDAR DE FAMILIA DEL CATÁLOGO DE BIENES, SERVICIOS Y OBRAS DEL MEF,” Lima, Jan. 2014. Accedido: May 20, 2021. [En línea]. Disponible en: [https://www.mef.gob.pe/contenidos/doc\\_siga/catalogo/ctlogo\\_familias\\_lampara\\_halogen\\_a.pdf](https://www.mef.gob.pe/contenidos/doc_siga/catalogo/ctlogo_familias_lampara_halogen_a.pdf)
- [10] E. Marrufo Gonzáles and J. Castillo Pedrosa, “Luminotecnia. Dispositivos para alumbrado incandescente y fluorescente,” in *Instalaciones Eléctricas Básicas*, 1st ed., McGraw-Hill Ciclos Formativos, 2018, pp. 175–208.
- [11] N. M. Huarcaya Victoria, “Mejora del diseño del módulo termo-mecánico de un termociclador para uso en biología molecular,” *Pontificia Universidad Católica del Perú*, Jun. 2015, Accedido: May 20, 2021. [Online]. Disponible en: <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/6003>.
- [12] F. J. Valdivia Valero, “Caracterización de los Fotomultiplicadores del Experimento Double Chooz bajo Campo Magnético y Diseño y Construcción de sus Blindajes Magnéticos,” Madrid, Oct. 2007. Accedido: May 20, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/Public/38/115/38115074.pdf>
- [13] O. Piminchumo, *Diseño de los componentes mecánicos de un termociclador utilizando el método de los elementos finitos*, Lima: PUCP, 2009
- [14] F. Pujada Gamarra, “Diseño de un sistema de adquisición de imágenes

multiespectrales para aplicaciones en agricultura de precisión,” Lima, 2011.

[15] J. L. Ponce Ccanto and D. A. Zegarra Rios, “Diseño e implementación de un módulo para procesos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la replicación de ADN,” Lima, 2012.

[16] “Termociclador RT-qPCR para Covid19 MA6000 | Akralab.” <https://www.akralab.es/producto/termociclador-rt-qpcr-ma6000/> (accedido May. 20, 2021).

[17] “Thermal Cycler | Real Time PCR LRTP-B30.” <https://www.labtron.com/Analytical-Instruments/Thermal-Cycler/Real-Time-PCR/LRTP-B30> (accedido May. 20, 2021).

[18] “Termociclador para PCR tiempo real: MyGo Mini – Probiotek.” <https://www.probiotek.com/productos/equipos/termocicladores/mygo-mini/> (accedido May 20, 2021).

[19] “Real-Time vs Digital vs Traditional PCR | Thermo Fisher Scientific - PE.” <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html> (accedido May 26, 2021).

[20] “Tiva C Series EK-TM4C1294X LaunchPad – Ja-bots todo lo que necesites en robótica de competencia.” [Online]. Available: <https://ja-bots.com/producto/tiva-c-series-ek-tm4c1294x-launchpad/>.

[21] K. S. Chong, K. B. Gan, and S. M. Then, “Development of a portable low-cost real-time PCR system,” in Proceeding of 2017 International Conference on Robotics, Automation and Sciences, ICORAS 2017, Jul. 2018, vol. 2018-March, pp. 1–5, doi:

10.1109/ICORAS.2017.8308041.

[22] “Thorlabs - FDS100 Si Photodiode, 10 ns Rise Time, 350 - 1100 nm, 3.6 mm x 3.6 mm Active Area.” [Online]. Available: <https://www.thorlabs.de/thorProduct.cfm?partNumber=FDS100>.

[23] “APDS-9006-020 Broadcom / Avago | Mouser Peru.” [Online]. Available: <https://www.mouser.pe/ProductDetail/Broadcom-Avago/APDS-9006-020?qs=xnajaXqBF999q12ZTm%2Fh6g==>.

[24] “TaqMan vs SYBR Química | Thermo Fisher Scientific - PE.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>.

[25] “31.224/3.” <https://www.electrodh.com/catalogo/ver-item.action?id=5516&d=1> (accessed Oct. 15, 2021).

[26] “LM2576xx Series SIMPLE SWITCHER® 3-A Step-Down Voltage Regulator,” 2021, Accessed: Oct. 15, 2021. [Online]. Available: [www.ti.com](http://www.ti.com)

[27] A. G. Suárez, “Trabajo Fin de Máster DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTOS CUÁNTICOS DE FLUORESCENCIA POR MÉTODOS INDIRECTOS,” 2015.

[28] “Fluoróforo de absorción de fluorescencia de espectro de emisión de sybr green i, emisión, diverso, ángulo, texto png | Klipartz.” <https://www.klipartz.com/es/sticker-png-gomgf> (accessed Oct. 15, 2021).

[29] “Typical Spectral Intensity Distribution Drawing,” 2011, Accessed: Oct. 15, 2021. [Online]. Available: [www.thorlabs.com/contact](http://www.thorlabs.com/contact)

[30] “LED470-01”, Accessed: Oct. 15, 2021. [Online]. Available: [www.roithner.com](http://www.roithner.com)

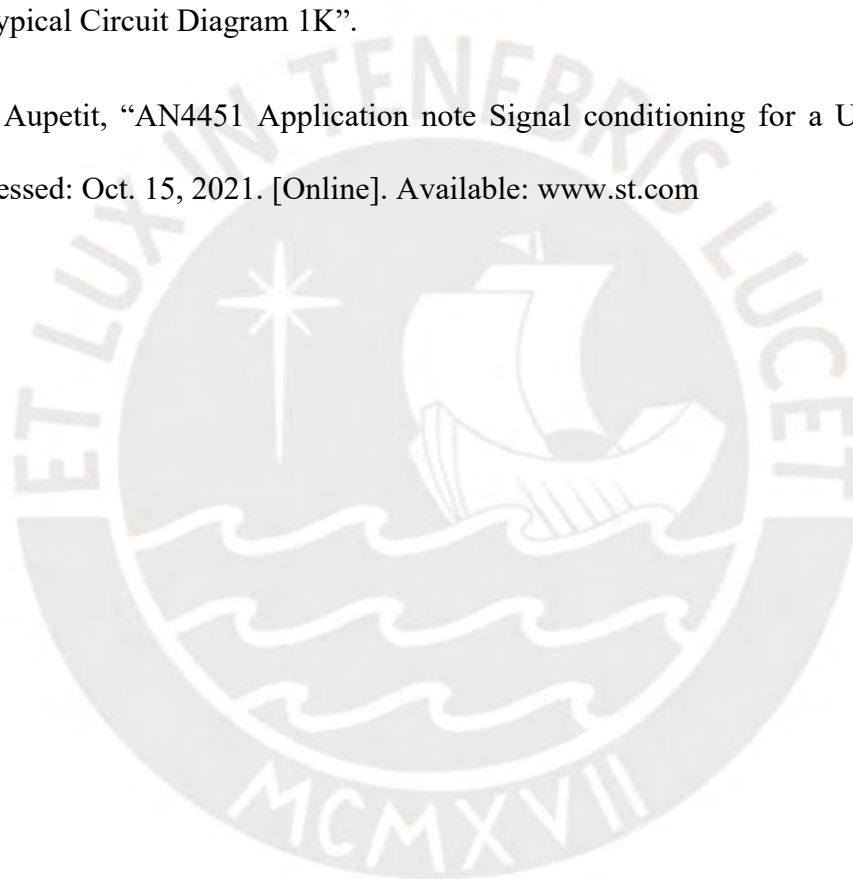
[laser.com](http://laser.com)

[31] “Dual White LED Bias Supply with Indicator LED,” 2008, Accessed: Oct. 15, 2021. [Online]. Available: [www.ti.com](http://www.ti.com)

[32] “SiC UV Photodiode Selection Guide Basic Information SiC UV Photodiode Selection Guide”, Accessed: Oct. 15, 2021. [Online]. Available: <http://www.jinzon.com.tw>

[33] “Typical Circuit Diagram 1K”.

[34] N. Aupetit, “AN4451 Application note Signal conditioning for a UV sensor,” 2014, Accessed: Oct. 15, 2021. [Online]. Available: [www.st.com](http://www.st.com)



## ANEXO A

### A.1 Programa del Arduino Uno para simulación

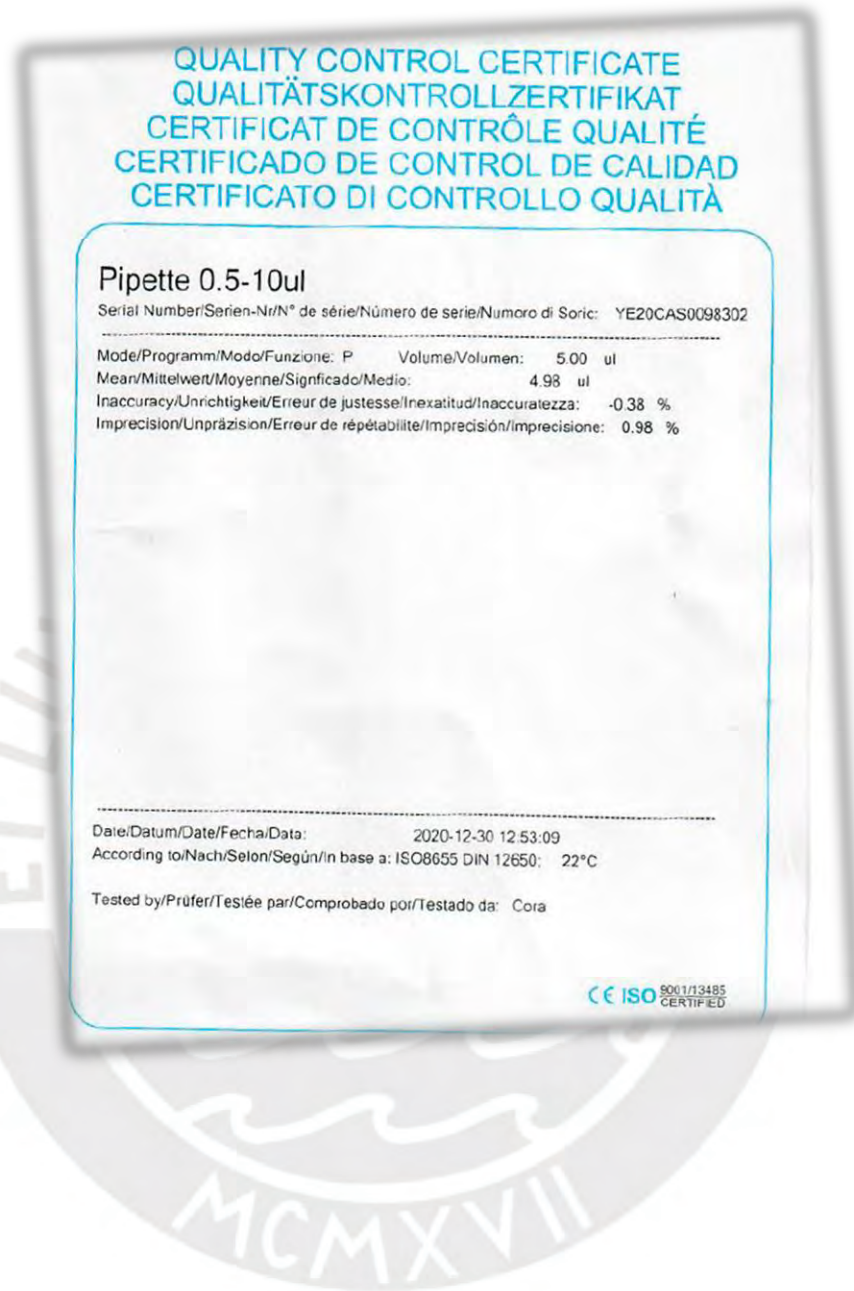
```
#include <BH1750.h>
#include <Wire.h>

BH1750 lightMeter;

void setup() {
  Serial.begin(9600);
  // Initialize the I2C bus
  Wire.begin();
  lightMeter.begin();
  Serial.println(F("BH1750 Test begin"));
}

void loop() {
  float lux = lightMeter.readLightLevel();
  Serial.print("Light: ");
  Serial.print(lux);
  Serial.println(" lx");
  delay(1000);
}
```

## A.2 Certificado de calibración de la pipeta



### A.3 Planos de la base de prueba en cm

