

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

**"DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÓDULO PARA
PROCESOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR) EN LA REPLICACIÓN DE ADN"**

Tesis para optar el título de **Ingeniero Electrónico** que presentan los bachilleres:

José Luis Ponce Ccanto
David Alberto Zegarra Rios

ASESORES: Ing. Willy Carrera Soria
Dra. Sayda E. Mujica Bueno

Lima, Abril del 2012

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo el diseño y desarrollo de un módulo básico que permita la replicación de ADN empleando el proceso de Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocido como PCR por sus siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction. Para ello el módulo debe ser capaz de controlar de manera precisa un juego de temperaturas configurables por el usuario, con la finalidad de lograr un proceso eficiente. No es parte de la presente tesis el desarrollo de la fuente de alimentación del sistema.

Este módulo básico constituye un primer aporte a la intención de desarrollar –equipos termocicladores de producción nacional. Los termocicladores se usan en laboratorios de investigación de Biotecnología Moderna y análisis genéticos.

Para este objetivo se hace uso de los dispositivos de efecto termoeléctrico conocidos como Celdas Peltier, modelos CP 1.4-127-10L y CP 0.8-254-06L, componentes que permiten obtener cambios de temperatura de manera muy rápida. Para el control de dichas temperaturas se selecciona el sensor YSI 44018, por sus características físicas y de precisión y así garantizar que las muestras de ADN a replicar no se degeneren. Los elementos de potencia y de control utilizados permiten el cumplimiento de las exigencias del protocolo de PCR. Todos los componentes electrónicos son manejados digitalmente por el microcontrolador PIC 16F877 que se programó en lenguaje ensamblador. Las interfaces de entrada-salida las constituyen el teclado matricial y la pantalla LCD respectivamente. Para hacer las pruebas de funcionamiento fue necesaria la construcción de un bloque metálico de plata y el aprovisionamiento de un bloque de aluminio que actuaron como bandeja porta-muestras del módulo diseñado. Con estos elementos se construyó el módulo básico, que alcanzó una rampa de temperatura de 0.4°C/s con una precisión de $\pm 0.8^{\circ}\text{C}$.

A Dios por todo, a mis padres Manuel y Laura, por su constante motivación y orgullo y a mi linda familia por acompañarme en los momentos importantes de mi vida.

José Luis Ponce Ccanto

A mis padres, Alberto y Nelly, por su paciencia, su interminable empuje y su apoyo durante toda mi formación profesional.

David Alberto Zegarra Rios



ÍNDICE

ÍNDICE	I
1. EL TERMOCICLADOR EN EL PERÚ.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	2
2. ESTADO DEL ARTE Y CONCEPTOS TEÓRICOS.....	3
2.1. ESTADO DEL ARTE DE LOS TERMOCICLADORES	3
2.2. EL ADN Y SU ESTRUCTURA	5
2.3. PROCESO DE PCR	7
2.3.1 ASPECTOS BÁSICOS DEL PCR.....	7
2.3.2 LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	7
2.3.3 ETAPAS DEL PCR	9
2.4. APLICACIONES	10
2.5. EFECTO TERMOELÉCTRICO.....	12
2.6. ONDA PWM.....	23
2.7. FILTRO PASABAJO PARA PWM [3], [26].....	25
2.8. ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE CALOR EN MATERIALES METÁLICOS.....	29
2.9. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN.....	31
3.1. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO	32
3.1.1. DISPOSICIÓN DE CELDAS PELTIER	32
3.1.2. BLOQUE SÓLIDO DE ALUMINIO	34
3.1.3. BLOQUE DE PLATA	37
3.2. CIRCUITO DE POTENCIA.....	39
3.3. SENSOR DE TEMPERATURA.....	41
3.3.1. VERIFICACIÓN DEL CIRCUITO DE SENSOR DE TEMPERATURA. DETERMINACIÓN DEL ERROR.....	44
3.4. INGRESO DE DATOS Y PANTALLA DE VISUALIZACIÓN.....	50
3.5. ELECCIÓN DEL CONTROLADOR Y COMPONENTES COMPLEMENTARIOS.....	52
3.5.1. EL CONVERTOR ANÁLOGO-DIGITAL	53
3.5.2. SEÑAL DE ANCHO DE PULSO MODULADO (PWM).....	55
3.6. TRANSMISIÓN SERIAL A PC	58
4. DESARROLLO DEL SOFTWARE DE CONTROL	60
4.1. ESQUEMA GENERAL.....	60
4.2. MÓDULO DE VISUALIZACIÓN DE DATOS	63

5. PRUEBAS DE HARDWARE Y SOFTWARE	66
5.1. RESPUESTA AL INCREMENTO DE TEMPERATURA EN BLOQUE DE PLATA.	66
5.2. COMPARACIÓN DE RESPUESTA ENTRE LOS BLOQUES DE ALUMINIO Y PLATA	68
5.3. ENSAYOS CON BLOQUE DE PLATA.....	69
5.4. COSTOS.....	74
CONCLUSIONES	75
RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFIA	80



1. EL TERMOCICLADOR EN EL PERÚ.

Un termociclador es un equipo electrónico que permite la multiplicación *in vitro* de una secuencia de ADN mediante procesos continuos de calentamiento y enfriamiento a alta velocidad (mayores a 1 °C/s). Este proceso es conocido como “Reacción en Cadena de la Polimerasa” o PCR (por sus siglas en inglés: Polimerase Chain Reaction). Algunos modelos de termocicladores son descritos en el capítulo 2.1.

Los esfuerzos por atender las necesidades de los laboratorios de las ciencias de la vida por parte de la ingeniería en nuestro país son muy pobres. En nuestra casa de estudios la investigación y desarrollo en el campo de equipos electrónicos para aplicaciones en laboratorio biológicos no tiene precedentes, aunque hay proyectos que desarrollan equipos electrónicos para biomedicina por parte del grupo GIDEMS [60].

Es el grupo de Investigación Equi-LaB, Grupo de Desarrollo de equipos para Laboratorios Biológicos [61], quién por primera vez plantea atender esta demanda; así la presente tesis surge dentro de sus actividades como una respuesta a la necesidad de desarrollar un equipo similar a los Termocicladores comerciales.

La PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación y servicios de Biología Molecular, para una gran variedad de aplicaciones como la clonación de ADN, la filogenia basada en ADN (determinación de la historia evolutiva de los organismos vivos), el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y pruebas de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas o virales, etc.

El crecimiento acelerado de la tecnología permite el uso de potentes equipos de esta naturaleza; sin embargo al no ser desarrollados en el país deben ser importados, lo que significa un costo elevado y al no tener mayor conocimiento de la tecnología involucrada que le da soporte, tampoco se puede recurrir a la ingeniería local para el soporte y el apoyo en el avance de investigaciones biológicas a nivel nacional.

Por lo tanto, involucrarse en el diseño o desarrollo de equipos con tecnología de punta desarrolla capacidades y recursos para estar a tono con el avance tecnológico, responder a las necesidades locales en las ciencias de la vida, promover el desarrollo industrial local y reducir costos.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

No se cuenta prácticamente con ninguna información técnica sobre equipos termocicladores para trabajos en Biología Molecular desarrollados a nivel local, por lo que para el desarrollo de este trabajo se tuvo que partir de ideas propias, basadas en el estado del arte y la revisión bibliográfica de la tecnología utilizada para estos equipos.

Desarrollar e implementar un módulo con esta tecnología requiere diseñar un circuito digital de control del proceso de PCR, que muestre el avance del proceso en tiempo real, una interface de usuario que permita el ingreso de los parámetros necesarios para la PCR, el control preciso de las temperaturas involucradas, manejar elementos de efecto termoeléctrico y conocer los aspectos mecánicos relacionados a materiales metálicos, su fabricación y su acople con el diseño electrónico para lograr el funcionamiento del módulo básico y documentar los ensayos. Todas estas actividades requieren la comprensión adicional de conceptos relacionados con termoelectricidad, transferencia de calor y procesos biológicos de PCR, que le dan un carácter multidisciplinario a este trabajo.

Entre las razones que justifican este trabajo están la intención de aportar con el diseño de un módulo programable que sirva de base para una posterior industrialización y constituya una alternativa a los termocicladores importados, porque disminuyendo los costos implicados en la adquisición. Otro aporte es poder dar soporte técnico local, atendiendo así la demanda nacional y adquiriendo experiencia en el manejo de la tecnología subyacente.

2. ESTADO DEL ARTE Y CONCEPTOS TEÓRICOS

2.1. ESTADO DEL ARTE DE LOS TERMOCICLADORES

Como se definió en el capítulo 1, el termociclador es un equipo electrónico que permite la multiplicación *in vitro* de una secuencia de ADN mediante procesos continuos de calentamiento y enfriamiento a alta velocidad. Este ADN se coloca en un juego de microtubos y estos sobre la bandeja portamuestras contenida en el termociclador como se muestra en la figura 2.1 basada en el sitio web de Biometra [50] y Pharma Suppliers & News [62].



Figura 2.1 (a) Microtubos con muestra de ADN. (b) Bandeja portamuestras.

Los termocicladores varían según las marcas. La diferencia entre ellas reside sobre todo en la velocidad de cambio de temperatura y en la precisión de la medición de temperatura del equipo. En la figura 2.2 se muestran dos modelos de termocicladores comerciales, a) de BIORAD C1000 que puede contener un módulo de 96 ó 384 microtubos de 0.2 ml y una velocidad o rampa de hasta 3.3 °C/s [50]. b) de EPPENDORF con capacidad para 96 microtubos de 0.2ml ó 77 de 0.5ml. Este modelo alcanza tasas de cambio de temperatura de 3°C/s. [51].

Adicionalmente existen equipos con bloques mecánicos con un orden de inercia térmica que le permite al equipo crear en el bloque metálico más de una temperatura al mismo tiempo. A esta función se le conoce como gradiente de temperatura. Otros fabricantes como Idaho Technology Inc. utilizan tubos capilares para las muestras de ADN y calentamiento por aire caliente gracias a un ventilador y una bomba halógena, de esta manera se logran cambios de temperatura de 10 °C/s., lo que permite, que una PCR se pueda realizar en 20 minutos [39].



Figura 2.2 Modelos de Termociclador: (a) Fabricante BIO-RAD Laboratories, MODELO C1000. (b) Fabricante Eppendorf, modelo Mastercycler Gradient.

En ciertos modelos de termocicladores, las reacciones se realizan en placas de 96, 77 o 384 pozos o huecos para tubos de 0.2ml o 0.5ml, cada uno con una fibra óptica, en estos modelos, hay una fibra óptica al frente de los tubos. Otros equipos cuentan con puertos USB para comunicación externa con una computadora personal y su control desde la misma [6], [50]. Los termocicladores, utilizan una tapa de cierre con un calefactor con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción.

El estado del arte de los equipos termocicladores muestra que la tendencia es la utilización de la tecnología de celdas Peltier para calentar y enfriar un bloque metálico construido principalmente en aluminio con un revestimiento de teflón protector externo. Estos equipos permiten programar todos los parámetros para la reacción como: tiempos, temperaturas y número de ciclos usando una interface moderna.

El uso de microcontroladores para el manejo de todas las funciones permite generar programas predeterminados de tiempos y temperaturas. Se denomina *programa* a cada conjunto de datos térmicos y temporales de un protocolo para una PCR, dichos datos definen el perfil de temperaturas a las cuales se debe someter la muestra. Los termocicladores más sofisticados permiten seleccionar las condiciones de temperatura para cada etapa de la PCR [50], [51], [52] y programar una gradiente de temperatura de hasta 20°C; esto permite optimizar las condiciones de las reacciones de PCR para la amplificación de un solo patrón.

Actualmente, fabricantes como Eppendorf [12], Stratagene [52] o QIAGEN [62] producen termocicladores para PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, la cual permite cuantificar además de detectar y amplificar las secuencias de ADN realizadas en la PCR.

La PCR en tiempo real surgió para resolver los problemas de cuantificación que no se lograba en la PCR normal, en la primera se usan sondas marcadas con fluorocromos usando para ello un arreglo de sensores ópticos como sistema de medición. Esta emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN presente, y esto se representa gráficamente en una pantalla, mostrando de esta manera el avance de las reacciones del proceso que se está dando como se grafica en la figura 2.3, ejemplo de termociclador del fabricante QIAGEN.

Además de proporcionar información cuantitativa, la PCR en tiempo real presenta otra serie de ventajas frente a la PCR tradicional como una mayor sensibilidad lo que disminuye el riesgo de falsos negativos, mayor rapidez y menor probabilidad de contaminación con lo que disminuyen los falsos positivos. Son muchas más las aplicaciones de esta técnica en el campo de la medicina con respecto a los termocicladores tradicionales.



Figura 2.3 Termociclador para PCR en Tiempo Real de QIAGEN, modelo Rotor Gene Q [62].

2.2. EL ADN Y SU ESTRUCTURA

El ADN (Ácido Desoxirribonucleico) es una molécula que se encuentra dentro del núcleo de toda célula y define las características de todo organismo vivo.

Su estudio nos lleva a conocer de antemano limitaciones o características físicas de los seres vivos pudiéndose predecir anomalías y/o enfermedades que luego se pudieran manifestar; asimismo nos permite conocer rasgos genéticos específicos de algún organismo a partir de solo una pequeña muestra del mismo.

ESTRUCTURA DEL ADN

La estructura de un determinado ADN está definida por la ordenación o "secuencia" de las bases nitrogenadas de los nucleótidos (figura 2.4.) que uno tras otro forman la cadena de polinucleótidos. En esta secuencia de las bases reside precisamente la información genética del ADN específica de cada ser vivo.

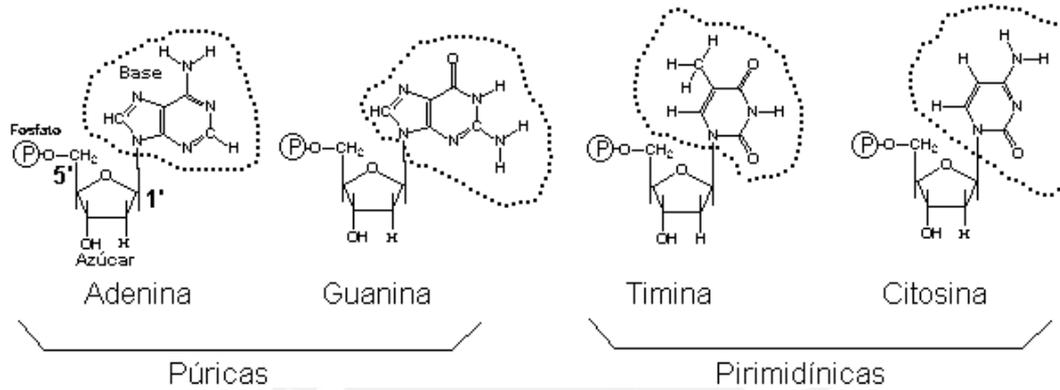


Figura 2.4 Estructura química de un nucleótido formado por las bases nitrogenadas de Adenina(A), Guanina (G), Citosina(C), Timina (T) unidas directamente con una Pentosa.

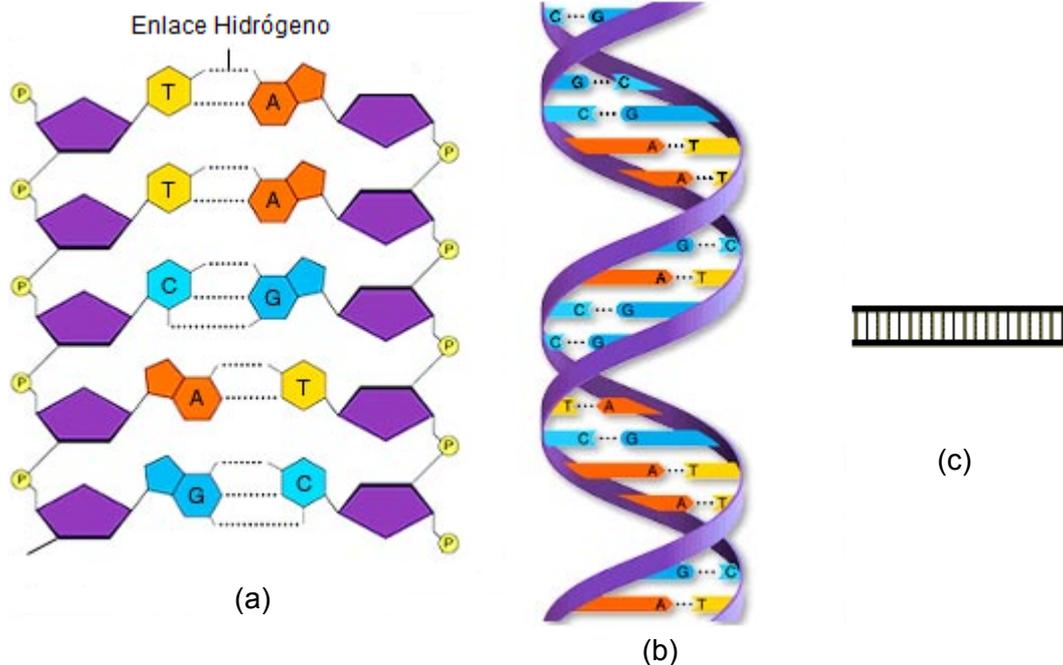


Figura 2.5 Modelo de estructura de ADN. (a): Enlaces de estructuras químicas, (b): Representación de doble hélice con cadenas complementarias, (c) Esquema simplificado del ADN. Fuente: <http://geneticabioterio.wordpress.com/genetica-molecular>

La estructura en doble hélice del ADN [9], con el apareamiento de las bases nitrogenadas de Adenina con Timina y Guanina con Citosina (A-T; G-C), mostrada en la figura 2.5 (Fuente Wordpress.com, sitio web: <http://geneticabioterio.wordpress.com/genetica-molecular>), implica que el orden o secuencia de las bases de una de las cadenas determina automáticamente el orden de la otra, por ello se dice que las cadenas son complementarias.

2.3. PROCESO DE PCR

2.3.1 ASPECTOS BÁSICOS DEL PCR

En 1953 Watson y Crick, utilizando como base los estudios de equimolecularidad de Erwin Chargaff deducen la estructura del ADN y proponen el modelo de la doble hélice tridimensional [44]. Este último hecho dio la pauta para nuevos descubrimientos que conducirían a lo que se llama Tecnología del ADN Recombinante [28], [44].

Según el modelo de Watson y Crick, la molécula de ADN está constituida por dos largas cadenas de nucleótidos con polaridad opuesta, unidas entre sí formando una doble hélice.

Adicionalmente, se sabe que las polimerasas son enzimas capaces de separar y sintetizar ADN *in vitro*. La Taq polimerasa, es la enzima más utilizada por ser termoestable, es obtenida a partir de un organismo conocido como *Thermophilus aquaticus*, una bacteria que vive en zonas cálidas.

La mayoría de las polimerasas necesitan un pequeño iniciador (cebador de extensión o *Primer*), complementario al ADN molde para iniciar la polimerización a partir de ese punto.

El apareamiento de bases, es el proceso cuando los nucleótidos se enlazan de modo encadenado para formar los ácidos nucleicos. La Adenina (A) se complementa con la Timina (T) y la Guanina (G) se complementa con la Citosina (C). Esta combinación de pares de bases es mencionada como A-T o G-C y se muestra de forma gráfica en la figura 2.4

2.3.2 LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

A mediados del siglo XX aun conociendo la estructura de Watson y Francis Crick sobre el ADN se enfrentaba la dificultad de no poder realizar ninguna manipulación o

análisis de ADN porque se contaba siempre con una cantidad reducida de estas moléculas que no permitían ser detectadas, ni trabajadas aún con los instrumentos más modernos.

No fue hasta 1983 cuando el Dr. Kary Mullis de la corporación CETUS logró concebir un proceso por el cual se podían producir millones de copias de una molécula de ADN específica; éste es el proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), trabajo por el cual ganó el Premio Nobel en el año 1993 [59]. Este proceso se inicia mediante un desdoblamiento de la molécula de ADN a alta temperatura, usualmente menor a los 98°C y mayor a los 88°C , llamado Desnaturalización así como las reacciones de Hibridación y Extensión a temperaturas menores, muy precisas para garantizar que la molécula no se degenere y permita su Replicación para su posterior Secuenciación. Este esquema de temperaturas se grafica en la figura 2.6 y corresponde al patrón general de la PCR. El esquema con tres temperaturas corresponde a un ciclo, este ciclo se repite tantas veces sea necesario para obtener la multiplicación deseada -miles de millones de copias de cadenas de ADN- programándose generalmente más de 15 ciclos hasta finalizar el proceso.—El termociclador controla el número de los ciclos, la exactitud a la que se producen las etapas y la cantidad de tiempo en el que se mantiene la reacción a las diferentes temperaturas. Hoy en día no hay laboratorio de Biología Molecular, que no use la técnica de PCR.

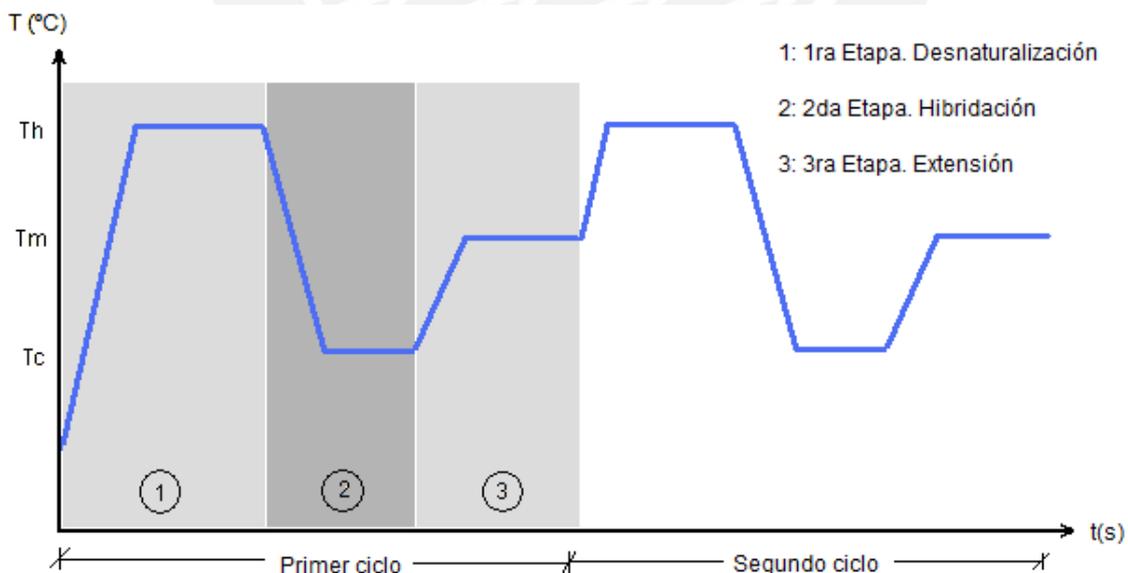


Figura 2.6 Gráfico Tiempo vs. Temperatura en la que se muestran las 3 etapas de un ciclo PCR. Las temperaturas correspondientes son: T_h : Temperatura de desnaturalización, T_c : Temperatura de Hibridación y T_m : Temperatura de Extensión.

2.3.3 ETAPAS DEL PCR

PRIMERA ETAPA DEL PCR: DESNATURALIZACIÓN o *MELTING*.

Fase en la que se produce la separación de la doble hélice en dos hebras únicas como se esquematiza en la figura 2.7. Esto ocurre cuando se lleva la muestra a temperaturas mayores a 90 °C. Se añaden dos componentes adicionales: primero la ya descrita Taq polimerasa que soporta altas temperaturas y segundo, el iniciador o cebador [43], también conocido como “Primer”, que es una cadena corta de polinucleótidos que forma enlaces complementarios con la cadena ADN del sector que se quiere replicar y es el punto de partida del copiado de la cadena.

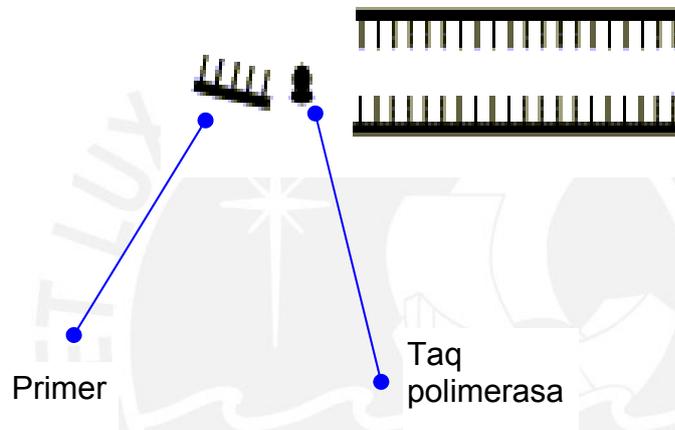


Figura 2.7 Desdoblamiento inicial de la doble hélice de la molécula de ADN a la que se añaden el Primer y la Taq polimerasa.

SEGUNDA ETAPA DEL PCR: HIBRIDACIÓN O *ANNEALING*.

Los “Primers” inician la síntesis del ADN complementario en un determinado punto de los enlaces químicos de las hebras que se desdoblaron anteriormente. En esta fase, la temperatura debe bajar a un valor entre 40 °C y 65 °C. La figura siguiente ilustra este efecto.

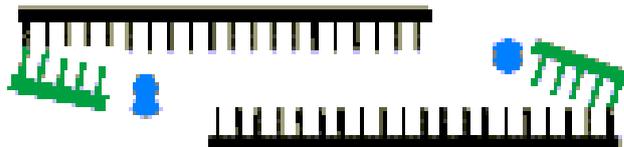


Figura 2.8 Los Primers inician la serie de enlaces químicos en cada una de las hebras únicas formadas en la primera etapa.

TERCERA ETAPA DEL PCR: EXTENSIÓN

Una vez que los Primers han formado los primeros enlaces con la hebra de ADN complementaria, se lleva la muestra a una temperatura de alrededor de los 70 °C o 72 °C para permitir que la enzima Taq polimerasa replique la hebra de ADN. Esta enzima inicia el proceso de sintetización en la zona iniciada por los Primers facilitando la unión por enlaces químicos de los nucleótidos complementarios que se encuentran en la muestra. Se grafica en la figura siguiente.

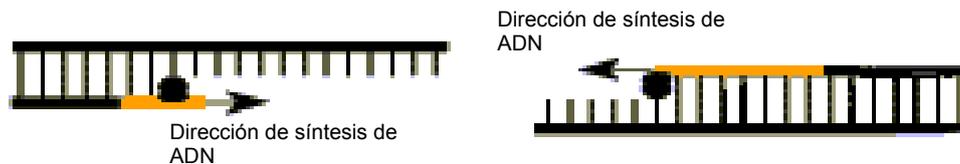


Figura 2.9 Copiado total de las dos hebras de la molécula de ADN.

Estas tres etapas conforman un ciclo. Si se calienta y enfría nuevamente la muestra se desdoblaron las dos cadenas que se han obtenido duplicando al final de la síntesis las moléculas de ADN.

Si se repiten un promedio de 30 veces o más, aumentará de gran manera la proporción de copias de ADN. Debido a que cada ciclo tarda solo unos cuantos minutos, se puede llegar a obtener millones de copias del gen seleccionado en unas pocas horas. En cada ciclo se dobla la cantidad de ADN del ciclo anterior, según la fórmula 2^n , donde "n" es el número de ciclos de tal manera que para "n" ciclos, se obtendrán 2^n copias de ADN.

La temperatura correspondiente a cada paso del PCR debe ser mantenida un tiempo determinado, dependiendo del tipo de muestra a tratar.

2.4. APLICACIONES

El conocimiento de la estructura y función de los genes de cada ser vivo como se ha visto antes, obedece a una determinada secuencia de bases. El grado de multiplicación de estas secuencias de ADN constituye un aporte esencial de esta metodología a la investigación básica en Biología Molecular, gracias a ello se ha logrado muchísimas técnicas como por ejemplo la secuenciación y estudio de los diversos genomas de los seres vivos, nuevas estrategias de diagnóstico en numerosos campos de la medicina. Por ejemplo, existen métodos de detección por PCR de agentes infecciosos como los virus de las hepatitis B y C, del papiloma humano, de

Epstein Barr (causante de la mononucleosis aguda infecciosa) y citomegálico (causante del Herpes) de otros microorganismos patógenos como las clamidias, la bacteria *Escherichia coli* (causante de infecciones intestinales), el vibrión del cólera y los tripanosomas (causante de la Enfermedad de Chagas o del Sueño).

En relación con el SIDA es posible detectar regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) amplificadas por PCR a partir de sangre extraída de pacientes seropositivos. Para ilustrar un caso se puede mencionar, que esta técnica puede ayudar a resolver resultados inciertos provenientes de las pruebas habituales y ha sido aplicada en el diagnóstico de la infección en recién nacidos de madres seropositivas. En tales casos, la prueba de PCR se realiza en los primeros 6 meses de vida y permite descartar si la infección se realizó in-útero o durante el parto.

La técnica PCR también ha facilitado enormemente el diagnóstico de enfermedades hereditarias como hemoglobinopatías (un tipo de anemia), las hemofilias A y B, la distrofia muscular y la fibrosis quística.

En enfermedades oncológicas pueden detectarse, mediante la técnica PCR, mutaciones de oncogenes (literalmente "genes inductores de cáncer") como en el caso del oncogén ras en carcinomas de colon, de páncreas y en leucemias.

Se han implementado métodos que utilizan la PCR destinados a la evaluación del riesgo de padecer trastornos autoinmunes tales como diabetes de tipo I, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple nerviosa.

La PCR se ha sumado a la lista de desarrollos tecnológicos originados en el ámbito industrial que provocaron cambios cualitativos en las ciencias básicas. Uno de los proyectos más ambiciosos de la Biotecnología Moderna es la determinación de la secuencia completa del genoma humano. Esto permite no sólo identificar los genes responsables de numerosas enfermedades hereditarias y trastornos metabólicos, sino descubrir nuevos genes y sus funciones celulares relacionadas. Un paso indispensable para concretar dicho objetivo consiste en realizar un "mapeo" del genoma, es decir, una especie de carta geográfica que permita ubicar los genes con cierta precisión a lo largo de los cromosomas. La PCR se ha revelado como una de las técnicas de apoyo fundamental en tal empresa.

En otro orden, el uso de la PCR puede llegar a cambiar aspectos de la vida del hombre tales como la planificación del sexo de los hijos. En forma piloto, ya se ha utilizado la PCR para determinación prenatal del sexo después de la fertilización in vitro. Con la ayuda de un micromanipulador es posible remover una única célula de un embrión de 10 células, sin afectar el normal desarrollo de las restantes. A partir del ADN de la célula aislada, y en menos de 24 horas, una PCR de 60 ciclos, realizada con *primers* que reconocen secuencias exclusivas del cromosoma y (ausente en las

mujeres) permite diagnosticar el sexo del embrión, para luego implantarlo en la madre. Este procedimiento ha sido utilizado clínicamente para familias con riesgo de padecer enfermedades hereditarias que se manifiestan casi exclusivamente en los varones, con el fin de seleccionar embriones hembra para la implantación. La extensión de este procedimiento a familias sin antecedentes de enfermedades hereditarias, con el simple objetivo de "elegir" el sexo del niño, es sin duda una cuestión ética sumamente polémica.

2.5. EFECTO TERMOELÉCTRICO

La termoelectricidad [45], [46], [57] viene a ser la rama de la termodinámica superpuesta a la electricidad donde se estudian los fenómenos en los que intervienen el calor y la electricidad, el fenómeno más conocido es el de electricidad generada por la aplicación de calor a la unión de dos materiales diferentes. Si se unen por ambos extremos dos alambres de distinto material (este circuito se denomina termopar), y una de las uniones se mantiene a una temperatura superior a la otra, surge una diferencia de tensión o potencial que hace fluir una corriente eléctrica entre las uniones caliente y fría. Este fenómeno se denomina: **Efecto Termoeléctrico**, fenómeno que en un material relaciona el flujo de calor que lo recorre con la corriente eléctrica que lo atraviesa. Este efecto es la base de las aplicaciones de refrigeración y de generación de electricidad donde un material termoeléctrico permite transformar directamente el calor en electricidad, o bien generar frío cuando se le aplica una corriente eléctrica.

Históricamente, el primer efecto termoeléctrico fue descubierto por el físico alemán Thomas Johann Seebeck en 1821. Seebeck se dió cuenta de que una aguja metálica es desviada cuando se le sitúa entre dos conductores de materiales distintos unidos por uno de sus extremos y sometidos a una diferencia de temperatura (Efecto Seebeck). La principal aplicación práctica del efecto Seebeck es la medida de temperatura mediante termopares.

Unos años más tarde, en 1834, el físico francés Jean-Charles Peltier descubrió el segundo efecto termoeléctrico: en la unión de dos materiales diferentes sometidos a una corriente eléctrica aparece una diferencia de temperaturas (Efecto Peltier).

El físico inglés William Thomson (Lord Kelvin) demuestra en 1851 que los efectos Seebeck y Peltier están relacionados: un material sometido a un gradiente de temperatura y recorrido por una corriente eléctrica intercambia calor con el medio exterior. Recíprocamente, un material sometido a un gradiente de temperatura y recorrido por un flujo de calor genera una corriente eléctrica. La diferencia fundamental

entre los efectos Seebeck y Peltier considerados por separado y el efecto Thomson es la existencia de este último en un único material, sin necesidad de que exista una unión entre materiales distintos (Efecto Thomson).

Las aplicaciones actuales son los materiales termoeléctricos, los cuales se basan en dos aspectos del efecto Thomson:

- Por un lado, el establecimiento de un flujo de calor, opuesto a la difusión térmica, cuando un material sometido a un gradiente de temperatura es atravesado por una corriente eléctrica, permite pensar en aplicaciones de refrigeración termoeléctrica.

Para el caso en que no exista gradiente de temperatura, se define la conductividad eléctrica del material (σ).

Estas propiedades son fundamentales en aplicaciones en las que la temperatura debe ser regulada de forma muy precisa y fiable.

- Por otra parte, la posibilidad de convertir un flujo de calor en corriente eléctrica permite aplicaciones de generación eléctrica mediante efecto termoeléctrico. El uso de esta tecnología supondría en estos casos una mejora en el rendimiento energético del sistema completo de manera “limpia”. En varios casos, el calor residual es aprovechado para obtener un mejor manejo de la energía.

Teoría del Efecto Termoeléctrico

Seebeck investigó este fenómeno termoeléctrico determinando que en un circuito cerrado (hecho a partir de dos metales distintos si las juntas de ambos tenían diferentes temperaturas) se generaba una corriente eléctrica, realizando diferentes experimentos para determinar la relación entre esta corriente generada y la diferencia de temperaturas en el circuito dado, llegando a trabajar con diferentes materiales incluyendo los semiconductores naturales de sulfuro de plomo y aleaciones de antimonio de zinc (PbS y ZnSb).

Si se realiza el circuito de la figura 2.10 con dos metales distintos con una diferencia de temperatura aplicada a los extremos fluirá una corriente por el circuito. La magnitud de la corriente resultante dependerá de la diferencia de temperatura pero también de la resistencia de los conductores implicados.

Alternativamente puede tenerse un circuito abierto y en ese caso aparecerá una diferencia de potencial entre los extremos del circuito que dependerá de la temperatura a ambos lados de la junta pero no de la forma o dimensiones de los conductores.

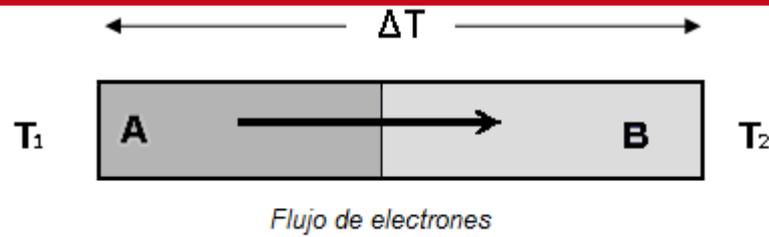


Figura 2.10 Efecto termoeléctrico entre dos materiales A y B. T1: Alta temperatura; T2 Baja temperatura; ΔT : Diferencia de temperatura: $T_1 - T_2$.

Es decir, se generará una fuerza electromotriz o potencial termoeléctrico que en general es función solo de la temperatura en los extremos de la juntura y de los dos materiales conductores. La diferencia de potencial termoeléctrico es conocida como potencial Seebeck o efecto Seebeck.

En la figura 2.11, Si se aplica una diferencia de temperatura ΔT a la juntura, entonces se define la potencia termoeléctrica (o termopotencia) como:

$$\Delta V_{ab} / \Delta T = \text{Potencia Termoeléctrica} \quad (1)$$

Si ΔV_{ab} tiene la polaridad mostrada entonces se dice que la potencia termoeléctrica absoluta (S1) del conductor 1 es positivo respecto del conductor 2 (S2), o sea:

$$S_1 - S_2 = \Delta V_{ab} / \Delta T > 0 \quad (2)$$

Despejando el término anterior podemos hallar el voltaje desarrollado, el cual queda:

$$\frac{\Delta V_{ab}}{\Delta T} = \frac{dV_{ab}}{dT} = S_1 - S_2$$

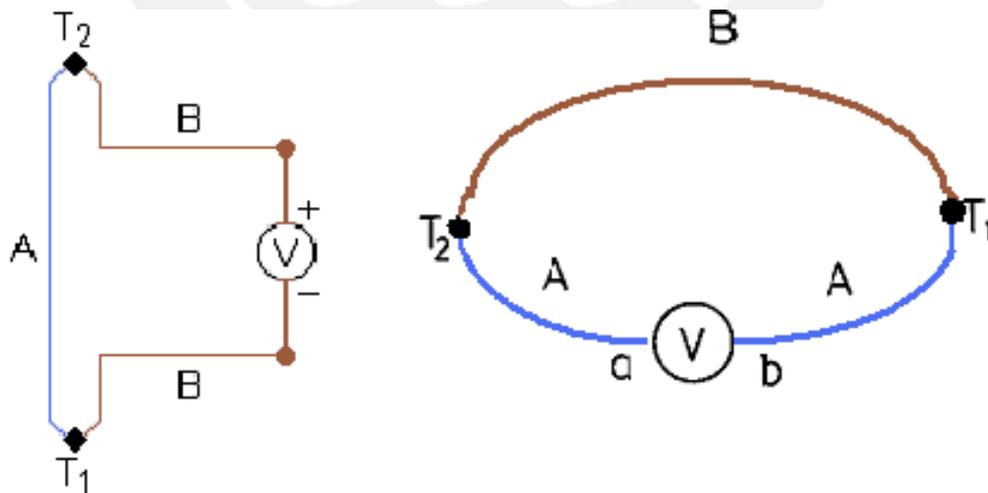


Figura 2.11 Circuito con materiales A y B. V: potencial generado por temperaturas T1,T2. Fuente: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Seebeck_effect_circuit_2.png

Entonces:

$$V_{ab} = \int_1^2 (S_1 - S_2) dT \quad (3)$$

Donde:

- V_{ab} : Voltaje generado
 S_1, S_2 : Coeficientes de Seebeck de los elementos A y B.
 T_1 y T_2 : Temperaturas de las dos juntas.

Los coeficientes Seebeck tienen naturaleza no lineal y dependen de la estructura molecular del material. Si los coeficientes Seebeck son constantes para un rango determinado de temperatura la ecuación anterior se puede aproximar por:

$$V_{ab} = (S_2 - S_1) \cdot (T_2 - T_1) \quad (4)$$

De las ecuaciones (1), (2) y (4) deducimos que si la termopotencia es negativa, el voltaje generado también es negativo y ello se traduce en una corriente eléctrica definida como Q o el flujo de cargas positivas (flujo de electrones tiene dirección opuesta), que va desde el punto frío hasta el caliente, opuesto a la dirección de la corriente térmica. Si Q es positivo las corrientes térmicas y eléctricas fluyen en la misma dirección. De hecho los metales exhiben coeficientes tanto positivos como negativos y para un metal dado, Q puede ser positiva a una temperatura y negativa en otra.

La gran variación en los signos de los coeficientes Seebeck pueden ser explicados por dispersión de electrones: La eficiencia con la que los electrones son dispersados es una función de la temperatura. Este efecto es utilizado en termocuplas en un rango de temperaturas desde $-200\text{ }^\circ\text{C}$ hasta $1600\text{ }^\circ\text{C}$.

Para el Efecto Peltier, se sabe que si una corriente eléctrica pasa de un material a otro (metales o semiconductores) como en la figura 2.12, entonces ocurrirá un flujo de calor dependiendo del flujo de corriente (efecto inverso al de Seebeck). Cuando la corriente I circula a través del circuito, se emite calor en la junta T_2 y se absorbe en la junta T_1 .

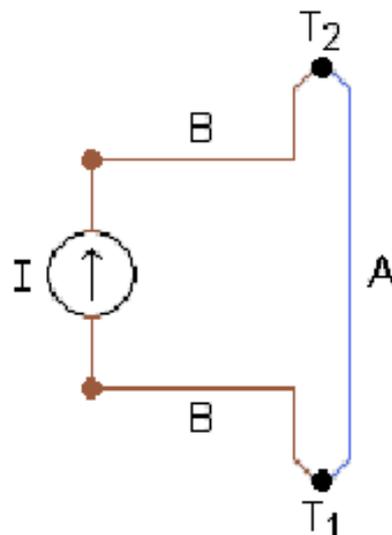


Figura 2.12 Disposición de dos materiales para explicar el efecto Peltier

Definiendo el coeficiente Peltier como la razón entre el flujo de calor y la intensidad eléctrica:

$$\pi = P = \frac{Q}{I}$$

La cantidad de calor absorbido en la junta inferior por unidad de tiempo (flujo o caudal de calor) está dado por:

$$Q = P \cdot I = \pi_{AB} = (\pi_B - \pi_A) \quad (5)$$

Donde:

Q : Densidad de corriente térmica expresada en watts /área y su signo puede ser positivo o negativo. El signo negativo indica flujo de calor en sentido contrario al positivo.

π : Coeficiente Peltier de toda la termocupla.

π_A, π_B : Coeficientes Peltier de cada material. Sus unidades están dadas en voltios.

I : Densidad de corriente eléctrica en Amperios/área.

Los semiconductores tipo 'p' tienen coeficiente Peltier positivo mientras que los semiconductores tipo 'n' tienen coeficientes negativos.

Debe diferenciarse el calentamiento por el efecto Peltier del calor generado por el efecto Joule, que tiene carácter irreversible, y que tiene como origen la resistencia interna de todos los elementos conductores. El calor total en un tiempo t por el efecto Joule en un conductor es proporcional al cuadrado de la corriente que circula por el mismo por unidad de tiempo.

$$Q = \frac{V^2}{R} \cdot t = I^2 \cdot R \cdot t$$

Esto significa que el efecto Joule está presente siempre, sin importar la dirección del flujo de corriente en la sustancia y es considerado siempre como una cantidad positiva.

El efecto Peltier depende tanto del sentido del flujo de corriente como de la magnitud de la misma y es un fenómeno reversible por generarse calor en sentido negativo a diferencia del efecto Joule.

En presencia de una densidad de corriente J a través de un conductor homogéneo, la producción de calor por unidad de volumen es:

$$q = \rho \cdot J^2 - \mu \cdot J \frac{dT}{dx} \quad (6)$$

Donde:

q : Flujo de calor.

ρ : Resistividad del material.

- $\frac{dT}{dx}$: Es el gradiente de temperatura a lo largo del elemento (x).
- μ : Coeficiente de Thomson.
- J : *Densidad de corriente*

El primer término es dependiente de la resistividad eléctrica (o conductividad eléctrica $\sigma = 1/\rho$) y del cuadrado de la corriente e independiente del gradiente de temperatura. Esto constituye el **efecto Joule**.

El segundo término depende de la densidad de corriente y del gradiente de temperatura. Esto constituye el calentamiento termoeléctrico cuyo signo depende de la dirección de la corriente y del gradiente de temperatura relativo uno respecto del otro. El coeficiente μ en el segundo término es el **coeficiente Thomson** y depende de la temperatura del conductor.

La ecuación (6) es considerada como la ecuación fundamental de la termoelectricidad. Efectivamente, al asumir que el efecto Joule y Thomson pueden ser adicionados es equivalente a asumir que la entropía irreversible correspondiente al calor de Joule puede ser adicionado a la entropía reversible asociada al efecto Thomson por métodos más sofisticados.

Adicionalmente Thomson derivó las siguientes relaciones entre el efecto Thomson y los coeficientes Seebeck y Peltier:

$$\mu = \frac{TdS}{dT} \quad (7)$$

$$\Pi = TS$$

Celdas Peltier. Descripción y Funcionamiento

Basándose en el principio físico descubierto por Peltier, se diseña un dispositivo en base a semiconductores, empleándose comúnmente en su construcción el Bismuto de Teluro tipo 'n' y tipo 'p' unido a una placa metálica de Cobre. Para explicar el funcionamiento de una celda Peltier consideremos primero sólo un material tipo 'n' acoplado a dos placas metálicas en sus extremos [36], y éstos conectados a una fuente de voltaje DC. Al ser un circuito cerrado, se genera una corriente eléctrica en un sentido que en promedio puede llegar a tener un valor de 5 Amperios. Al pasar la corriente de la placa metálica al semiconductor, es decir de un tipo de material a otro, como se define el Efecto Peltier, se genera un intercambio de calor de la manera como se muestra en la figura 2.13.

En el caso de usar un semiconductor tipo 'p', figura 2.14, se producen los mismos efectos físicos de generación de corriente e intercambio de calor pero este último tiene sentido opuesto al del caso anterior.

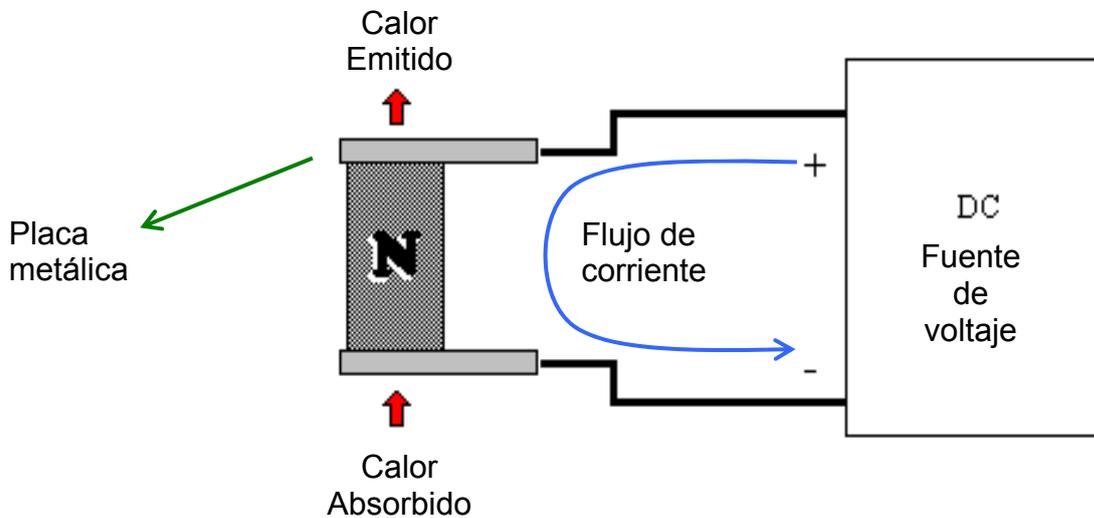


Figura 2.13 Flujo de corriente (en azul) y flujo de calor en un material semiconductor tipo 'n' unido por una placa metálica a una fuente de voltaje DC.

El flujo de calor generado por el paso de corriente a través de una sola pastilla semiconductor no es suficiente ni siquiera para un objeto de dimensiones superiores a 1cm, por lo que puede pensarse en un arreglo en paralelo de estos componentes como muestra la figura 2.15. Sin embargo, la solución es impráctica, ya que una sola pastilla semiconductor necesita alrededor de 50 mV para generar entre 4 a 5 Amperios aproximadamente llevando por consiguiente a que un arreglo de 254 pastillas – cantidad que cumple con cubrir una superficie útil y absorber una

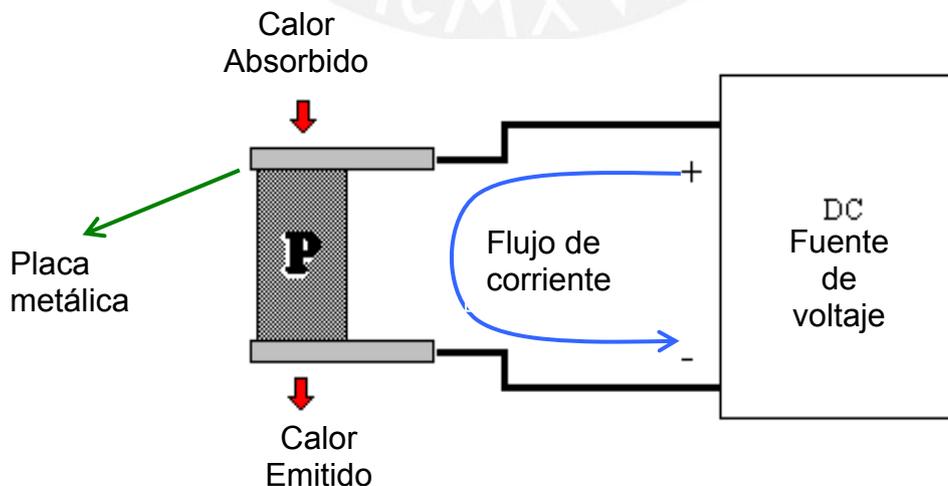


Figura 2.14 Flujo de corriente (en azul) y flujo de calor en un material semiconductor tipo 'p'.

cantidad de calor apreciable- consume alrededor de 1270 Amperios. La fuente de voltaje para este caso está fuera de toda aplicación práctica y real.

Se puede efectuar una conexión eléctrica entre las pastillas semiconductoras de tal manera que todas estén en paralelo eléctrico, lográndose a su vez que estén en paralelo térmico.

El mismo efecto se produciría si se trabaja con semiconductores tipo 'p'.

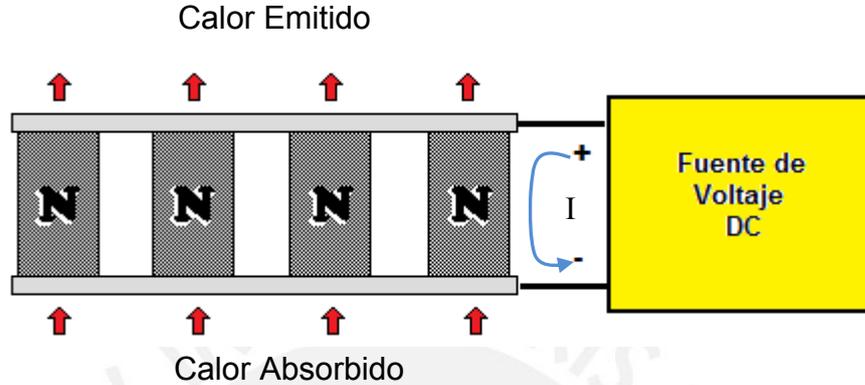


Figura 2.15. Configuración de pastillas semiconductoras en paralelo eléctrico y térmico. I representa el sentido del flujo de corriente.

Para solucionar el problema técnico de la configuración anterior se puede colocar las pastillas en serie desde el punto de vista eléctrico pero en paralelo desde el punto de vista térmico (figura 2.16). Para ello simplemente habría que realizar la conexión eléctrica entre la parte inferior de una pastilla con la superior de la siguiente a manera de zigzag.

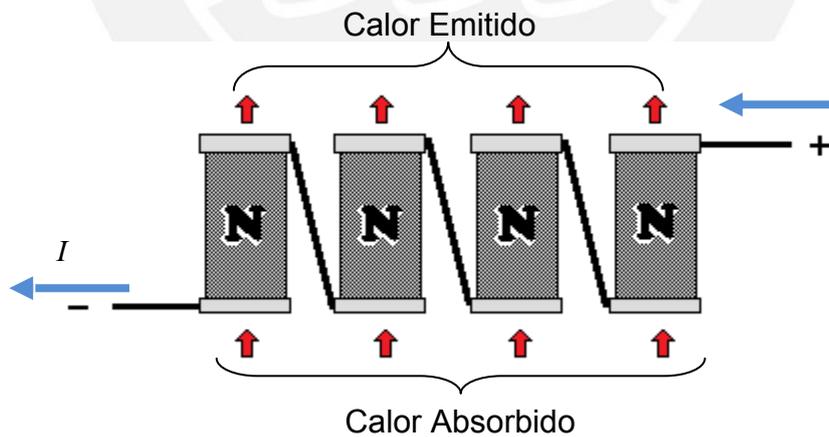


Figura 2.16. ' I ' representa el sentido del flujo de corriente. Con esta configuración se puede generar un flujo de corriente considerable.

Sin embargo la conexión eléctrica misma produce que el extremo superior se encuentre a una temperatura mayor (por ser el extremo que emite calor) que el extremo inferior (en este lado se absorbe calor), lo cual se define como un corto

circuito térmico (figura 2.17). Este corto térmico afecta el rendimiento del dispositivo general.

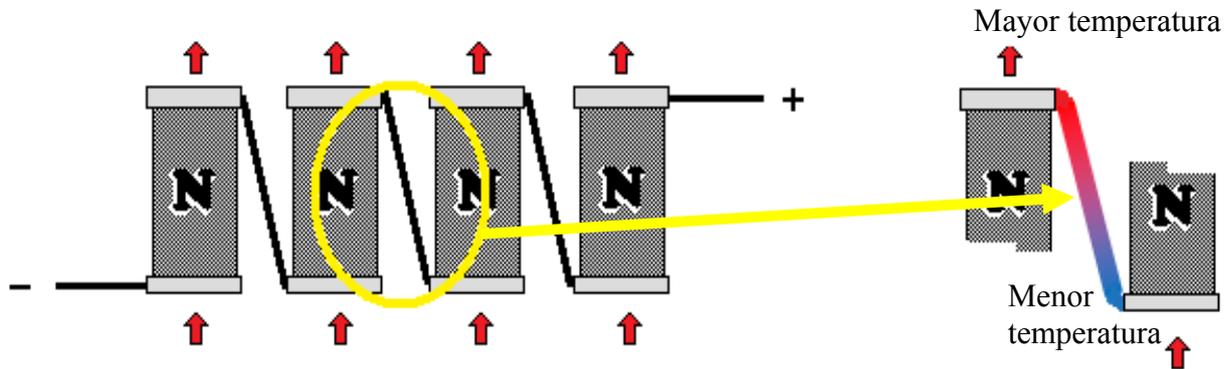


Figura 2.17 Corto térmico en el material conductor que une dos pastillas semiconductoras.

Esta dificultad se resuelve utilizando los dos tipos de material semiconductor para las pastillas: el tipo 'n' y el 'p', conectándolos en pares y formando una conexión eléctrica en serie (figura 2.18) pero manteniendo el paralelo térmico.

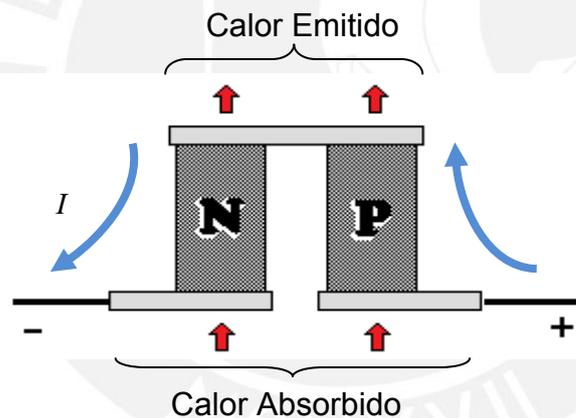


Figura 2.18 Configuración de pastillas semiconductoras en serie eléctrica y paralelo térmico. *I* representa el sentido del flujo de corriente.

Es así que la construcción final de una celda Peltier consta de pares de estos arreglos de semiconductores 'n' y 'p', dispuestos eléctricamente en forma serial, pero en paralelo térmico (figura 2.19) llegando a consumir corrientes de hasta 5 Amperios con un valor de fuente de voltaje de 12 voltios por lo general, valores que pueden ser manejados de manera práctica.

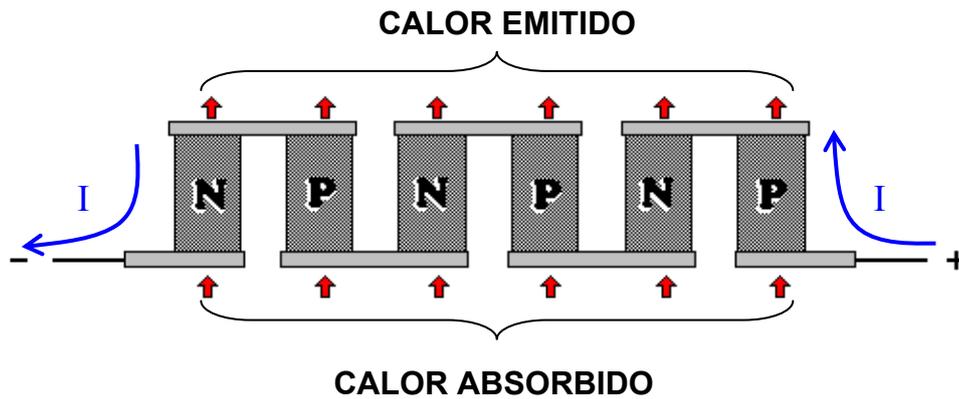


Figura 2.19. Configuración final de pastillas semiconductoras

Por ende, se observa que las uniones superiores de cada par de semiconductores estarán unidas por un solo material cerámico que recibe el nombre de sustrato cerámico. Este material constituye un lado de la celda Peltier y recolectará todo el calor emitido o absorbido, generando que un lado caliente o enfríe respectivamente.

La cantidad de pares de pastillas semiconductoras depende del modelo de celda Peltier y el fabricante lo determina para que genere un flujo determinado de calor sobre una superficie determinada de sustrato cerámico. Las dimensiones de esta superficie cerámica también están definidas por la superficie de contacto que debe existir entre la celda Peltier y el objeto a enfriar o calentar (ver Anexo con detalles de productos del fabricante MELCOR).

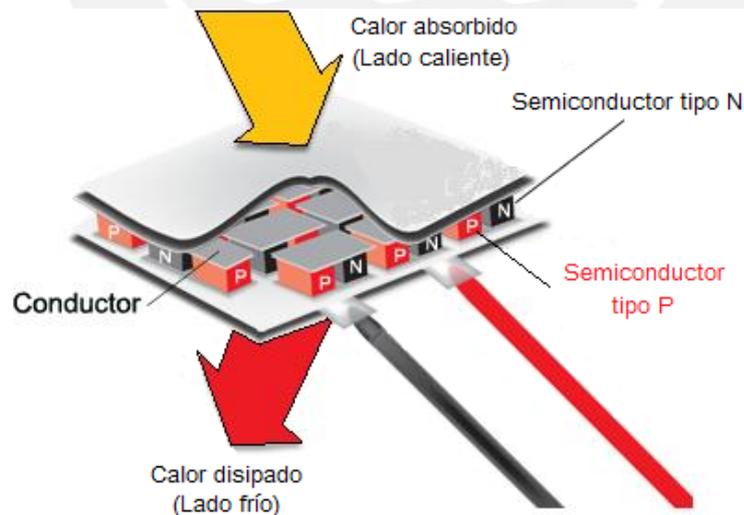


Figura 2.20 Sustrato cerámico que une las pastillas semiconductoras. Fuente para el gráfico: [57]

Al cambiar la polaridad en los terminales de la celda Peltier, cambia el sentido de la corriente y con ello cambia el sentido del flujo de calor, Es decir, basándonos en la

figura 2.20 el flujo de calor sería desde abajo hacia arriba y la superficie inferior se convierte en el lado frío (Cold side) y el superior el lado caliente (Hot side)

Al momento de absorber calor de una superficie de la celda Peltier y disiparlo por la otra superficie de la celda es necesario el uso de un disipador de calor de una mayor superficie en combinación con un ventilador para evacuar el calor del disipador, de lo contrario el mismo disipador podría recalentar y con ello disminuir el rendimiento de la celda Peltier. El esquema de construcción básico se muestra en la figura 2.21 en donde el objeto a enfriar/calentar lo constituye el bloque metálico para los tubos portamuestras con el ADN y el disipador de calor de aluminio y el ventilador completan el ensamble y equivalen al bloque en rojo indicado como abreviadamente como disipador.

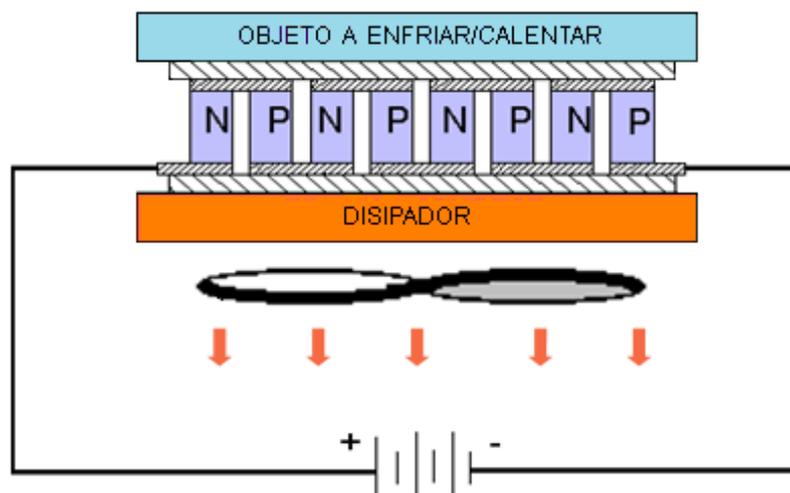
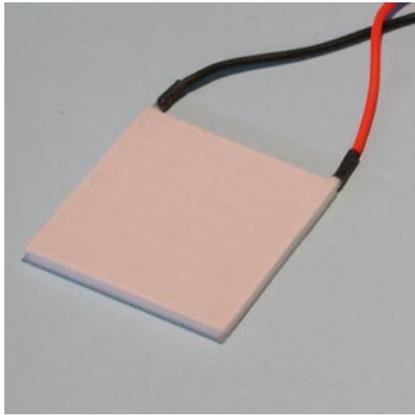


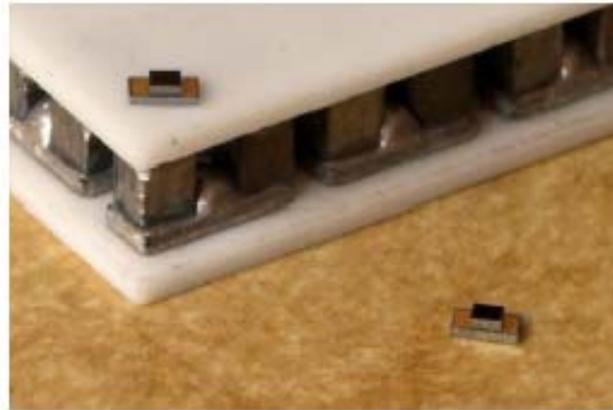
Figura 2.21. Estructura de celda Peltier con sistema de ventilación

La celda Peltier estándar (figura 2.22a) tiene dimensiones que van por lo general desde 15mm x 15mm y una altura de aproximadamente 4mm, que lo hace atractivo a numerosas aplicaciones por el poco espacio que ocupa.

En los últimos años, nuevas técnicas de construcción han permitido el desarrollo de celdas Peltier a escalas micrométricas, como se ve en la figura 2.22b, alcanzando dimensiones son 0.65 mm × 0.55 mm × 0.424 mm inclusive.



(a)



(b)

Figura 2.22. (a): Celda Peltier estándar. (b): Refrigeradores termoeléctricos de dimensiones micrométricas, comparados con celdas estándar.

2.6. ONDA PWM

La PWM [26], [27] es una técnica de modulación no lineal que genera una señal cuadrada de frecuencia fija (periodo fijo) pero con ciclo de trabajo (duty cycle) variable [2].

El ciclo de trabajo se define como el porcentaje del Periodo que la señal se mantiene activa, en alta o con valor positivo. El valor que puede tomar está en el rango de 0% a 100% y viene dado por la siguiente ecuación:

$$\text{Ciclo de trabajo} = \text{Periodo} \cdot \frac{H}{100} \quad (8)$$

La modulación tiene como origen la comparación de dos niveles de voltaje: El primero lo constituye una onda tipo diente de sierra de periodo fijo que determina el periodo o la frecuencia de la onda resultante a la salida, y el segundo un voltaje variable.

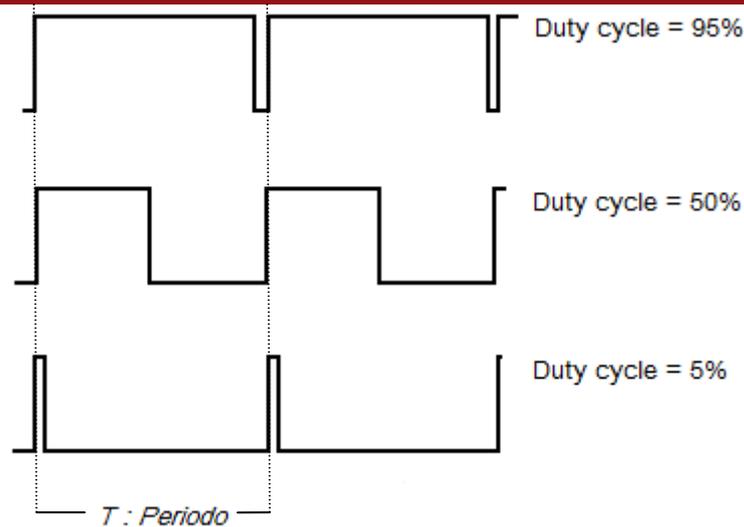


Figura 2.23. Se muestra como ejemplo 3 ondas con ciclo de trabajo o duty cycle distintos. Nótese que el periodo se mantiene igual en los tres casos.

Si ambas señales ingresan a un comparador la señal de salida se irá a alta cada vez que la onda triangular supere en valor al voltaje variable.

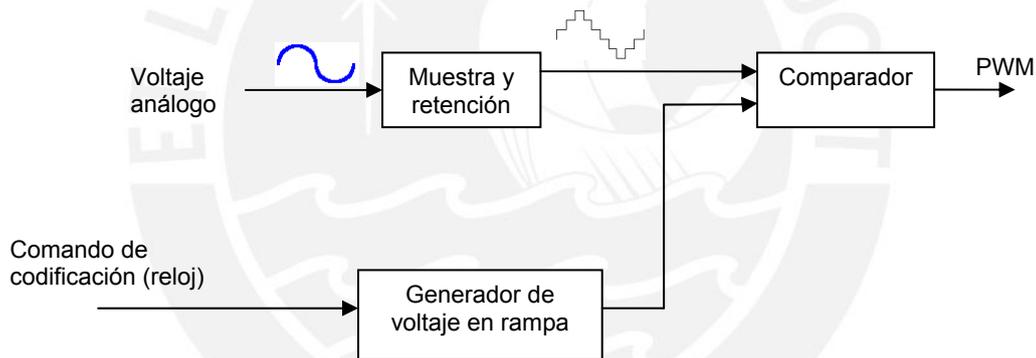


Figura 2.24. Método usual de generación de PWM. El comparador es un amplificador que opera entre dos valores dependiendo de si el voltaje en rampa excede el nivel de voltaje de entrada. (Textos y definiciones de “Sistemas de Comunicación” – Ferrel G. Stremler)

Un análisis de Fourier de una señal típica PWM con Periodo = T , muestra que hay una señal pico en la Frecuencia $F = 1/T$ y armónicos en $F = K/T$ [donde K es entero, $K = 2, 3, 4, \dots$]. Estos picos son señales no deseadas y deben ser eliminadas.

Siempre que la frecuencia de la señal base cumpla con el requisito de:

$$F_{PWM} \gg F_{DW} \rightarrow F_{PWM} = K * F_{DW}$$

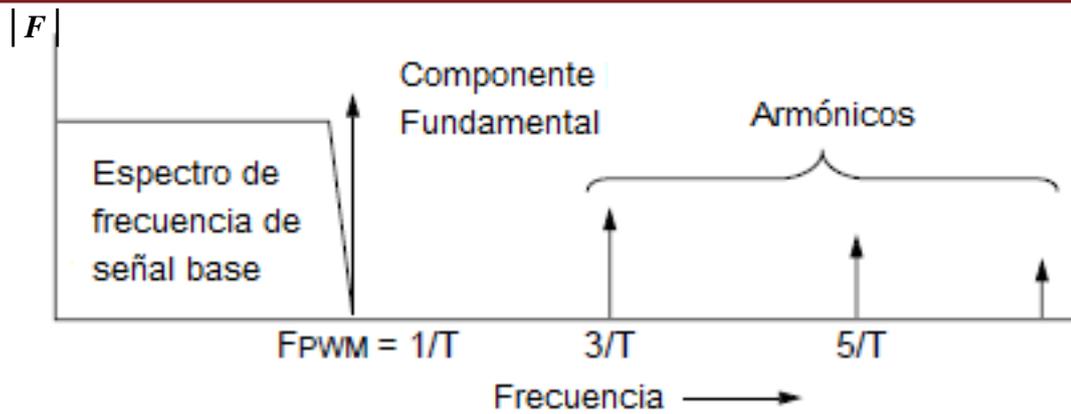


Figura 2.25. Espectro de frecuencia de una señal PWM típica

Donde: $K \gg 1$

Para eliminar estos armónicos debe emplearse un filtro pasabajos en la siguiente etapa a la salida de la onda PWM como se detallará más adelante.

2.7. FILTRO PASABAJO PARA PWM [3], [26]

La señal de salida PWM debe pasar por una etapa de filtraje para convertir la salida del puente-H a un voltaje DC de manera semejante a un amplificador Clase D [31] [41], eliminando así los armónicos mostrados en el capítulo anterior. Un filtro pasabajos atenúa la señal en el espectro de frecuencia en la banda de paso, desde 0 hasta f_c . La frecuencia f_c recibe el nombre de frecuencia de corte. La atenuación de ahí en adelante cambia disminuye a una razón dependiendo del tipo de filtro. Un filtro pasabajos clásico tiene una gráfica de Bode [14] de la magnitud de la función de transferencia de manera similar a como se muestra en el siguiente gráfico.

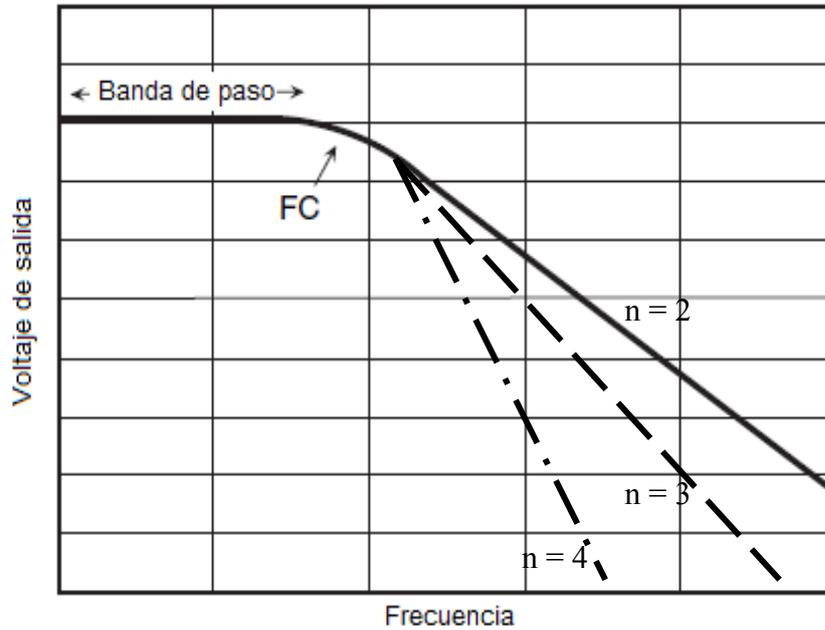


Figura 2.26. Filtro pasabajo y frecuencia de corte. 'n' indica el orden del filtro.

El tipo de filtro determina que grado [30] tiene el mismo. El orden indica el exponente de la ecuación característica del filtro. Así, tenemos que:

Expresión cuadrática = Filtro de segundo orden

Expresión cúbica = Filtro de tercer orden

Un filtro resistivo – capacitivo (RC) es de primer orden como se puede ver del único polo en su ecuación característica:

$$FT = \frac{1}{1 + sRC} \quad (9)$$

Donde:

- R: Elemento resistivo.
- C: Elemento capacitivo.

Otra configuración está definida por una red LC que constituye un filtro de segundo orden según se aprecia en la función de transferencia siguiente:

$$FT = \frac{1}{1 + s^2LC} \quad (10)$$

Donde:

- L: Elemento inductivo.
- C: Elemento capacitivo.

Para una red pasiva LC con terminación simple, como se muestra en la configuración de la figura 2.27, se definen los componentes del filtro de acuerdo a la tabla 2.1. El

orden del filtro está determinado por el número de pares LC en la red [3] de acuerdo a la nota de aplicación 32 de Apex Technology que también se encuentra en el anexo.

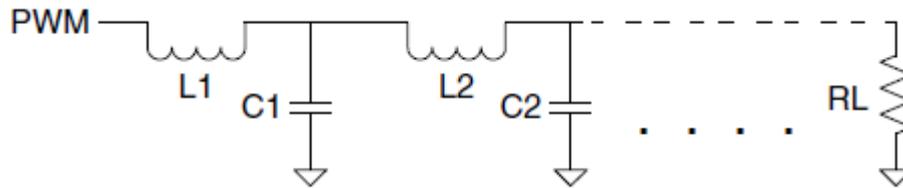


Figura 2.27. Configuración de red LC con terminación simple para la carga representada por RL.

El cálculo de los valores de dichos componentes viene dado por las ecuaciones 11 y 12, en donde la cantidad de pares de componentes LC definirá el orden del filtro. RL representa a la resistencia de carga que en este caso particular corresponde a la resistencia de la celda Peltier.

Tabla 2.1: Coeficientes estándar del filtro LC.

ORDER	L1	C1	L2	C2	L3	C3
1	1					
2	1.4142	.7071				
3	1.5	1.3333	.5			
4	1.5307	1.5772	1.0824	.3827		
5	1.5451	1.6944	1.382	.8944	.309	
6	1.5529	1.7593	1.5529	1.2016	.7579	.2588

Fuente: [2], [3].

$$L = \frac{COEF * R_L}{2 * \pi * F} \quad (11)$$

$$C = \frac{COEF}{2 * \pi * F * R_L} \quad (12)$$

Donde:

L: Inductor del filtro(Henrios)

C: Capacidad del filtro (Faradios)

RL: Resistencia de carga (Ohmios)

COEF: Valor normalizado de L o C

F: Frecuencia de corte

Sin embargo, para circuitos de puente H completos se utiliza una configuración diferencial [2], [3] de la red LC (figura 2.28) dividiendo para ello el valor de la inductancia calculado a partir de la tabla 2.1 y la ecuación 11, entre dos, manteniendo sin embargo el valor de los Condensadores C1 y C2. Una configuración semejante para un filtro de una celda Peltier se considera en el Reporte de Aplicación de Setiembre del 2001 de Texas Instruments [56] en el que se usa el microcontrolador

UC3638 para controlar una celda Peltier o en la nota de aplicación 1757 de Dallas Semiconductor [10]. En estos dos últimos casos el control del ciclo de trabajo (duty cycle) de la frecuencia del PWM se define por componentes pasivos y no son valores programados como es materia del presente trabajo.

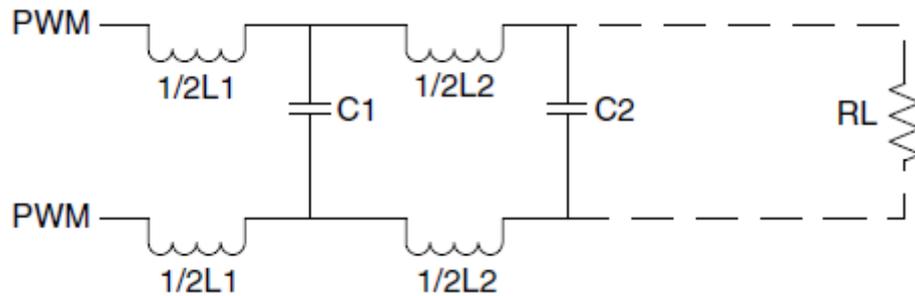


Figura 2.28. Red LC diferencial para puente completo. Nótese el valor de L_1 y L_2 correspondiente al valor calculado entre dos [3]. R_L es la carga o celda Peltier.

Para un filtro de segundo orden se puede tener una variante, al agregar dos condensadores Cleg entre un extremo de cada bobina y tierra como se muestra en la figura 2.29. Estos condensadores filtrarán los armónicos de alta frecuencia que estén presentes en la onda PWM. Sus valores se pueden aproximar como un 10% del valor de C_2 . Al igual que en la figura anterior, R_L es la resistencia de la carga o celda Peltier.

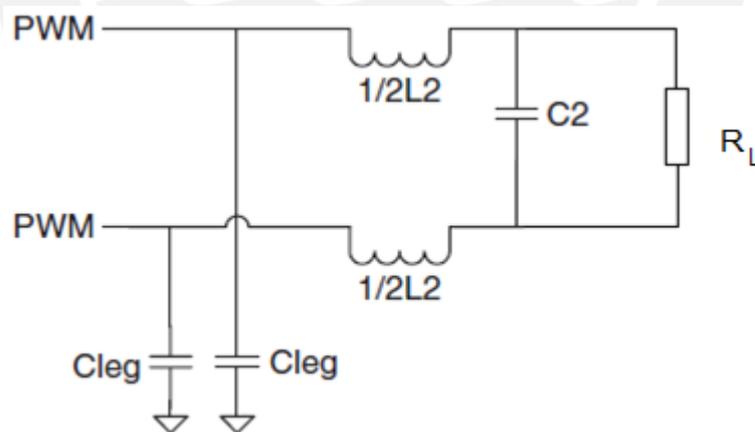


Figura 2.29 Filtros capacitores de ruido de alta frecuencia en modo común [3].

2.8. ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE CALOR EN MATERIALES METÁLICOS

Las muestras de ADN se deben colocar en unos microtubos y éstos deben colocarse en un bloque o bandeja metálica porta-muestras. Para tal fin, se mecanizó un bloque sólido de metal, ya que éste no se encuentra disponible comercialmente en el mercado local y que constituye un primer modelo o prototipo para futuros estudios que lleven a su diseño y fabricación.

La elección del material a usar pasó por la determinación del mejor elemento conductor de calor, ya que éste sería el componente que recibiría el calor transmitido desde el Peltier hacia los microtubos. Para ello es imprescindible analizar la conductividad térmica de distintos materiales ya que por definición la conductividad térmica está definida como la cantidad de calor que en cada segundo pasaría a través de una unidad de superficie, si la diferencia de temperatura entre ambas superficies valiera la unidad. En el Sistema Internacional de unidades está expresado en W/m.K [54]. La tabla 2.2 recoge los valores de conductividad térmica para algunos materiales que permitirán escoger el más adecuado en donde CuSil es el nombre de una aleación de 72% Plata y 28% Cobre.

Tabla 2.2: Coeficientes de conductividad térmica

ELEMENTO	CONDUCTIVIDAD TÉRMICA (W/m/K)
Oro	317
Plata	429
Aluminio	237
Cobre	390
Platino	70
Vidrio	1
CuSil*	>430

Fuente: Instituto Tecnológico de Massachusetts.

2.9. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo general

El objetivo del trabajo consiste en construir un módulo programable que realice el control de cambios de temperatura sobre un bloque metálico portador de micro tubos que contienen muestras de ADN, con el fin de ejecutar un protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa, para lograr la replicación de segmentos específicos de la molécula de Ácido Desoxirribo Nucleico (ADN).

Objetivos específicos

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

1. Diseño e implementación del software que soporte el programa para un protocolo de PCR de un rango de temperaturas, entre 0°C y 96°C, de acuerdo a las etapas del proceso y del protocolo de uso.
2. Diseño e implementación de la etapa de control y potencia del proceso de PCR para el módulo.
3. Construcción de un bloque metálico; que incorpore las celdas Peltier para la transferencia de calor, con los alojamientos apropiados para la ubicación de micro-tubos con muestras de agua que simulan las muestras de ADN,
4. Lograr velocidades de calentamiento o enfriamiento de aproximadamente 1°C/s o mayores.
5. El rango de la precisión de temperatura será de $\pm 1^\circ\text{C}$.
6. Presentar una interfaz de usuario de fácil manejo con teclado numérico y un visualizador gráfico de pantalla de cristal líquido para poder hacer la programación de los ciclos del PCR.

3. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN

El esquema global del sistema se define por el diagrama de bloques de la figura 3.1 donde se identifican todas las etapas componentes: el controlador que manejará todos los recursos del sistema, el teclado o dispositivo de entrada de datos, la pantalla de visualización o dispositivo de salida de datos, una etapa de potencia para controlar el dispositivo transmisor de calor, una etapa de transmisión de los datos de temperatura a una PC por el puerto serial para su posterior gráfica y análisis, un bloque metálico conteniendo al elemento transmisor de calor y que es donde se colocan las muestras de ADN y, finalmente, un sensor de temperatura colocado en dicho bloque metálico que actuará como realimentación en el sistema.

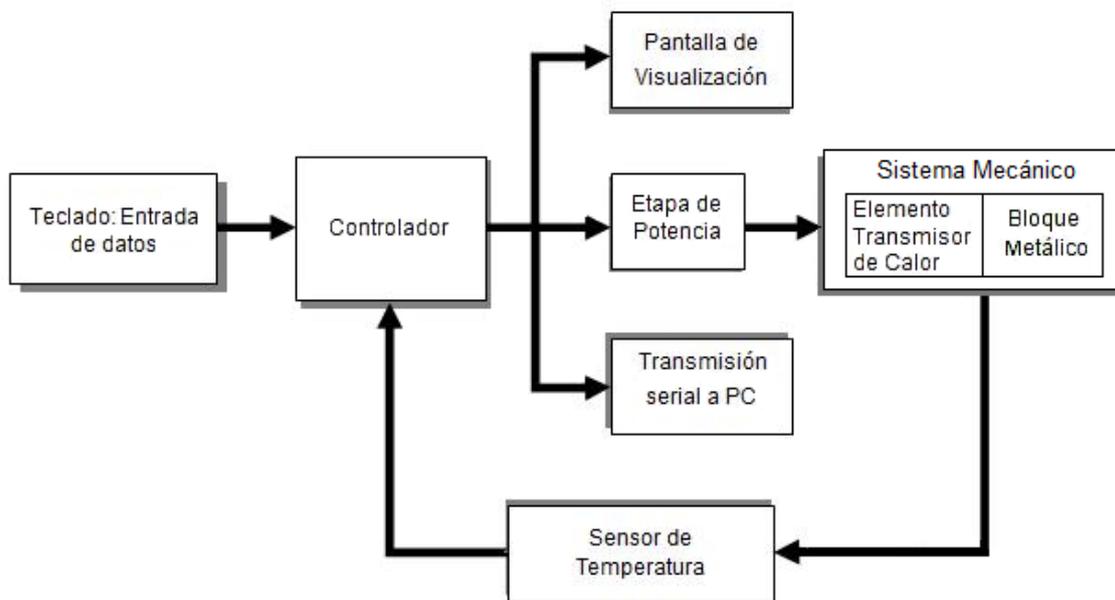


Figura 3.1 Diagrama de bloques general del sistema.

En la transmisión de datos al puerto serial de la PC no se considera como objetivo de la presente tesis el desarrollo de una aplicación o interfaz de usuario en la PC que permita visualizar el estado actual o la gráfica en tiempo real del proceso de PCR. Se desarrolla a continuación cada una de las etapas del esquema mostrado empezando por la etapa más crítica que define el tipo de dispositivo o elemento que generará el intercambio de calor.

3.1. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MECÁNICO

Efectuar el proceso de PCR requiere un sistema que pueda controlar de manera precisa las temperaturas a las que se debe calentar un conjunto de muestras de ADN, siguiendo un determinado patrón (figura 2.9) y poder repetir este proceso repetidas veces (generalmente más de 15). Se analizó la factibilidad de las diversas tecnologías para generar y controlar cambios de temperatura en un bloque sólido. Inicialmente se consideró la elaboración de un sistema resistencia/aire en la que una resistencia caliente la muestra y el enfriamiento se realicen por ventilación forzada. También se consideró un sistema de enfriamiento tipo "baño maría". En ambos casos la solución, complica mecánicamente al sistema al agregar un ventilador para enfriamiento cuya implementación previa es requisito fundamental y el "baño maría" hace más complejo el sistema al involucrar un líquido. Es así que la mejor alternativa la constituye el uso del dispositivo conocido como celda Peltier, llamado también dispositivo termoelectrico Peltier o TEC (del inglés Thermoelectric Cooler) que permite diseñar un equipo portátil, eficiente, de bajo coste cuyo control de temperatura se realizará mediante el control de la magnitud y sentido de la corriente (figura 2.17) que por ella circula como se estableció en el capítulo 2.5.

3.1.1. DISPOSICIÓN DE CELDAS PELTIER

La elección de la celda Peltier dependerá de la cantidad de calor necesaria que hay que transferir al bloque metálico portamuestras para alcanzar la temperatura objetivo. Debido a no tener antecedentes de trabajos o modelos de Celdas Peltier en conjunto con un bloque metálico portamuestras, recurrimos a la información contenida en el Thermoelectric Handbook del fabricante Melcor [22], en donde se define el tiempo que demora el cambio de temperatura de un objeto con la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(m C_p \Delta T)}{Q} \dots \dots \dots (1)$$

Donde:

m : Peso del objeto en Kg.

C_p : Calor específico del material (J/(Kg K)).

ΔT : Cambio de temperatura del objeto en grados Kelvin.

Q : Calor que se agrega o evacúa.

t : Tiempo que demora el cambio de temperatura en segundos.

Como se verá en el siguiente capítulo, se logró construir un modelo de bloque metálico de plata con un peso aproximado de 320 gr (0.32 Kg). El valor del calor específico lo obtenemos de la tabla del mismo Thermoelectric Handbook y que es igual a 235 J/(Kg K) y el valor de ΔT lo asumimos como la diferencia de temperatura entre las etapas de Desnaturalización e Hibridación, que a la vez constituye el máximo cambio de temperatura dentro de un ciclo de PCR. Tomando dos valores típicos de temperatura para estas etapas podemos aproximar el valor de ΔT en $90^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C} = 40^{\circ}\text{C}$ y despejando el valor de Q de la ecuación anterior, tenemos:

$$Q = m C_p \frac{(\Delta T)}{t} = 0.32 \times 235 \times 1 = 75.2 \text{ W}$$

En donde la expresión $(\Delta T/t)$ corresponde a la velocidad de cambio de temperatura y que se definió en 1°C/s .

Esa cantidad puede tomarse como una aproximación ya que ese calor no es una cantidad fija sino que varía con el valor de ΔT . De hecho se aproxima con el valor promedio indicado en [22].

De acuerdo al catálogo de celdas Peltier del fabricante Melcor, vemos que existen las series CP, UltraTEC, SH, PolarTEC, ZT, en donde cada una de ellas está caracterizada por la cantidad de corriente, flujo de calor, dimensiones y geometría específica para cada aplicación. Escogemos la serie CP por ser la de tecnología estándar que tiene mayores opciones de capacidades de bombeo de calor, tamaño, voltaje y corriente. En la mayoría de casos, el voltaje aproximado máximo entre sus terminales es de 15.4V de tal manera que podemos utilizar fuentes de voltaje continuo estándar de inclusive 12V sin perjudicar de gran manera el rendimiento del sistema. Dentro de esta serie podemos encontrar las alternativas de la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Celdas Peltier del fabricante MELCOR.

Modelo	Qmax (W)	I _{max} (A)	V _{max} (V)
CP 0.8-127-05L	22.6	2.6	14.4
CP 0.8-254-06L	36.2	2.1 / 4.2	30.8 / 15.4
CP 1.2-161-04L	69.3	7.3	18.3
CP 1.4-127-10L	33.4	3.9	15.4
CP 2-71-06L	67	14	8.6

Fuente: *Melcor CP Series Table List* [22].

Todas las celdas de la tabla tienen una superficie cuadrada con un lado menor a 44mm de tal manera que el espacio ocupado se ajustará a las dimensiones del bloque metálico de plata o aluminio que se tratará en las siguientes secciones. La única excepción la constituye la celda CP 0.8-254-06L que tiene una superficie rectangular de 50mm x 25mm ya que consta de dos celdas Peltier en un solo encapsulado.

De todas estas opciones seleccionamos dos celdas modelo CP 1.4-127-10L que puede remover un máximo de 33.4W y mantener un ΔT_{max} de 70°C.

Ambas celdas tendrán circuitos de control idénticos. Sin embargo por cuestiones de presupuesto en la importación de algunos insumos se desarrollará e implementará el circuito con una sola celda Peltier.

Adicionalmente, pondremos a prueba la celda Peltier modelo CP 0.8-254-06L que tiene una capacidad de evacuación de calor de 36.2W con una corriente máxima de 4.2A, pero cuyo efecto sobre la evolución de la temperatura, es decir, la influencia sobre la gráfica tiempo versus temperatura del sistema se quiere conocer. Esta última celda es una celda doble con cuatro terminales, como si fueran dos celdas Peltier, los que pueden conectarse en serie o en paralelo eléctrico [58]. La conexión que se realizó fue en paralelo eléctrico.

3.1.2. BLOQUE SÓLIDO DE ALUMINIO

Con el fin de trabajar con un bloque metálico uniforme en todas sus dimensiones, empleamos en primer lugar un bloque metálico de prueba del fabricante MELCOR [22]. Este accesorio está maquinado en Aluminio puro. El bloque de prueba, figura 3.2, cuenta con un agujero en la parte lateral para colocar un sensor de temperatura y dos agujeros adicionales para asegurar el bloque a un disipador por medio de tornillos. En esta configuración utilizamos un bloque separador, construido también en Aluminio puro, que mantiene las superficies fría y caliente alejadas entre sí, evitando el intercambio de calor entre el bloque metálico (superficie caliente) y el disipador de calor (superficie fría).

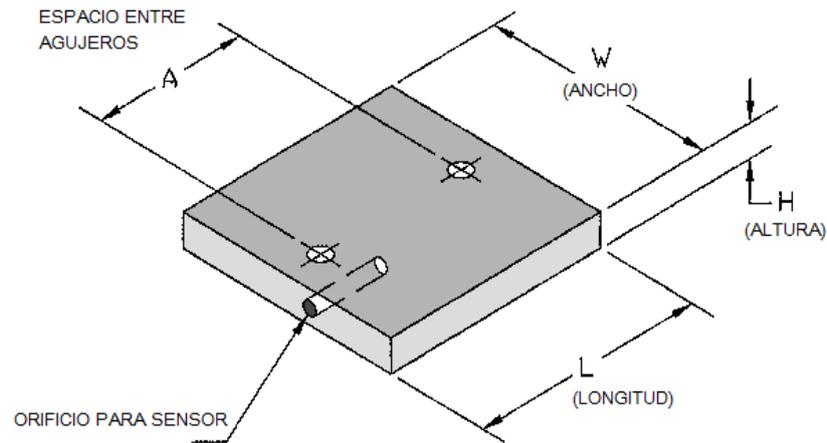


Figura 3.2 Características mecánicas del bloque de prueba modelo CB-201-CL y del separador modelo SB-201-CL del fabricante MELCOR [22].

Siguiendo la nomenclatura de la figura 3.2, las dimensiones del bloque de prueba modelo CB-201 CL son:

- W = 76mm;
- L = 76mm;
- H = 6.4mm;
- A = 51mm.
- Ø del orificio para sensor = 1.58mm;
- Profundidad= 18mm

La profundidad del orificio confeccionado para el sensor permite colocar al mismo exactamente encima de la celda Peltier y así efectuar la medición de la temperatura de manera óptima. El orificio, sin embargo, resultó muy angosto para el sensor por lo que se taladró y se amplió el diámetro hasta aproximadamente 2mm como se ve en la figura 3.4.

En el agujero también se colocó pasta térmica marca Miyako para mejorar el contacto entre el mismo sensor y la superficie metálica interna.

Las características del bloque separador modelo SB-201 CL son:

- W = 41mm;
- L = 57mm;
- H = 12.7mm;
- A = 51mm.
- Orificio para sensor Ø= 1.58mm;
- Profundidad= 18mm

La figura 3.3 muestra una vista del perfil de esta configuración y puede apreciarse la distancia entre ambos componentes (1 y 3) y como el separador (2) es esencial dentro de esta estructura.

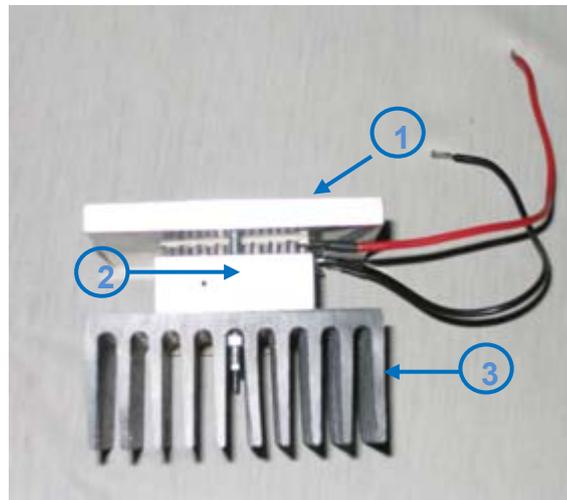


Figura 3.3 Perfil de la figura anterior. Se aprecia el bloque de prueba de aluminio (1), el bloque separador (2) y el dissipador de calor (3).

La celda Peltier se encuentra debajo del bloque de prueba (1) y encima del bloque separador (2). En ambas superficies de la celda Peltier se colocó una capa de pasta térmica marca Miyako al igual que en la superficie de contacto entre el bloque separador y el dissipador de calor como lo muestra la figura 3.5. No aparece en las figuras pero adosado al dissipador de calor se colocó, posteriormente al ensamble de los componentes metálicos, un ventilador de 12V que evacuará el calor de manera óptima.

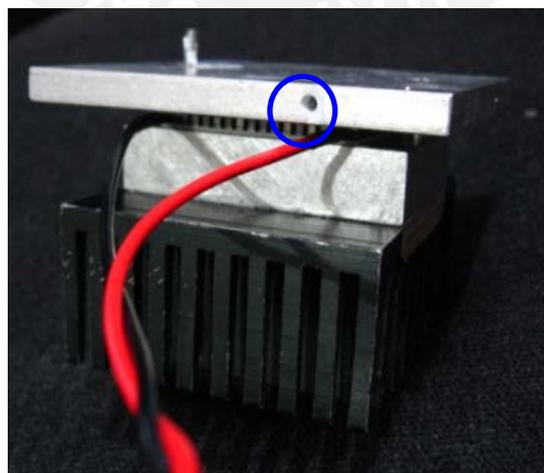


Figura 3.4 Sistema Bloque de aluminio/celda Peltier/separador de aluminio. El círculo señala el orificio para el sensor de temperatura.

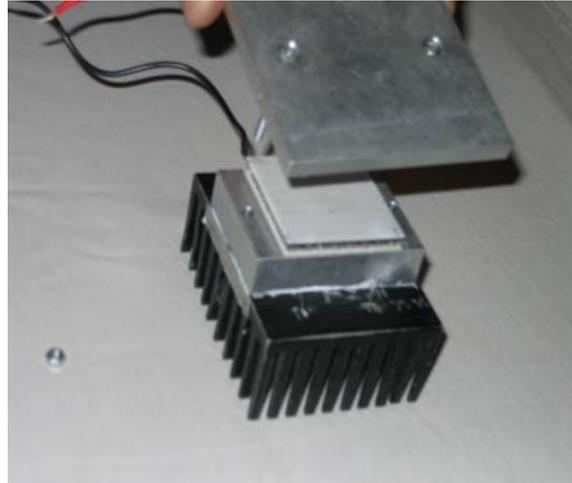


Figura 3.5 Vista previa al ensamble total. A todas las superficies de contacto se le aplicó una fina capa de pasta térmica conductora.

3.1.3. BLOQUE DE PLATA

La construcción de este bloque se realizó por fundido y moldeado de un bloque sólido de dimensiones 88mm x 60mm x 10mm. Posteriormente se llevó este bloque a la tornería para su maquinado de acuerdo a las dimensiones indicadas en la figura 3.6, de tal manera que se reduzca la mayor cantidad posible de material y por consiguiente su peso. La superficie inferior que estará en contacto directo con la celda Peltier fue pulida dos veces para evitar imperfecciones y pérdidas en la transmisión de calor.

En la fabricación de este bloque no se consideró las dimensiones para que encajen 48 o 96 microtubos como corresponde en los termocicladores comerciales, sino que se construyó un prototipo de 18 agujeros con el que se realizarán las pruebas del circuito y se documentará los resultados.

En la figura 3.6 se observa así mismo el agujero (1) para la sonda del termómetro digital [35] que es el mismo para los microtubos y el agujero para el sensor de temperatura (2). Solo se maquinó un agujero para este efecto. En la figura 3.7 se muestra el bloque ya fabricado.

A diferencia del ensamble con los materiales de Aluminio de la sección anterior, esta vez no se utiliza ningún bloque separador. A pesar que es un componente necesario como se indicó en la sección 3.1.2, las dimensiones del bloque de plata hacen complicado su ensamblaje del sistema en conjunto. El bloque de plata se sujeta directamente al disipador de calor por medio de dos tornillos a cada lado y se utilizan arandelas de material aislante para evitar algún tipo de transmisión de calor por medio del mismo tornillo.

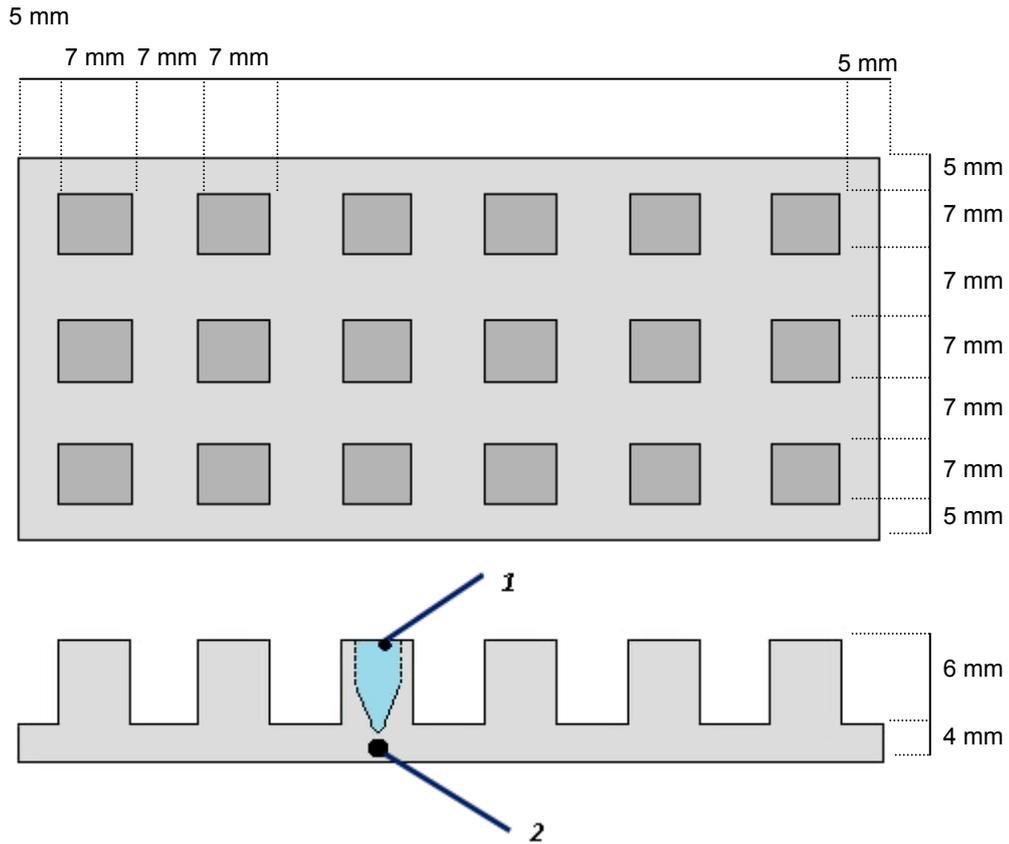


Figura 3.6 Esquema del perfil del bloque metálico de plata. (1): Ubicación para el microtubo; (2): Orificio para el sensor, $\varnothing = 2\text{mm}$.

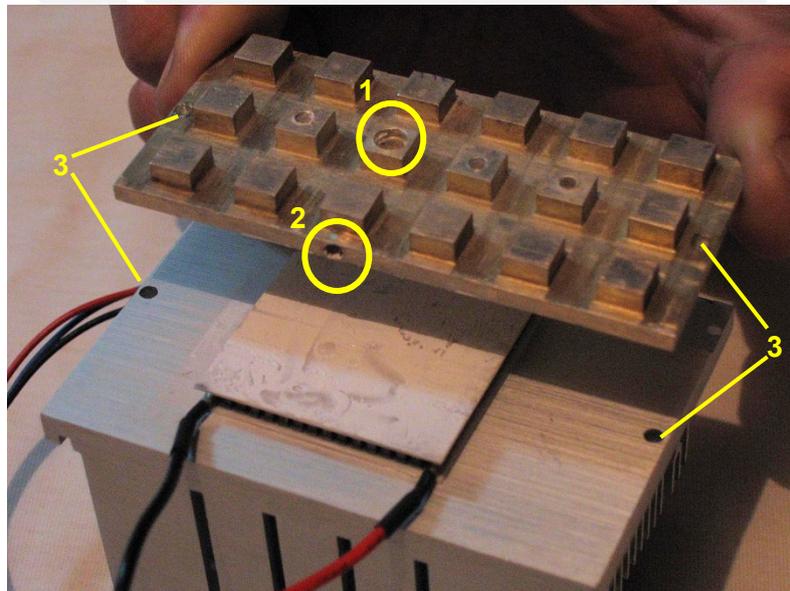


Figura 3.7 Vista en perspectiva del sistema celda Peltier/bloque de plata. (1): Ubicación de microtubo; (2): Orificio para el sensor. Solo se muestra 1 celda Peltier; (3): Orificios para tornillos de sujeción.

3.2. CIRCUITO DE POTENCIA

Una vez construidos el sistema mecánico con el bloque metálico y la celda Peltier se tiene que diseñar la etapa de potencia que manejará la alta corriente que circulará por la celda Peltier y que producirá la transferencia de calor entre dicho bloque metálico y el disipador (capítulo 2.6). Esta transferencia de calor puede tener dos sentidos, gracias a dos corrientes de sentidos opuestos como se estableció en el capítulo 2.6, dependiendo si se quiere enfriar o calentar el bloque metálico. Para ello en primer lugar se analiza la posibilidad de manejar la celda Peltier con un control tipo ON/OFF, sin embargo la literatura de los fabricantes recomienda no trabajarlo de esta manera por producir fatiga en la celda [22], [36]. La mejor solución la proporciona la utilización de un puente-H completo ya que esta configuración teniendo como carga a la celda Peltier permite tener los dos sentidos de corriente necesarios para la correcta transmisión de calor y cuyo control se realice con una onda PWM que se detallará en la siguiente sección.

En la tabla 3.2. se presentan diversas alternativas para el manejo de un puente-H.

Tabla 3.2: Circuitos integrados para manejo de un puente H completo.

FABRICANTE	MODELO	DESCRIPCIÓN	I _{max}
ST Microelectronics	L298	Manejador de Puente-H completo dual	2A
National Semiconductors	LM18298	Manejador de Puente-H completo dual	2A
TOSHIBA	TB6642FG	Manejador de motor DC de puente completo	4.5A
ST Microelectronics	L6203	Manejador de Puente DMOS completo	5A
Linear Technology	LT1158	Manejador de semi-puente de Mosfets de Potencia de canal N	Limitado por Mosfet

Fuente: Elaboración propia a partir de hojas de datos del fabricante.

Las 3 primeras opciones quedan descartadas por tener una corriente máxima pico cercana a la corriente que circula por la celda Peltier. La cuarta opción (integrado L6203) asoma como una mejor opción pero esa corriente máxima disminuye a 4 amperios si se habla de valor RMS total; sin embargo, se puede salvar las limitaciones con el integrado LT1158 de Linear Technology, que es un manejador (*driver* del

término en inglés) de mosfets de potencia de canal N en configuración de semi-puente H, el cual es la alternativa seleccionada. Estos mosfets son los que definen el límite de corriente para la carga. Para completar la configuración puente-H se deben utilizar dos de ellos [19].

Este integrado tiene una característica fundamental de seguridad en caso de exceso de corriente. Los terminales 11 y 12 (sense^- y sense^+ respectivamente) están conectados internamente a un comparador de voltaje y si la diferencia entre éstos es mayor que 110mV se produce un bloqueo en el funcionamiento del circuito integrado. Para obtener este voltaje, cada uno de los integrados LT1158 tendrá una resistencia dentro del esquema del Puente H que se define como R_s (figura 3.8). Para inhibir el funcionamiento del integrado, el exceso de corriente a través de esta resistencia provocará un exceso de voltaje en los terminales sense^+ y sense^- generando que el terminal FAULT (salida en colector abierto) se conecte a tierra provocando un pulso de bajada en la señal ENABLE con lo que ambos MOSFETs estén inactivos sin importar la señal de entrada que esté presente [20].

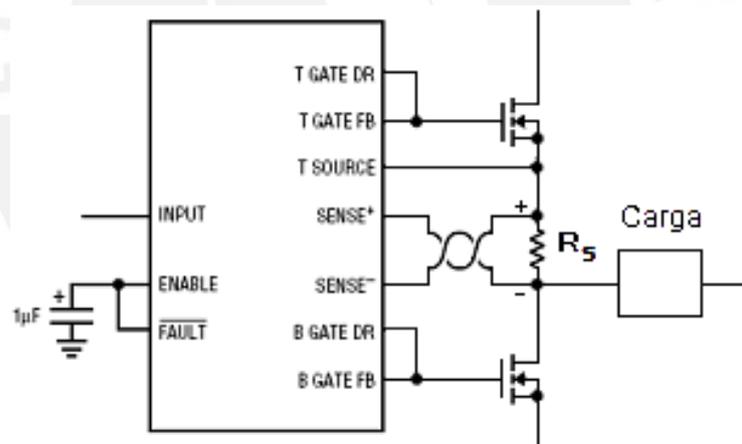


Figura 3.8 Conexión entre circuito integrado LT1158 y los mosfets de potencia para un semipuente-H. La carga viene dada por la celda Peltier.

Ajustando el valor máximo de la corriente que circulará por la carga en un 5% superior al valor máximo que pueden manejar las celdas Peltier seleccionadas (CP 1.4-127-10L y CP 0.8-254-06L), equivalente a 4.4 A, calculamos el valor de R_s de la siguiente manera:

$$I_{\text{fault}} = \frac{110\text{mV}}{R_s} \rightarrow R_s = \frac{110\text{mV}}{4.4\text{A}} = 25 * 10^{-3} = 0.025\Omega$$

La potencia necesaria por esta resistencia se calcula a partir de la ley de Ohm conociendo ya el valor de corriente y la resistencia calculada.

$$P = V \times I = I^2 \times R_S = (4.4)^2 \times (0.025) = 0.484 \text{ W}$$

El valor de resistencia a implementar se elige para una potencia de cuatro veces el valor calculado, evitando así su calentamiento. Teniendo esto en cuenta la resistencia es de $R_S = 4 \times 0.484 = 1.936 \text{ W}$. Sin embargo, comercialmente no se encuentran resistencias de valores tan bajos por lo que ésta se reemplaza con 4 resistencias de 0.1Ω y 5W en paralelo, un valor comercial que, aunque en manejo de potencia, supera los límites calculados, se puede encontrar localmente con facilidad.

Para completar el puente-H necesitamos cuatro mosfets de canal N. Están disponibles comercialmente los modelos IRF540 de ST Microelectronics o el IRFZ44 de International Rectifier en sus encapsulados TO-220. Éste último tiene mejores características dinámicas como se observa en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Mosfets de potencia comerciales

Fabricante	Modelo	V _{DSS} (V)	I _D (A)	R _{DS(on)} (Ω)	T _{d(on)} (ns)
ST Microelectronics	IRF540	100	22	<0.077	60
International Rectifier	IRFZ44	60	55	0.028	13

Fuente: Elaboración propia a partir de hoja de datos del fabricante.

El voltaje entre la compuerta (gate) y el surtidor (source) definido como V_{GS} activa el mosfet y soporta como máximo $V_{GS,max} = \pm 20\text{V}$ teniendo un valor típico de activación de 4V.

3.3. SENSOR DE TEMPERATURA

El mecanismo de adquisición de temperatura es el más sensible del sistema puesto que debe asegurarse que la temperatura leída es la temperatura real del bloque buscando tener un error máximo alrededor de $\pm 1^\circ\text{C}$. Temperaturas que excedan este valor de tolerancia degradarán irreversiblemente la muestra de ADN teniendo que empezar de nuevo el proceso con otras muestras, hecho que retrasaría la replicación de ADN y por lo tanto cualquier experimento.

Como alternativa para medir la temperatura se tiene a los sensores de estado sólido como el integrado LM35 de National Semiconductors y su precisión puede alcanzar los $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Las dimensiones de este sensor (aproximadamente 4 x 5mm en su presentación en encapsulado TO-92 o 4.5mm de diámetro en el encapsulado TO-46) impiden su colocación en la parte interna de los bloques metálicos de plata o aluminio descritos en 3.1 debido a que su dimensión excede el espesor del bloque. Recurrimos al fabricante YSI [48] que produce tanto termistores como componentes termilínear. Este resumen se muestra en la tabla 3.4.

Tabla 3.4: Sensores de Temperatura

Modelo	Dimensiones	Precisión	Temperatura máxima
LM35	Encapsulado TO-92: 5.2mm x 5.2mm x 4.19mm Encapsulado TO-46: $\varnothing=4.5\text{mm}$, 2.6mm	$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$	150 $^{\circ}\text{C}$
YSI 44018	$\varnothing_{\text{max}}=2.4\text{mm}$	$\pm 0.15^{\circ}\text{C}$	105 $^{\circ}\text{C}$
YSI 44019A	$\varnothing_{\text{max}}=2.8\text{mm}$	$\pm 0.4^{\circ}\text{C}$	85 $^{\circ}\text{C}$

Fuente: Elaboración propia a partir de hojas de datos del fabricante.

De estos dos se puede ver de la hoja de datos que el componente termilínear asegura una precisión de $\pm 0.15^{\circ}\text{C}$ y además cubre el rango de temperatura de trabajo, por lo que decidimos emplear este componente en el circuito de medición de temperatura. Este componente consiste en un arreglo de dos termistores [38] que permitirá tener un rango de temperatura lineal más amplio. Se escoge el modelo 44018 [48].

Se coloca el sensor de temperatura en una red con 2 resistencias de valores 2610 Ω y 5230 Ω en un divisor de voltaje para un rango lineal de 0 $^{\circ}\text{C}$ a 120 $^{\circ}\text{C}$ de acuerdo a la configuración de resistencias para una red termilínear dada por el fabricante [48]. De esta guía de diseño se obtiene la constante de sensibilidad para la red termilínear igual a $-0.0051169/^{\circ}\text{C}$ de acuerdo a la configuración de la figura 3.9a. Se considera inicialmente la rampa m (cambio de voltaje por $^{\circ}\text{C}$) igual a 0.01V. Con estos valores se calcula E_{in} como sigue:

$$E_{in} = \frac{-0.01 \frac{mV}{^{\circ}C}}{-0.0051169 \frac{^{\circ}C}{^{\circ}C}} = 1.9543V$$

Este valor define el voltaje de salida E_{out} como sigue:

$$E_{out} = -0.01T + 1.72543$$

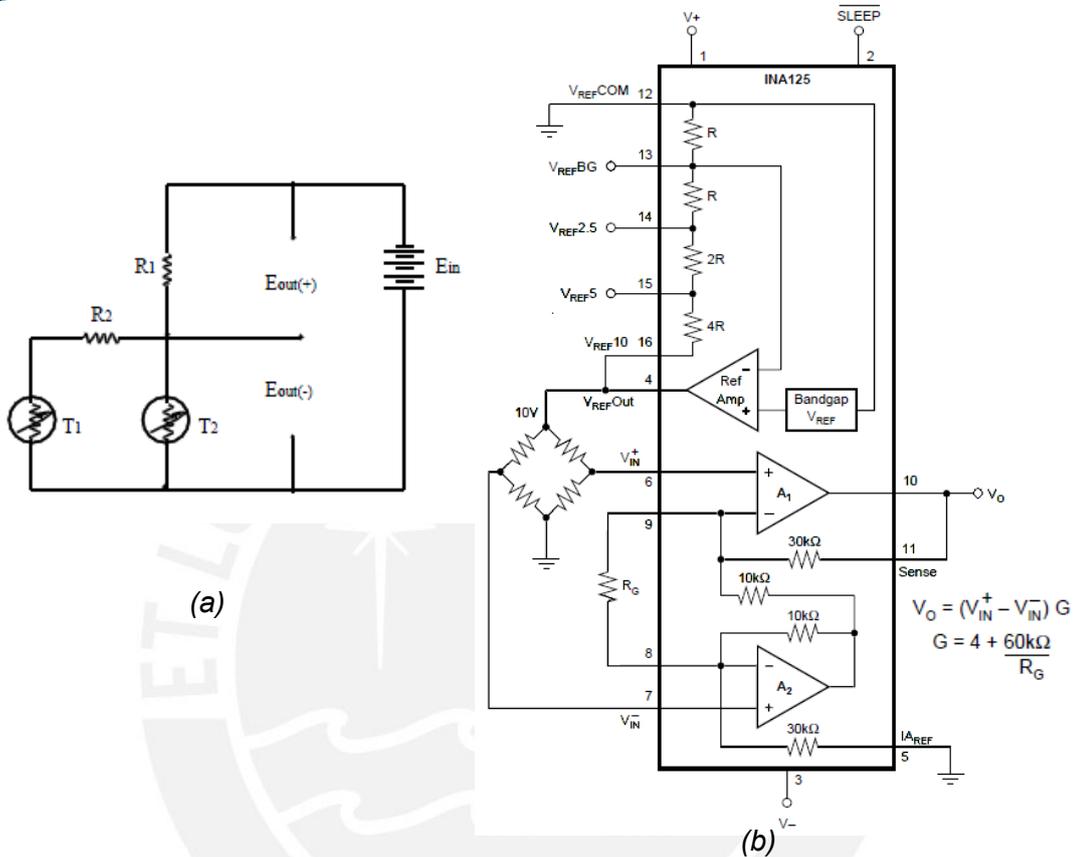


Figura 3.9 (a): Red termilnear; (b): Esquema del amplificador INA 125 [7]

El valor E_{out} debe pasar por un amplificador para cambiar el voltaje de salida de toda la etapa entre 0 y 5V y así tenga la misma resolución que el conversor análogo digital (ADC) que se utilizará.

Se utiliza a continuación el Amplificador de Instrumentación INA125 [7] de la marca BURR-BROWN, hoy parte de Texas Instruments y seguidores de voltaje antes de acoplar la señal con el pin de entrada del conversor análogo digital del microcontrolador. En la figura 3.9b, se muestra según recomendaciones del fabricante, las conexiones requeridas para la operación del INA125. La salida está referida al terminal de referencia del amplificador de instrumentación (I_{Aref}) el cual normalmente esta puesto a tierra y debe ser una conexión de baja impedancia para asegurar un buen rechazo a modo común (CMRR). Una resistencia de 12 Ohmios en serie con el

pin I_{Aref} causará que el circuito se degrade 80 dB de CMRR aproximadamente ($G = 4.88$).

El voltaje E_{out} se conecta al pin 7 (V_{IN+}). Como se desea que el rango inicie en 0°C, la otra entrada diferencial, pin 6 (V_{IN-}), toma el valor de 1.72543V que se obtiene regulando el potenciómetro R4.

Con el valor de $G = 4.88$, utilizamos la relación entre la ganancia G y la resistencia externa R_G entre los pines 8 y 9, dada por:

$$G = 4.88 = 1 + \frac{60K\Omega}{R_G} \Rightarrow R_G = 60.18K\Omega$$

Se implementa ese valor en el circuito final (figura 3.10) con el potenciómetro R5.

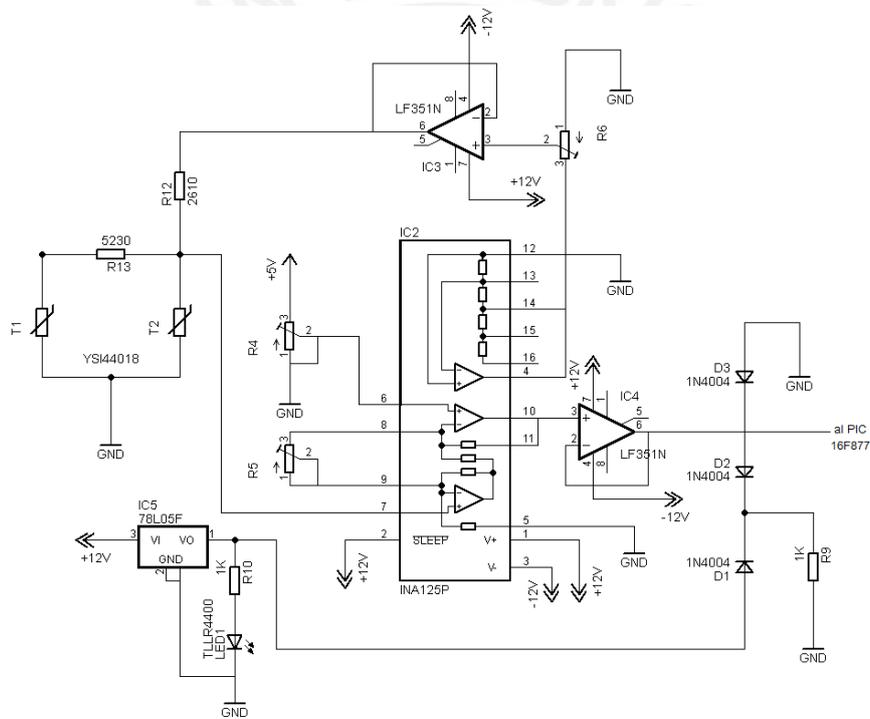


Figura 3.10 Etapa de medición de temperatura

3.3.1. VERIFICACIÓN DEL CIRCUITO DE SENSOR DE TEMPERATURA. DETERMINACIÓN DEL ERROR.

El circuito con sensor de temperatura ya diseñado se comparará con una escala de valores adquiridos con un patrón calibrado, para verificar la linealidad del circuito de temperatura, utilizando un baño de agua indicado en la figura 3.11 en el que se

sumerge el termilinear y el instrumento patrón que será el Termómetro Digital de alta precisión TECHNE 4400 [35].

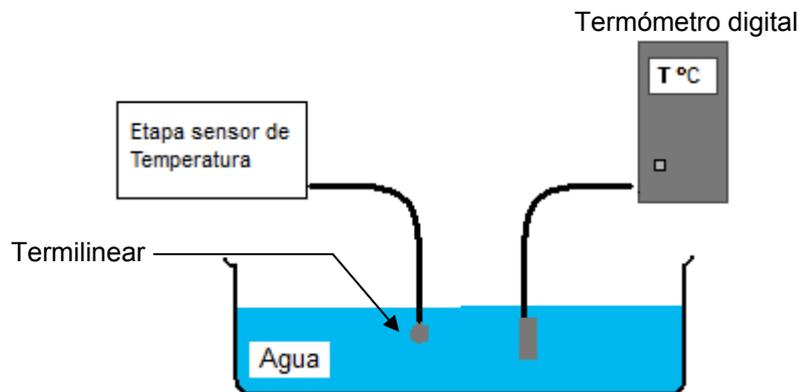


Figura 3.11 Configuración de termilinear y termómetro digital TECHNE 4400 para comparar y determinar el error del sistema.

Este instrumento presenta un error de ± 0.025 °C en el rango de 0 °C a 100 °C, y está destinado al monitoreo de temperatura y calibración con pantalla de cristal líquido de 4 ½ dígitos, especial para Control de Calidad de Laboratorio Clínico sobre todo por tener una sonda de temperatura con la forma y tamaño acorde con los bloques portamuestras de los termocicladores comerciales (figura 3.12). Se empiezan las mediciones teniendo el agua a temperatura elevada y se va enfriando lentamente. Las mediciones se realizaron luego de

un tiempo de establecimiento de la temperatura del baño de agua de 10 segundos.

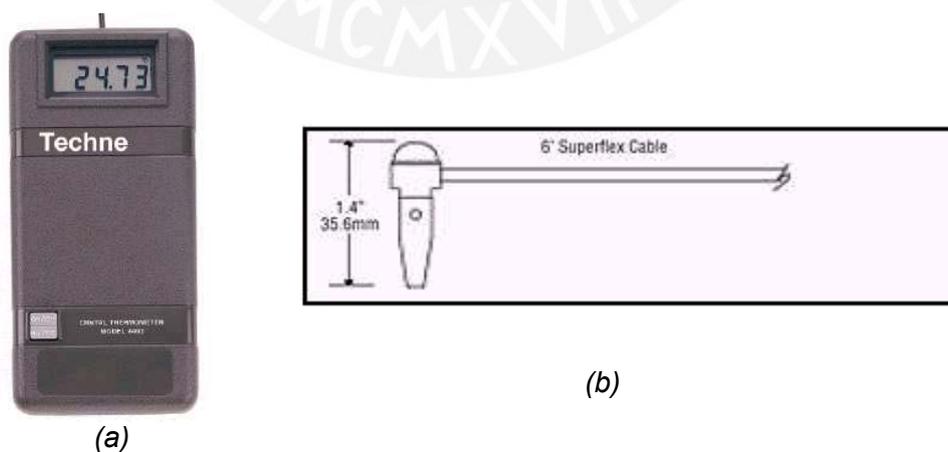


Figura 3.12. (a): Termómetro digital y (b): sonda de temperatura para termocicladores [35].

Se realizaron 2 pruebas en distintos momentos del mismo sistema para verificar la tendencia de la rampa de temperatura. Ambos casos se compararon con la recta de sensibilidad o resolución definida para el convertor analógico de 10 bits del microcontrolador PIC 16F877 que se calcula en la ecuación (1) de la sección 3.5.1.

Los valores de temperatura y voltaje medidos con el termómetro digital y un voltímetro se indican en la tabla 3.5. V_{out} corresponde al voltaje de salida de la etapa del sensor de temperatura y es el valor que ingresa al convertor análogo digital (ADC).

La figura 3.13 grafica los valores de las tablas 3.5 y 3.10, donde este último (en azul) representa los valores de voltaje y temperatura correspondiente al convertor análogo digital. Puede apreciarse que la mayor desviación en el voltaje ocurre después de los 80°C aproximadamente por lo que se hallará el error del sistema de medición para este rango de temperatura.

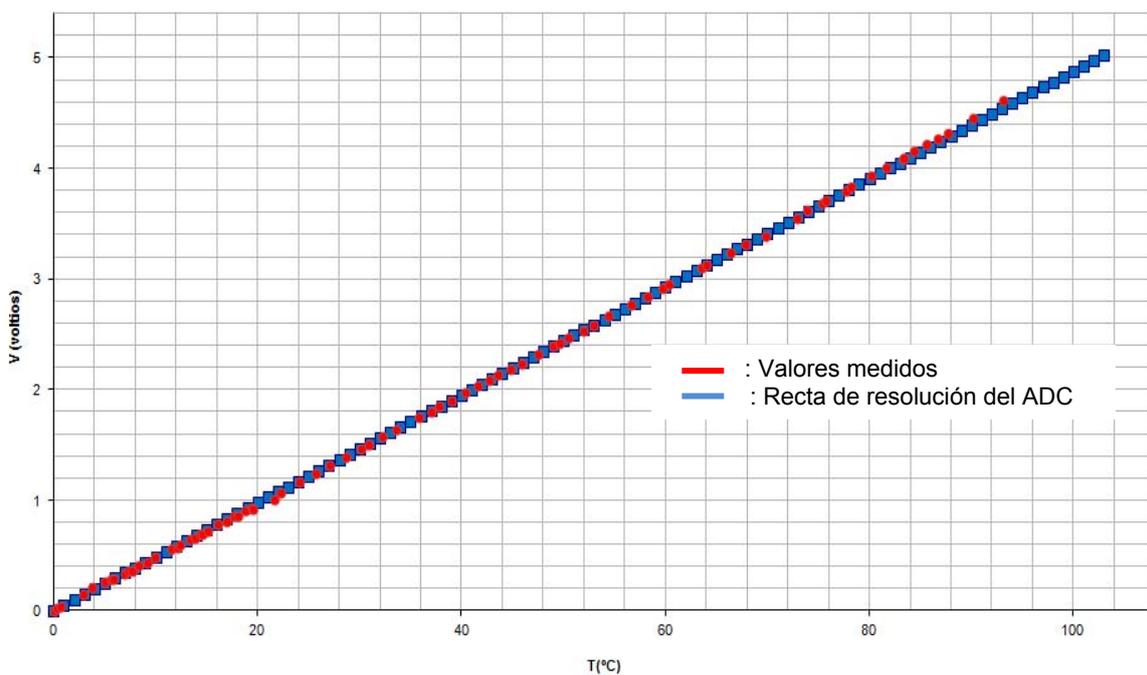


Figura 3.13 Gráfica temperatura vs. voltaje. El voltaje en esta gráfica está en milivoltios y la temperatura en grados Celsius.

A partir de la tabla 3.10 o recta de resolución del ADC del PIC obtenemos 2 valores y luego, por el método de interpolación lineal calculamos el voltaje correspondiente a la misma temperatura medida indicada en la tabla 3.5.

Según tabla 3.10:

80 °C ----- 3.904V

$$\text{Error} = \Delta V = 3.93 - 3.913 = 0.017 \text{ V} \Rightarrow \text{Error} = \Delta V = +17.2\text{mV}$$

Como cada incremento de 1 bit es equivalente a 0.1°C ó 4.88mV:

$$\frac{17.2\text{mV}}{4.88\text{mV/paso}} = 3.525 \text{ pasos}$$

$$\text{Error (T)} = 3.525\text{paso} * 0.1 \text{ }^\circ\text{C/paso} = 0.3525^\circ\text{C}$$

De esta manera se forma la tabla 3.6 con todos los valores del error calculados tanto del voltaje como de la temperatura hallándose el máximo error de temperatura alrededor de 93.12 °C.

Tabla 3.6: Errores de voltaje y temperatura

Temperatura (°C)	Vout (V)	Error = ΔV (mV)	Error = ΔT (°C)
80.18	3.912784	17.2	0.35
81.71	3.987448	22.5	0.46
83.2	4.06016	19.84	0.41
83.43	4.07138	28.62	0.58
84.32	4.114816	35.2	0.70
85.61	4.177768	42.2	0.86
86.68	4.229984	40.0	0.80
87.66	4.277808	42.2	0.86
90.19	4.401272	48.73	0.90
93.12	4.544256	65.7	1.30

Fuente: Elaboración propia

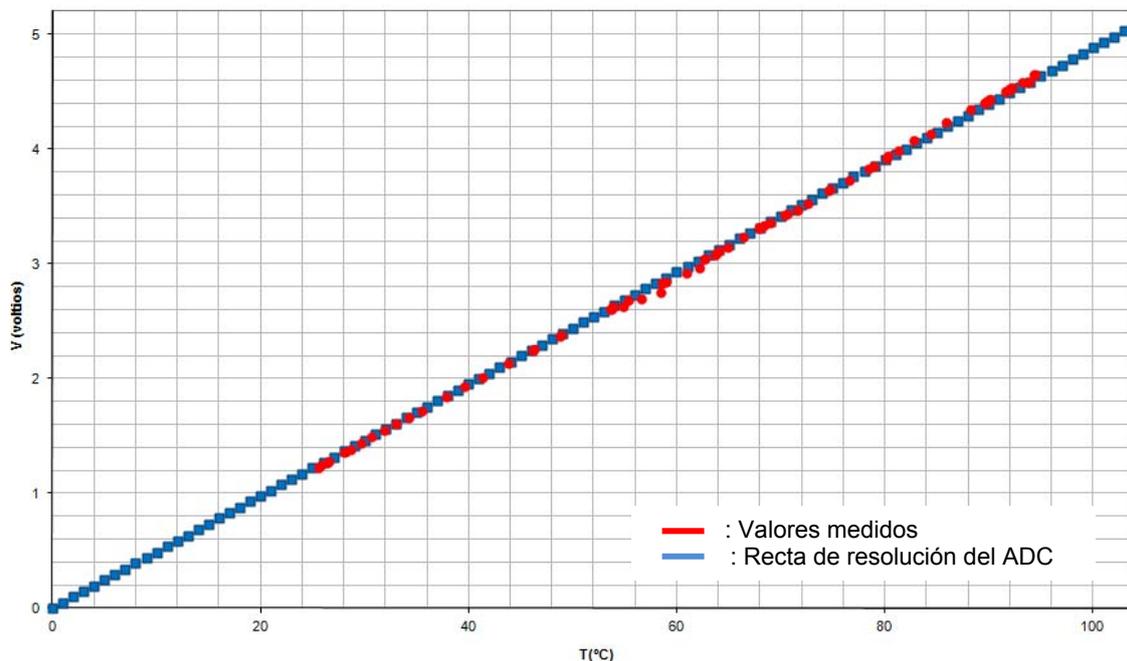


Figura 3.14 Gráfica temperatura vs. voltaje del segundo ensayo.

Debido a posibles errores en la medición efectuamos el procedimiento completo una vez más. Los valores medidos se encuentran en la tabla 3.7, acorde a la figura 3.14.

Tabla 3.7: Segunda medición de Temperaturas y voltajes

T(°C)	Vout	T(°C)	Vout	T(°C)	Vout
25.55	1.22976	56.63	2.69376	78.45	3.82592
25.79	1.2444	58.50	2.74744	78.90	3.85032
26.40	1.27368	58.52	2.8304	80.15	3.91864
26.54	1.27856	58.90	2.84016	80.30	3.93816
28.01	1.35664	60.94	2.92312	81.32	3.98696
28.64	1.38592	62.18	2.96216	82.80	4.07968
29.68	1.4396	62.64	3.04024	84.40	4.13824
30.66	1.4884	62.65	3.04512	85.94	4.23096
31.88	1.54696	63.67	3.0744	88.24	4.3432
33.06	1.60552	63.76	3.09392	89.60	4.40176
34.27	1.66408	64.06	3.11344	89.65	4.40664
35.47	1.72264	64.86	3.1476	89.75	4.4164
37.85	1.84464	66.37	3.23056	89.80	4.4164
39.59	1.9276	67.90	3.30864	89.90	4.4164
41.28	2.01056	67.98	3.31352	89.95	4.42128
43.77	2.13256	68.32	3.33304	90.00	4.42128
46.18	2.24968	68.97	3.36232	90.10	4.43104
46.27	2.25456	70.34	3.42576	91.62	4.50424
48.72	2.37168	70.60	3.4404	91.90	4.51888
48.84	2.38144	71.57	3.4648	91.93	4.51888
53.61	2.60592	71.64	3.46968	92.00	4.52376
53.77	2.6108	72.59	3.52336	92.26	4.53352
53.86	2.62544	74.55	3.64048	93.15	4.58232
54.80	2.63032	74.74	3.65024	93.80	4.58232
55.30	2.67912	76.60	3.72832	94.35	4.65064

Fuente: Elaboración propia.

En este caso se observa la misma linealidad que incluso supera los 90°C y una mayor similitud entre los valores medidos comparados con la resolución del ADC. Con estos nuevos datos se calcula la tabla de errores de voltaje y temperatura (tabla 3.8). El valor alrededor de los 58°C puede deberse a una mala lectura del termómetro digital, una demora en el tiempo de establecimiento del termómetro o una alteración imperceptible en la interfaz mecánica (*ie.* acople entre el sensor y la placa metálica). Como este hecho solo ocurre en 2 puntos de la recta suele despreciarse el efecto y se considera la tendencia general del resto de puntos.

Tabla 3.8: Errores de voltaje y temperatura

Temperatura (°C)	Vout (V)	Error = ΔV (mV)	Error = ΔT (°C)
80.15	3.91864	7.32	0.15
88.24	4.3432	37.0	0.76
90.00	4.42128	29.3	0.60
91.62	4.50424	33.2	0.68
92.26	4.53352	31.0	0.66
94.44	4.65064	41.9	0.86

Fuente: Elaboración propia

3.4. INGRESO DE DATOS Y PANTALLA DE VISUALIZACIÓN

Las temperaturas y los tiempos de permanencia en cada etapa del proceso de PCR, así como el número de ciclos que se repetirá el PCR, son valores ingresados por el usuario y dependen de la muestra cuyo ADN replicaremos. De la misma manera, durante la ejecución del proceso de PCR debe visualizarse la temperatura del bloque metálico y el ciclo de PCR que esté en curso.

El ingreso de los parámetros de temperatura y tiempo requiere utilizar caracteres numéricos más dos teclas adicionales como mínimo para aceptar o borrar el valor ingresado en caso de error. Para ese efecto utilizamos como dispositivo para el ingreso de datos, un teclado matricial de 4x4 (figura 3.15), es decir, 16 teclas controladas por 8 líneas.

Los valores ingresados por el teclado así como también el estado en el que se encuentra el proceso de PCR deben poder visualizarse. Para el caso del ingreso de

valores a los tres parámetros de temperatura y sus respectivos tiempos de duración podemos considerar por ejemplo los mensajes:

$$T_{max} = 90^{\circ}C$$

$$t_{max} = 240s$$

En donde T_{max} representa la temperatura máxima del proceso de PCR, t_{max} el tiempo que se mantendrá la temperatura en esta etapa y los valores numéricos son los que ingresan por teclado (90 y 240 son solo ejemplos). En ambos casos cada línea consta de 11 caracteres. Esta cantidad descarta utilizar un juego de displays de 7 segmentos por consumir muchos recursos. Buscando alternativas en los displays de LCD de caracteres, tenemos arreglos de caracteres en líneas, por lo que se busca ajustar el siguiente mensaje equivalente a los parámetros de una etapa de PCR:

Posición →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Caracter →	T	m	a	x	=	9	0	°	C		t	m	a	x	=	2	4	0	s

Por consiguiente, una pantalla LCD de 2 líneas x 16 caracteres, tiene muy pocos caracteres y queda descartado. Se puede considerar una pantalla de 20 x 2 caracteres pero, ya que cada ciclo de PCR necesita tres pares Temperatura-tiempo, tendríamos que generar dos páginas de diálogo para ingresar todos los valores requeridos. Por ello seleccionamos el LCD de 20 x 4 caracteres de la marca OPTREX (figura 3.16), modelo DMC20481, que permite ampliar las opciones de mensaje de diálogo. Este dispositivo funciona con un microprocesador interno de HITACHI [13], [16] y se controla por medio de 16 líneas perfectamente compatibles con cualquier microcontrolador comercial. Se resumen estas alternativas en la tabla 3.9.

Las conexiones de ambos dispositivos al microcontrolador PIC 16F877 se realizaron por los puertos B, D y E como se describe a continuación:

Teclado matricial	8 pines	Puerto B
		8 pines => datos : Puerto D
Display LCD	16 pines	3 pines => control : Puerto E
		3 pines => voltajes

Los pines Led Anode y Led Cathode del display LCD se conectan a 5V y tierra respectivamente. En el Anexo se encuentran los circuitos esquemáticos correspondientes.



Figura 3.15 Teclado matricial



Figura 3.16 Pantalla de cristal líquido de 4 x 20 caracteres (Display LCD).

Tabla 3.9: Resumen de opciones de pantalla de visualización

Modelo de pantalla LCD	Capacidad de caracteres
DMC16205	2 líneas x 16 caracteres
DMC20261	2 líneas x 20 caracteres
DMC20481	4 líneas x 20 caracteres

Fuente: Elaboración propia

3.5. ELECCIÓN DEL CONTROLADOR Y COMPONENTES COMPLEMENTARIOS

Para cumplir con el control de los componentes detallados en secciones anteriores se optó por controlar al sistema con un microcontrolador PIC16F877 del fabricante MICROCHIP, un modelo de microcontrolador de 14 bits de bus de instrucciones y que cuenta en su estructura interna con los siguientes recursos:

- Memoria de programa de 8KB suficiente para contener a todas las rutinas de control del sistema.
- Conversor análogo – digital de 10 bits, función necesaria para integrar la etapa de adquisición de temperatura.
- 5 puertos de entrada/salida de datos digitales y análogos
- Hasta 14 fuentes de interrupción.
- 3 temporizadores.
- Dos módulos de captura-comparación-generador de ondas PWM que manejará la etapa de potencia con las celdas Peltier.

- Voltaje de alimentación entre 2 y 5.5V.
- Pila con 8 niveles.
- Puerto USART para la comunicación del microcontrolador con una PC.

La frecuencia de trabajo del microcontrolador se fijó en 4 MHz para lo que se utiliza un cristal de cuarzo y dos condensadores de 15pF entre los terminales 13 y 14, correspondientes a OSC1 y OSC2. El diagrama de asignación y conexionado de los terminales se encuentra en la hoja de datos del anexo.

3.5.1. EL CONVERTOR ANÁLOGO-DIGITAL

El valor proveniente del sensor de temperatura ingresa al ADC del PIC 16F877 por el pin RA2/AN2 (pin 4 del PIC), se guarda en los registros ADRESH:ADRESL y luego, de acuerdo a la programación, se compara dicho valor con el de la temperatura ingresada por el usuario (figura 3.17). De esta manera se elige el duty cycle del PWM que generará el microcontrolador. El ADC tiene una resolución total de 10 bits en donde cada bit de la conversión está dado por la siguiente ecuación [1]:

$$Resolución\ del\ ADC = \frac{5V}{2^{10}\ pasos} = \frac{5V}{1024\ pasos} = 0.00488\ \frac{V}{paso} = 4.88\ \frac{mV}{paso} \dots\dots (1)$$

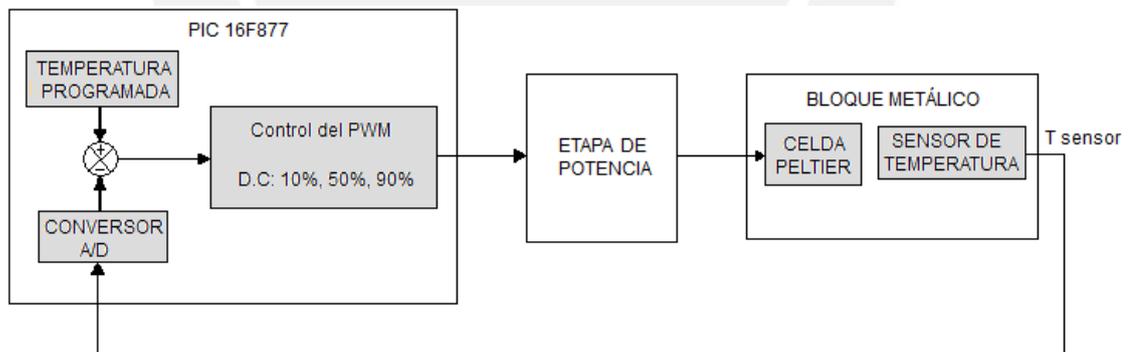


Figura 3.17 Esquema de la forma de control del Duty Cycle del PWM (90%, 50% o 10%). T_{sensor} se compara con la temperatura programada.

Y cada paso del ADC corresponde a 1 bit en donde definimos que cada bit corresponderá a una variación de 0.1°C (102.4°C/1024). Con el resultado anterior, se procede a tabular (tabla 3.10) en el rango de temperatura de 0°C a 100°C todos los valores que constituyen los valores teóricos del ADC y que constituyen una línea recta con una pendiente de 4.88mV/paso como se grafica por la línea azul de las gráficas 3.14 o 3.15. La pendiente general está dada por:

$$Pendiente = \frac{4.88mV}{0.1^{\circ}C} = 48.8 \frac{mV}{^{\circ}C}$$

Tabla 3.10: Resolución del ADC del PIC 16F877. Rango de 0°C a 100°C

T(°C)	Vout								
0	0	10	0.488	20	0.976	30	1.464	40	1.952
1	0.0488	11	0.5368	21	1.0248	31	1.5128	41	2.0008
2	0.0976	12	0.5856	22	1.0736	32	1.5616	42	2.0496
3	0.1464	13	0.6344	23	1.1224	33	1.6104	43	2.0984
4	0.1952	14	0.6832	24	1.1712	34	1.6592	44	2.1472
5	0.244	15	0.732	25	1.22	35	1.708	45	2.196
6	0.2928	16	0.7808	26	1.2688	36	1.7568	46	2.2448
7	0.3416	17	0.8296	27	1.3176	37	1.8056	47	2.2936
8	0.3904	18	0.8784	28	1.3664	38	1.8544	48	2.3424
9	0.4392	19	0.9272	29	1.4152	39	1.9032	49	2.3912

T(°C)	Vout								
50	2.44	60	2.928	70	3.416	80	3.904	90	4.392
51	2.4888	61	2.9768	71	3.4648	81	3.9528	91	4.4408
52	2.5376	62	3.0256	72	3.5136	82	4.0016	92	4.4896
53	2.5864	63	3.0744	73	3.5624	83	4.0504	93	4.5384
54	2.6352	64	3.1232	74	3.6112	84	4.0992	94	4.5872
55	2.684	65	3.172	75	3.66	85	4.148	95	4.636
56	2.7328	66	3.2208	76	3.7088	86	4.1968	96	4.6848
57	2.7816	67	3.2696	77	3.7576	87	4.2456	97	4.7336
58	2.8304	68	3.3184	78	3.8064	88	4.2944	98	4.7824
59	2.8792	69	3.3672	79	3.8552	89	4.3432	99	4.8312
								100	4.88

Fuente: Elaboración propia.

3.5.2. SEÑAL DE ANCHO DE PULSO MODULADO (PWM)

Como se había indicado en la sección 3.2, el proceso de calentamiento-enfriamiento del bloque metálico se realizará por cambios en el sentido de la corriente que circula por la celda Peltier colocado como carga entre los dos semipuentes-H. El control de los integrados se realizará por medio de una onda PWM, en la que el estado lógico alto o voltaje positivo habilita un mosfet de cada uno de los dos semipuentes-H y el estado lógico bajo o de 0 voltios habilita los mosfets complementarios.

La onda PWM se genera en el pin RC2/CCP1 del microcontrolador PIC16F877 por la programación de los registros de control adecuados. El control de la temperatura se rige por el valor del ciclo de trabajo o duty cycle de Existen dos formas de elegir el duty cycle de la onda PWM:

- Selección de tres o más niveles definidos de duty cycle.
- Selección por medio de un control clásico P, PI, PD ó PID.

Se selecciona la primera opción ya que aún no se cuenta con un modelo eficiente de bloque metálico que me permita determinar las variables PID, *i.e.* K_p , K_I , K_d , según el método Ziegler Nichols, por ejemplo. Los valores de los tres niveles mencionados se definirán en la sección 4.1.

La onda PWM que se obtiene del controlador ingresará primero a un opto-acoplador para separar la señal digital de los valores de corriente que se manejan en el Peltier y que generalmente supera los 1.2 A. En este caso particular las celdas Peltier generan un consumo de corriente de 2.1 y 4 Amperios para los modelos CP 0.8-254-06 y CP 1.4-127-10 respectivamente.

Respecto a la frecuencia de trabajo de la celda Peltier, podemos encontrar diversas consideraciones. Algunos fabricantes recomiendan trabajar dichas celdas con frecuencias alrededor de 5KHz [33] para evitar fatiga mecánica por la inercia térmica que se produce y evitar así su pronta destrucción, mientras que otros como Marlow Industries [21] en la sección Frequently Asked Questions, recomienda que la frecuencia sea mayor a 1KHz. Por otro lado Tellurex Corporation [36] recomienda usar una frecuencia alrededor de 120Hz por cuestiones de compatibilidad electromagnética. Con las celdas Peltier de Melcor [22] se cuenta como referencia el Reporte de Aplicación de Texas Instruments [56] que implementa un circuito de control con una frecuencia de 100KHz.

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

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

Tampoco existirá ninguna limitación en los mosfets de potencia ya que el tiempo de conmutación $t_{d(on)} + t_r = 110\text{ns}$ es mucho menor al periodo de la señal PWM que es de $400\mu\text{s}$.

Para aislar el controlador de la etapa de potencia se utiliza un opto-acoplador y se escoge el 4N29. Este es un dispositivo de bajo costo sin embargo presenta una limitación en su velocidad de conmutación a frecuencias de alrededor a los 5KHz, que se manifestó al implementar el circuito; observándose una degeneración en la onda PWM, por lo que fue necesario acoplarle el circuito de la figura 3.18 para incrementar la velocidad de conmutación. Esto se logra empleando un transistor adicional en una configuración de realimentación positiva que incrementa la corriente en el colector del transistor, mejorando la velocidad de conmutación del opto-acoplador en un factor de 10 [34].

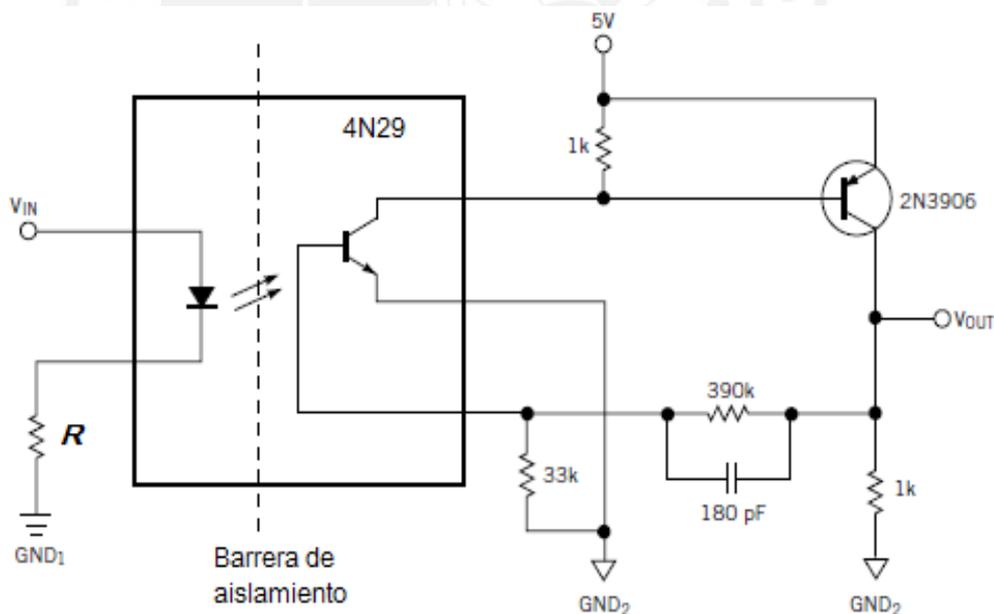


Figura 3.18 Circuito con realimentación positiva que aumenta la velocidad de conmutación de un optoacoplador clásico. Fuente: EDN 2001 [34].

Se analizó el circuito con un generador de onda cuadrada y un osciloscopio Tektronix y se observó que el valor de R debe cambiar para distintas frecuencias para no perder la fidelidad de la onda cuadrada. Como resultado se calcularon 3 valores óptimos (tabla 3.11) de resistencia para cada frecuencia de trabajo que se quiera implementar

en el circuito. Como se trabaja con una frecuencia de 2.5KHz bastará seleccionar la resistencia de 330Ω.

Tabla 3.11: Relación frecuencia-resistencia en optoacoplador.

FRECUENCIA (KHz)	RESISTENCIA (Ω)
4	330
10	390
20	480

Fuente: Elaboración propia.

Para la red LC diferencial pasiva de 2do orden, seguimos el esquema de la figura 2.29, de la sección 2.7, con el inductor L2, el condensador C2, los dos filtros capacitores de alta frecuencia Cleg y R_L es la resistencia de la celda Peltier. De la hoja de especificaciones técnicas se tiene el valor de esta resistencia es igual a 4Ω. Este valor es aproximado, ya que cada celda tiene una resistencia típica en cada temperatura de operación. Así la resistencia es de 3.44Ω @ 25°C y de 3.88Ω @ 50°C y su valor aumenta a medida que aumenta la temperatura de operación. Como se trabajará entre una temperatura de 50°C y 98°C, aproximamos al valor de 4Ω.

$$C = 0.7071 / (2\pi f R_L L) = 0.7071 / (2 * \pi * 2500 * 4) = 11.25 * [10]^{-6} = 11.25(F) \rightarrow C2 \cong 12(F)$$

$$L = \frac{R_L * 1.4142}{2\pi * 2500} = 360.1\mu H \rightarrow L2 = \frac{L}{2} = 180.05\mu H \cong 180\mu H$$

$$C_{leg} = 10\%(C2) = 1.2\mu F$$

Debido a la limitación de la corriente en el puente H (sección 3.2.1), no es posible colocar dos celdas Peltier en paralelo para mejorar la rampa de calentamiento o enfriamiento en la placa metálica. Por consiguiente debe duplicarse el puente H con sus correspondientes filtros pasabajos para poder colocar una celda adicional. Sin

embargo, se realizarán las pruebas con el circuito completo (figura 3.19) para una sola celda Peltier y se analizará el resultado.

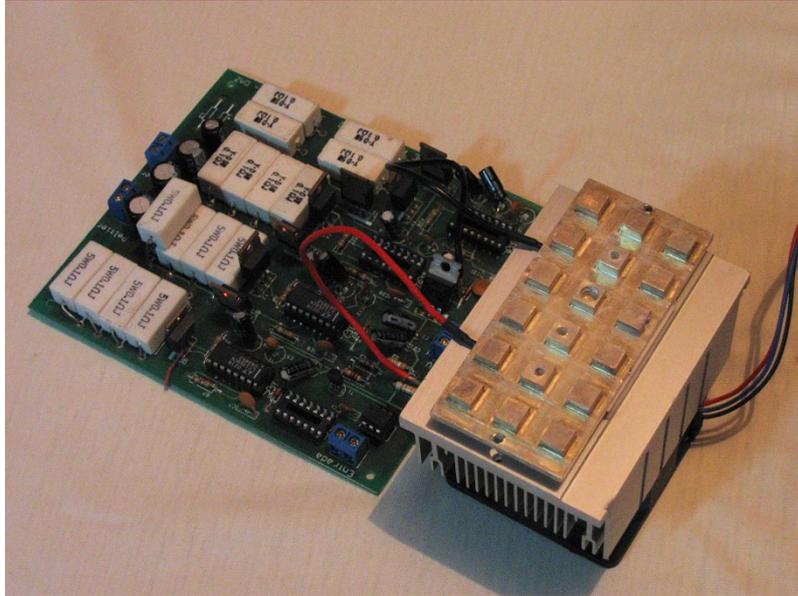


Figura 3.19 Sistema Peltier – Bloque de Plata con la tarjeta de potencia.

3.6. TRANSMISIÓN SERIAL A PC

El PIC 16F877 contiene un módulo que permite la comunicación síncrona y asíncrona, conocido como el módulo USART. La comunicación asíncrona se realiza sobre dos líneas: Tx (transmisión) y Rx (recepción), siendo la velocidad de transferencia de los bits de información controlada por los parámetros de configuración del USART [1].

La transmisión asíncrona de datos entre el PIC y la PC se realiza usando la norma RS-232 la cual establece una palabra de información de 8 o 9 bits, un bit de inicio (Start) y uno de parada (Stop). Para ello se conecta los puertos RC6/TX y RC7/RX del PIC a los pines de recepción y transmisión del circuito integrado MAX232 del fabricante MAXIM INTEGRATED PRODUCTS (figura 3.20). De esta manera se llevan los voltajes de salida del PIC que están en nivel TTL a los de la norma RS-232.

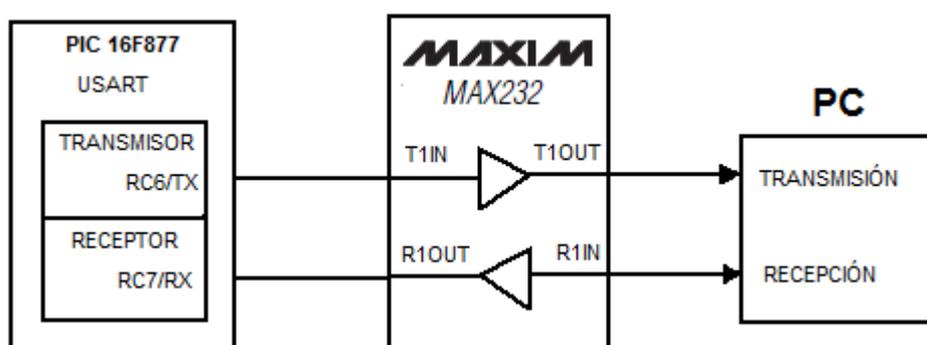


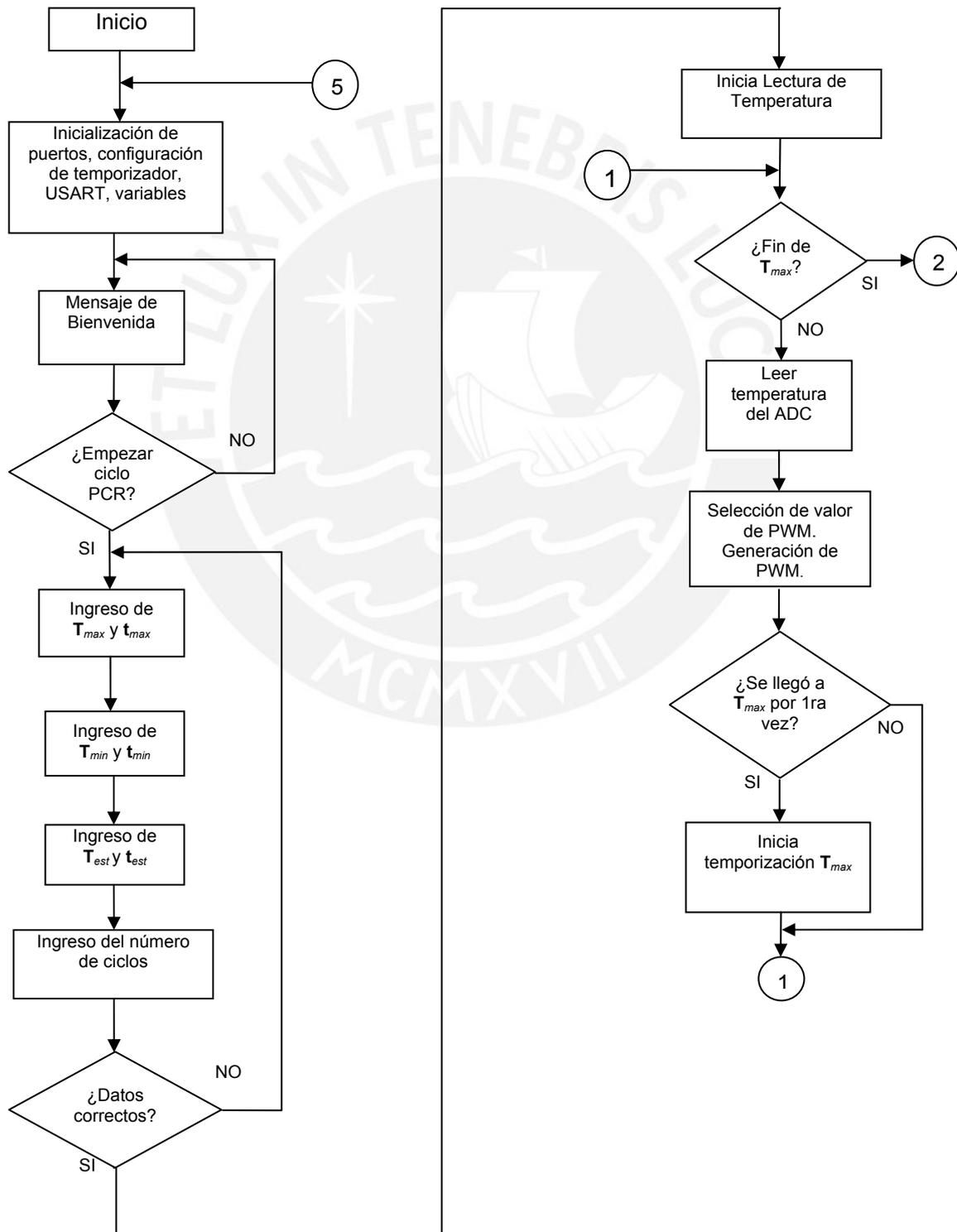
Figura 3.20 Diagrama de bloques de la conexión para la comunicación asíncrona entre el PIC y la PC. Los parámetros de configuración de la conexión para el SPBRG [1] y considera 8 bits de datos y 9600 baudios de velocidad de transmisión. El programa del microcontrolador incluyó la transmisión serial al puerto serie de una PC, por lo que la adquisición de datos se realizó por el software *Hyperterminal* de Windows, para luego, por medio del software de procesamiento numérico MATLAB [55] trazar la gráfica de la respuesta y calcular la media y el histograma en cada una de las tres etapas del ciclo PCR. Las rutinas para las gráficas se detallan en el anexo. Los parámetros de configuración del *Hyperterminal* deben ser los mismos que los del PIC, es decir la velocidad y la longitud en bits de los datos de transmisión.



4. DESARROLLO DEL SOFTWARE DE CONTROL

4.1. ESQUEMA GENERAL

El control general del sistema se realiza de acuerdo al siguiente Diagrama de Flujo (figura 4.1).



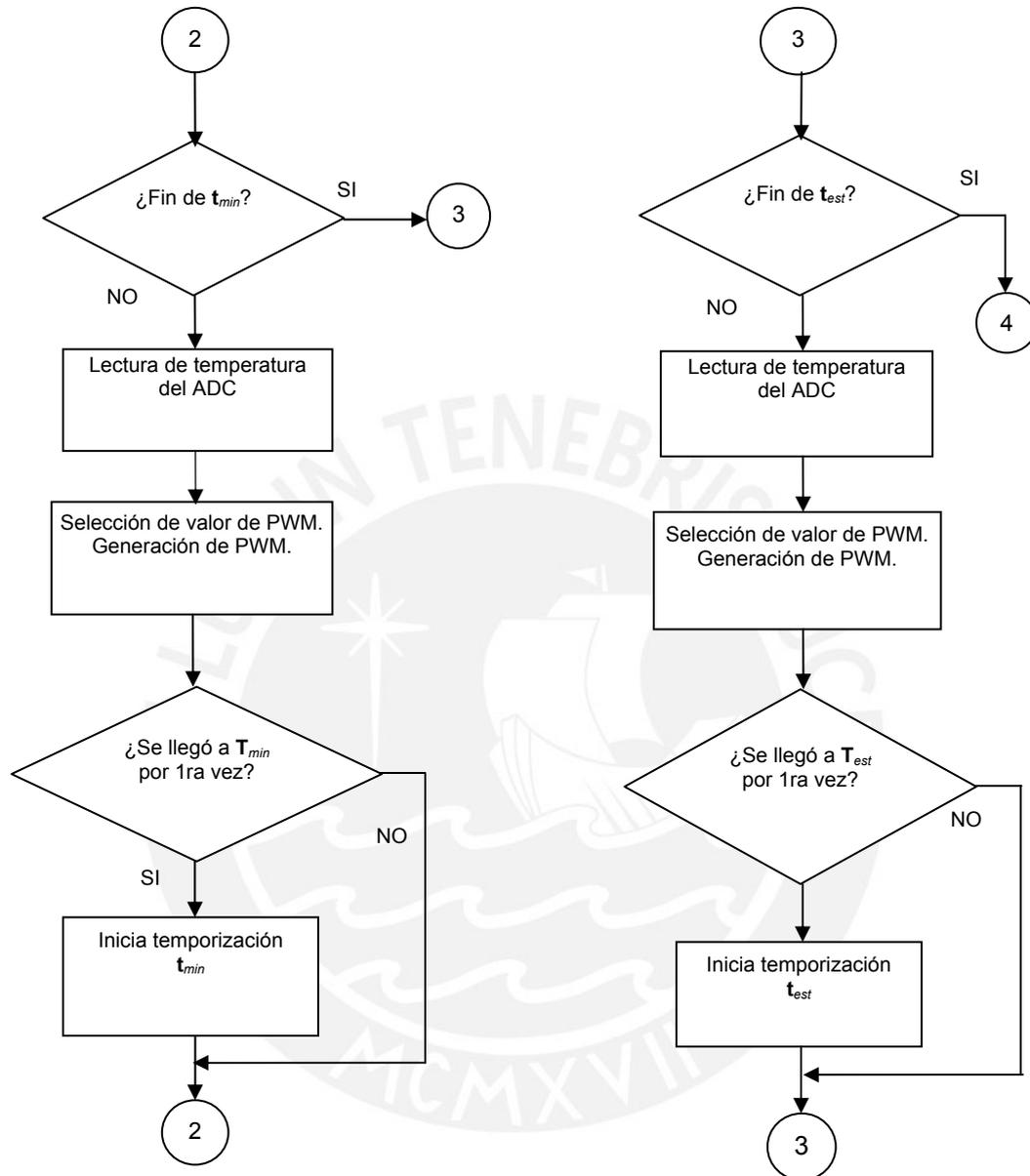


Figura 4.1 Diagrama de flujo del programa del módulo termociclador.

El Diagrama de flujo presenta las acciones seguidas desde el encendido del módulo hasta completar todos los ciclos de PCR programados. Se programó una rutina de interrupción (RUT_INT) en el PIC 16F877 que ocurre cada 250ms para realizar dos actividades: visualizar en el display LCD el valor leído en el ADC y efectuar la comunicación serial de este valor con la PC. En caso de querer detener todo el proceso, el control no se realiza por teclado sino vía el botón de RESET del PIC 16F877, obligándose a reiniciar el PCR.

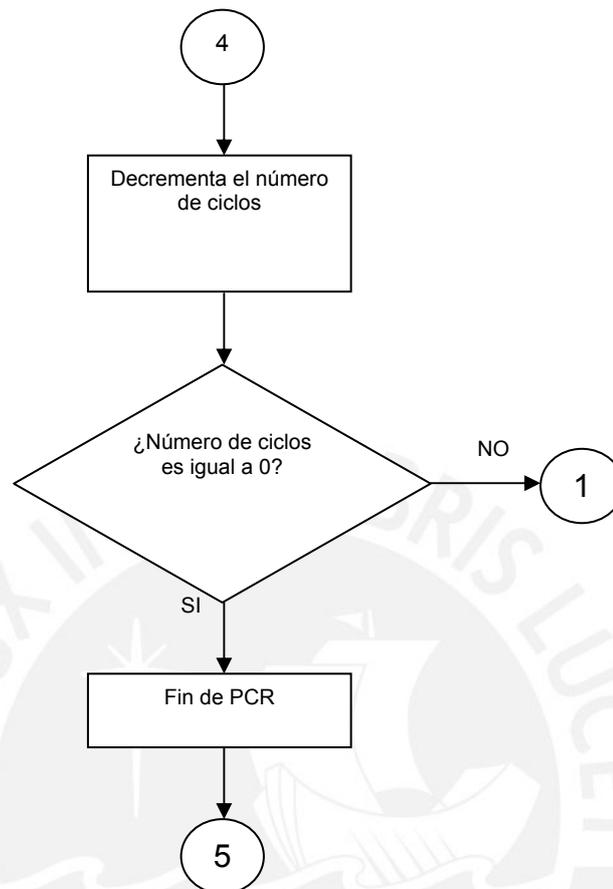


Figura 4.1 (continuación) Diagrama de flujo del programa del módulo termociclador.

La descripción de las etiquetas del diagrama de flujo son las siguientes:

T_{max} : Temperatura máxima o Temperatura de etapa de desnaturalización.

t_{max} : Tiempo de permanencia en etapa de desnaturalización.

T_{min} : Temperatura mínima o Temperatura de etapa de hibridación.

t_{min} : Tiempo de permanencia en etapa de hibridación.

Test : Temperatura intermedia o Temperatura de etapa de extensión.

test : Tiempo de permanencia en etapa de extensión.

n : Número de ciclos del proceso de PCR

El programa principal tiene dos subprogramas para la administración del teclado y de la pantalla LCD, TECLADO.ASM y lcd2.asm respectivamente y sus contenidos y demás subrutinas figuran en el anexo 1.

Para la implementación del diagrama de flujo se usó el lenguaje ensamblador (assembler en inglés) aprovechando el juego de 35 instrucciones, los modos de direccionamiento directo e indirecto, las 14 fuentes de interrupción y los 8K palabras

de 14 bits de capacidad. El programa completo se encuentra en la sección correspondiente al anexo.1

Tal y como está indicado en la figura 3.18, la temperatura medida por el circuito del sensor termilínea ingresa al convertidor A/D y se compara con el valor de la temperatura de la etapa correspondiente (desnaturalización, hibridación o extensión) y en base a esa comparación se selecciona uno de los tres posibles duty cycle para la onda PWM indicados en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Definición de duty cycle para cada efecto sobre la celda Peltier

EFEECTO	DUTY CYCLE
Enfriamiento	10%
Neutro. Inercial.	50%
Calentamiento	90%

Fuente: Elaboración propia.

Donde el proceso de enfriamiento y calentamiento se define por un valor específico de duty cycle y este se selecciona de acuerdo a la temperatura medida en el sensor comparado con la temperatura programada para cada etapa del PCR. El 50% de duty cycle ejerce un efecto neutral teórico y su selección se da únicamente cuando los valores medido y programado son idénticos.

4.2. MÓDULO DE VISUALIZACIÓN DE DATOS

Se establece la secuencia de mensajes de la figura 4.2, como menú de diálogo con el usuario. Algunos mensajes indican que el sistema está a la espera del ingreso de datos. De acuerdo a la figura 4.2 se tienen los siguientes mensajes:

- 1: Mensaje de inicio del programa para ejecución del PCR.
- 2: Mensaje informativo de 2 segundos de duración indicando que se pedirá ingresar las cotas superiores de tiempo y temperatura del PCR.
- 3: Parámetros de temperatura y tiempo con sus correspondientes casillas para el ingreso de valores por medio del teclado. La temperatura está en grados Celsius (°C) y el tiempo en segundos (s).
- 4: Ejemplo de ingreso de parámetros.
- 5: Mensaje que pide el ingreso del número de ciclos de todo el PCR.

- 6: Si los valores ingresados son correctos, e.g. $T_{max} > T_{min}$ o número de ciclos $\neq 0$, se pide presionar <ENTER> para iniciar el proceso.
- 7: Con el sistema en funcionamiento se muestra la temperatura medida por el termilínear y el ciclo de PCR actual.

Luego de escribir cada valor de temperatura, tiempo o número de ciclos se debe presionar la tecla <ENTER> para confirmar dicho valor o <CLEAR> para borrar la cifra digitada y volver a escribirla. Los valores de temperatura son valores enteros de 2 cifras y estarán en el rango de 10 – 99 °C. No se admiten cifras decimales. Los tiempos correspondientes a cada etapa están dados en segundos. Es decir, si quiere ingresarse el valor de t_{max} de 3½ minutos se ingresa el valor de $3 \times 60 + 30 = 210$ segundos. El rango está de 100 – 999 segundos, es decir serán de 3 cifras enteras.



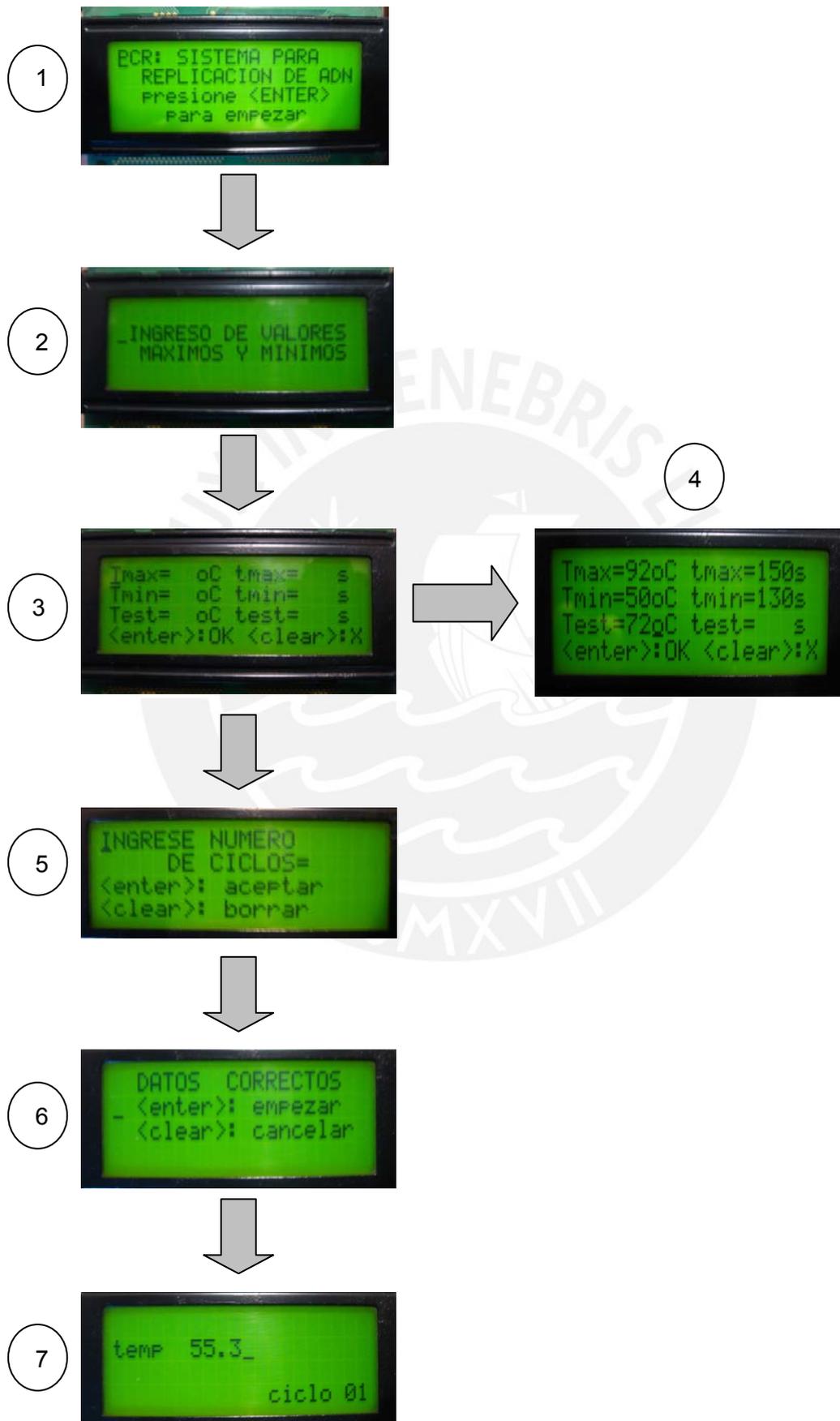


Figura 4.2 Secuencia de ingreso de parámetros en la pantalla LCD.

5. PRUEBAS DE HARDWARE Y SOFTWARE

Todo el ciclo completo de calentamiento y enfriamiento tiene un periodo mayor a 5 minutos, por lo que un tiempo de muestreo de temperatura igual a 250ms es suficiente para capturar la forma de la señal sin generar distorsión de la misma. Aún cuando se conoce que la conductividad térmica de la plata es mayor que la del aluminio, se hace un estudio previo del comportamiento del sistema de ambos materiales con el fin de comparar respuestas y establecer la posibilidad de fabricar posteriormente una bandeja metálica con dimensiones físicas mejoradas a base de aluminio que constituye una alternativa de menor costo. Los ensayos que se realizarán son los siguientes:

- Respuesta al incremento de temperatura en puntos distintos del bloque de plata.
- Comparación de respuesta entre bloque de aluminio y plata.
- Ensayos en bloque de plata.

5.1. RESPUESTA AL INCREMENTO DE TEMPERATURA EN BLOQUE DE PLATA.

Para esta primera prueba se utiliza la celda Peltier modelo CP 1.4-127-10L que tiene una capacidad máxima de transferencia de calor de 33.4W. El objetivo es graficar la respuesta del bloque metálico de plata, a un escalón de temperatura o calentamiento puro, el valor máximo que alcanzará y el tiempo invertido. De esta manera se determinará el mejor punto de medición en el bloque de plata. Se escogió para ello los 3 puntos de medición de la figura 5.1 y que no pertenecen a un mismo plano de simetría, para tener así respuestas distintas. En dicha figura se muestran los componentes del sistema mecánico desplazados únicamente con fines figurativos. Se programó el sistema para que el calentamiento sea generado por una onda periódica con un duty cycle de 90%. Los valores obtenidos en estos 3 puntos de medición se grafican en la figura 5.2 gracias al software MATLAB a partir de los datos enviados a la PC desde el puerto serial del microcontrolador PIC16F877.

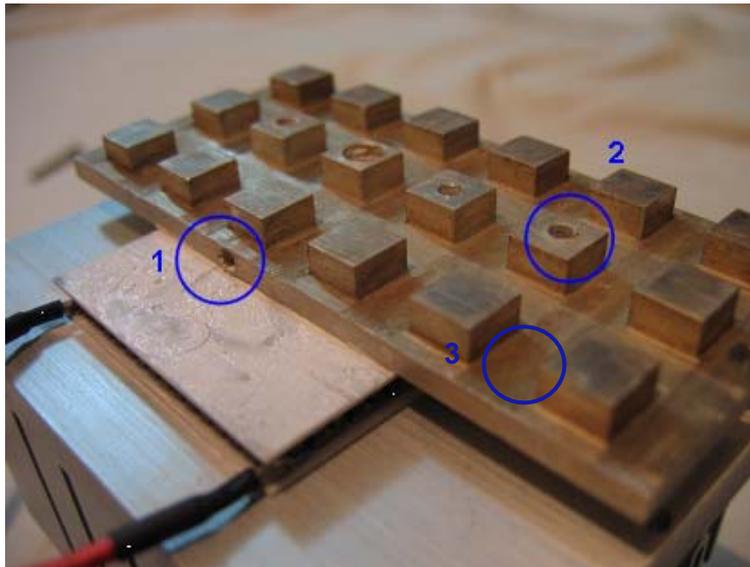


Figura 5.1 En orificios 1 y 2 se coloca el sensor de temperatura. El punto 3 está sobre la superficie de la bandeja de plata.

De la figura 5.2 se puede observar que los puntos de medición 1 y 2 generan la mejor rampa de temperatura y son las que se usarán posteriormente para obtener la gráfica tiempo vs. temperatura correspondiente al desarrollo de un proceso PCR en el bloque de plata. En dichos puntos 1 y 2 se logran alcanzar los valores de temperatura más altos, observándose que se supera los 95°C.

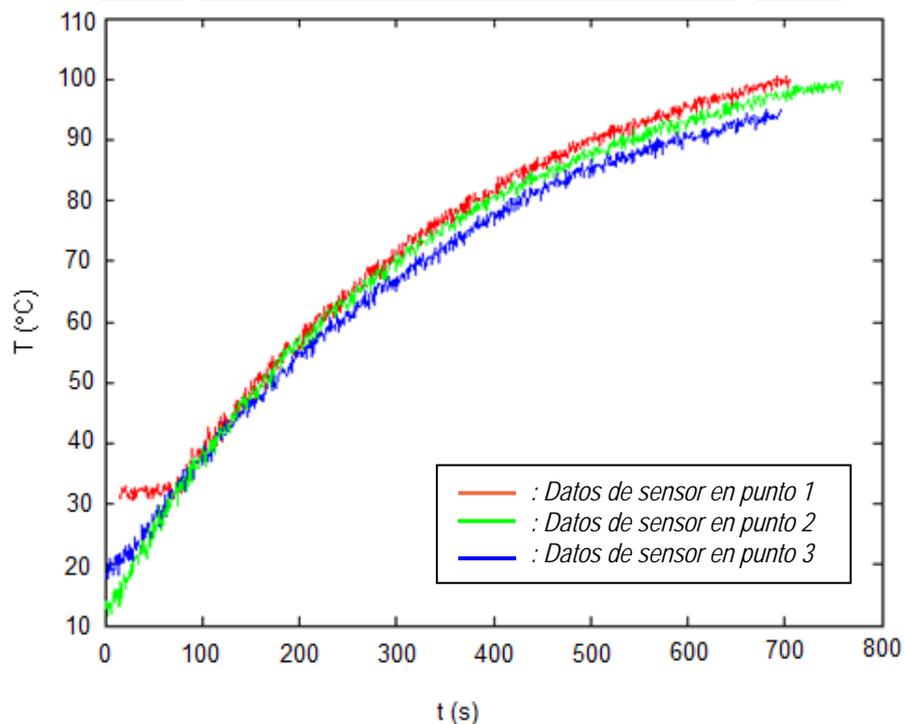


Figura 5.2 Gráfica tiempo vs. Temperatura en respuesta a la generación de una onda con duty cycle de 90%.

5.2. COMPARACIÓN DE RESPUESTA ENTRE LOS BLOQUES DE ALUMINIO Y PLATA

Se ejecutó un proceso de PCR definiendo los valores de los parámetros en:

Temperatura de Desnaturalización: 91 °C

Temperatura de Hibridación: 50 °C

Temperatura de Estabilización: 72 °C

Número de ciclos PCR: 3

Los tiempos de permanencia en cada una de las etapas fueron de 100s.

Para esta prueba se colocó el sensor en la ubicación 1 del bloque de plata, que fue el mejor resultado de la prueba anterior.

Se realiza todo el procedimiento primero con el bloque de aluminio y luego con el de plata, realizándose las pruebas con una única celda Peltier. Para esta comparación se utilizó la celda modelo CP 0.8-254-06-L de MELCOR [22], cuya capacidad de transferencia de calor es de 36.2W, mayor en 2.8W que la celda de la sección anterior, pero su superficie de contacto tiene en un área menor ($50\text{mm} \times 25\text{mm} = 1250\text{mm}^2$).

El resultado obtenido se grafica en la figura 5.3.

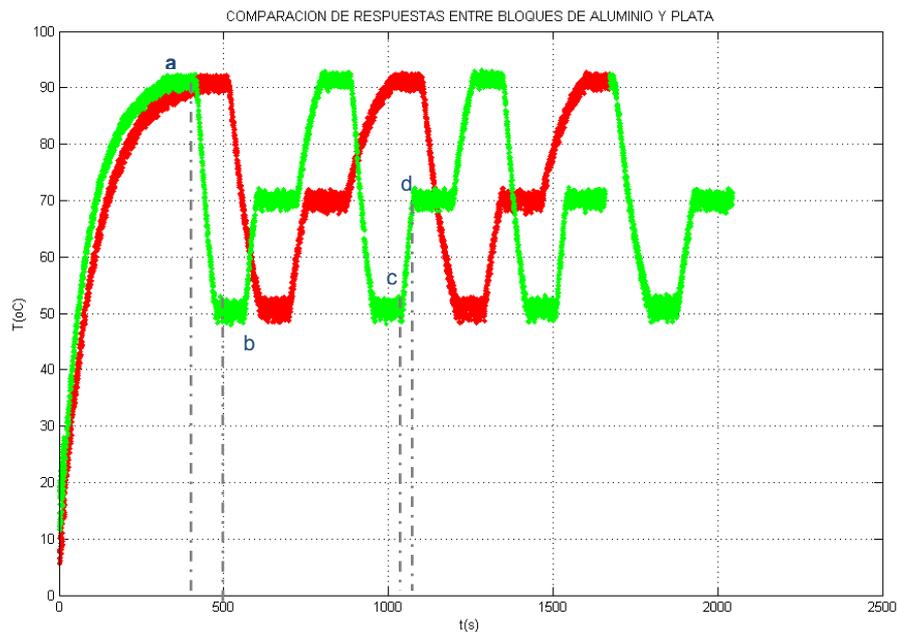


Figura 5.3 Gráfica temperatura vs tiempo en bloques de Aluminio (color rojo) y el de Plata (color verde).

Se observa que la temperatura inicial está alrededor de los 10°C como resultado de una prueba de enfriamiento previo. Al compararse las respuestas de ambos bloques, se aprecia que el cambio de temperatura en el bloque de plata, ocurre en un tiempo menor que en el bloque de aluminio por lo que puede afirmarse que con un bloque de plata se alcanza la temperatura objetivo de manera más rápida. Sin embargo, la forma de la gráfica no varía sustancialmente en morfología ni se presenta algún efecto

inesperado. Este resultado permite considerar al aluminio como una alternativa en la confección del bloque metálico por implicar un menor costo.

De la figura 5.3 se deriva que entre los puntos a y b, correspondientes al paso de la etapa de desnaturalización a la de hibridación en el bloque de plata, ocurre un cambio de temperatura de 41°C en aproximadamente 100s. Esto demuestra que la velocidad aproximada es de 0.41°C/s en una etapa de enfriamiento. Y, para el mismo bloque de plata, entre los puntos c y d, correspondientes al paso de la etapa de hibridación a la etapa de estabilización, la diferencia de temperatura de 22°C se alcanza en aproximadamente 50s. Con ello, se tiene una velocidad de calentamiento del 0.4°C/s .

5.3. ENSAYOS CON BLOQUE DE PLATA.

Se realizan dos ensayos adicionales con la celda Peltier CP1.4-127-10L, colocando al sensor de temperatura en la ubicación 1 y luego en 2 según la figura 5.1. Esto con la finalidad de analizar la respuesta a los cambios de temperatura en dos puntos del bloque de plata con la otra celda Peltier y observar la respuesta, ya que, aunque tiene una capacidad de transferencia de calor menor (2.8W menos) tiene un área mayor ($40\text{mm} \times 40\text{mm} = 1600\text{mm}^2$). Se usa pasta conductora en los agujeros del bloque para fijar el termilinear y también entre el bloque y la celda Peltier. En la figura 5.4 se muestra la gráfica tiempo versus temperatura en donde se observa una vez más la mejor respuesta en el punto 1 respecto del punto 2. La velocidad de enfriamiento, en la ubicación 1, se calcula entre los puntos a y b. Una variación de 41°C ocurre en 50s aproximadamente, por lo que la velocidad de enfriamiento es de 0.82°C/s . La velocidad de calentamiento se calcula entre los puntos c y d de la gráfica. Una variación de 22°C ocurre en 50s aproximadamente por lo que la velocidad de calentamiento resulta ser de 0.44°C/s . Se observa que en este caso el calentamiento es más lento que el enfriamiento y es un resultado semejante al ensayo de la sección anterior. En estos últimos ensayos se han manipulado los componentes mecánicos por lo que éste puede ser un factor que produce respuestas fuera de lo esperado.

La temperatura inicial de esta última prueba no coincide con la temperatura inicial de la prueba de la sección anterior.

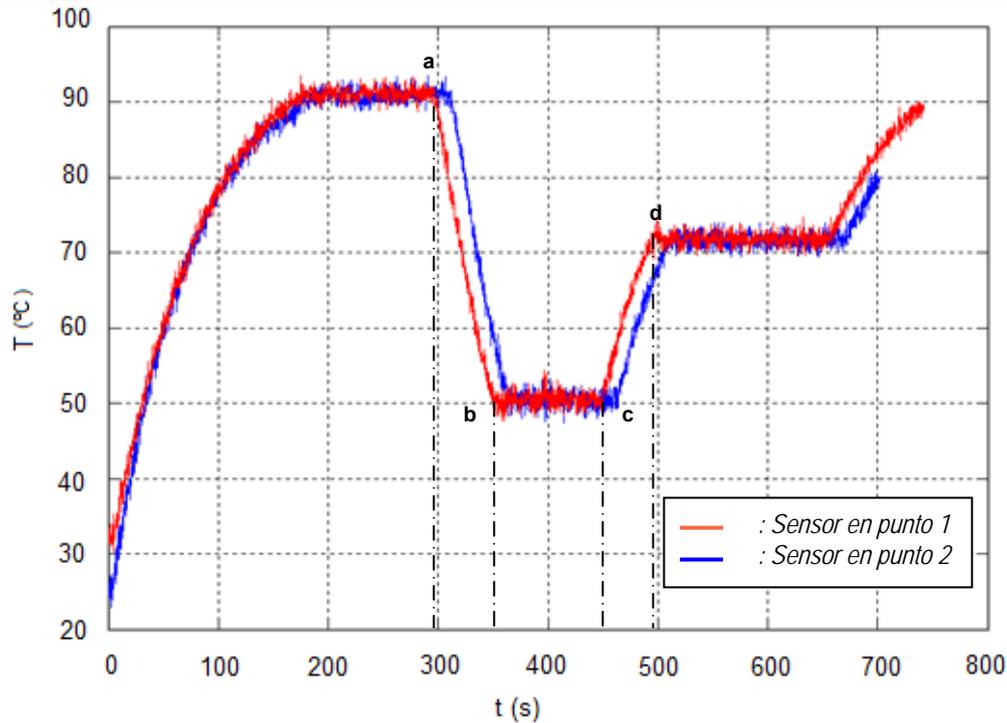


Figura 5.4 Gráfica temperatura vs. tiempo en los puntos de prueba 1 y 2 .

A continuación analizamos la curva de temperatura en cada una de las etapas del PCR tomando en cuenta la respuesta del sensor en el punto 1 (en rojo).

Análisis en el entorno del punto de Desnaturalización 91°C

Los valores alcanzados se grafican en la figura 5.5. Puede apreciarse la dispersión de los valores de la temperatura alrededor de los 91 °C superando inclusive en dos grados centígrados a la temperatura de desnaturalización. La gráfica muestra además la media y la mediana. En este intervalo se obtiene un máximo y mínimo de temperatura de 93.5°C y 88.7°C respectivamente. Sin embargo, la mediana presenta un valor ideal cercano al punto de desnaturalización.

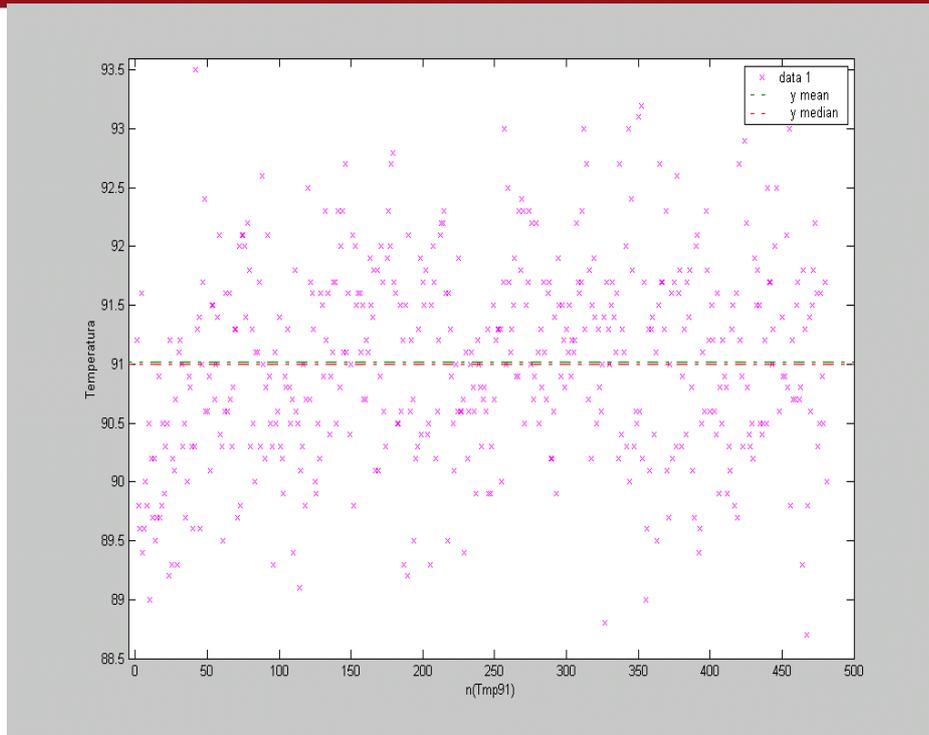


Figura 5.5 Estadísticas para la variable temperatura: Media = 91.02 (línea horizontal verde), Mediana = 91 (línea horizontal roja).

A continuación se grafica el histograma para visualizar el error en cada punto utilizando la misma herramienta del MATLAB. Se calcula la media del error. Su valor es bajo e igual a 0.0173°C. En la gráfica 5.6 se observa que el error de temperatura supera los dos grados centígrados.

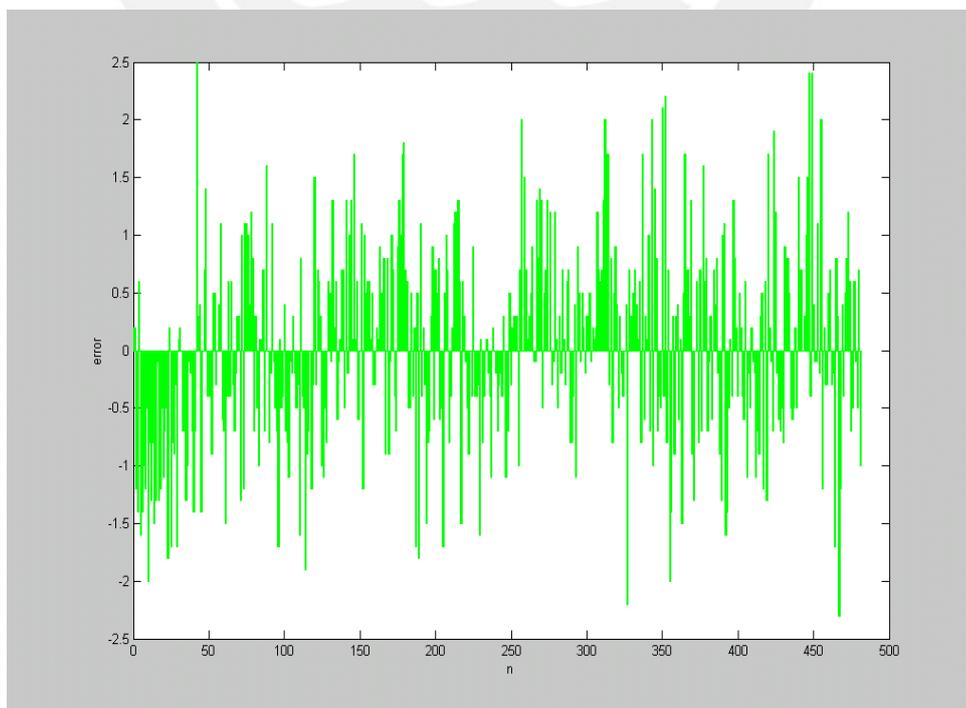


Figura 5.6 Histograma del error en este intervalo de tiempo.

Análisis en el punto de Hibridación 50°C

A diferencia del caso anterior, existen sobrepicos de temperatura que alcanzan los 4°C por encima de la temperatura de hibridación programada y hasta 2.5°C por debajo de la misma. La media es de 50.41 y la media de 50.4 (figura 5.7). El resultado del histograma muestra de mejor manera los sobrepicos de temperatura.

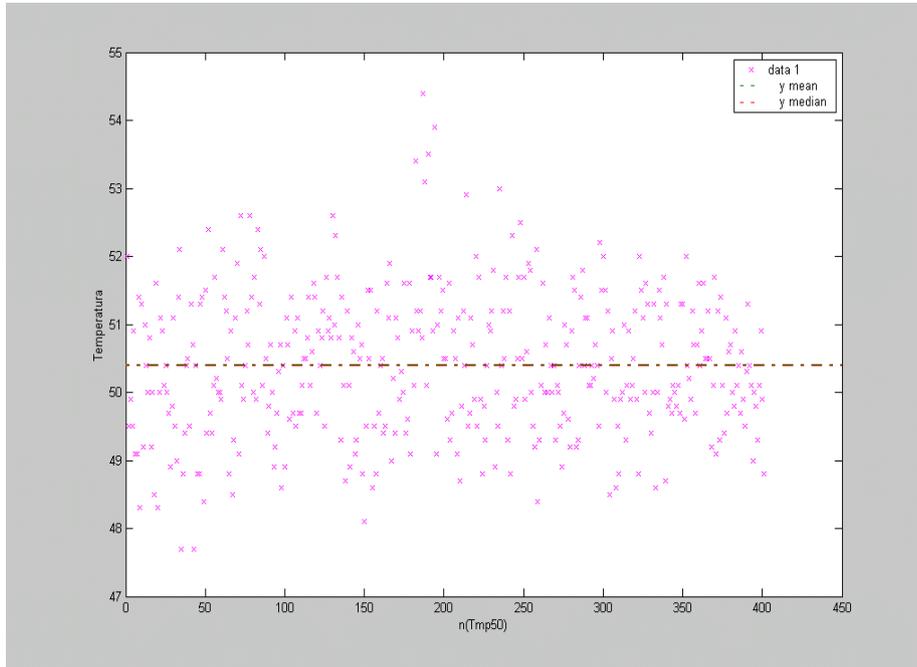


Figura 5.7 Estadísticas para la variable temperatura: Media: Línea punteada verde, Mediana: Línea punteada roja

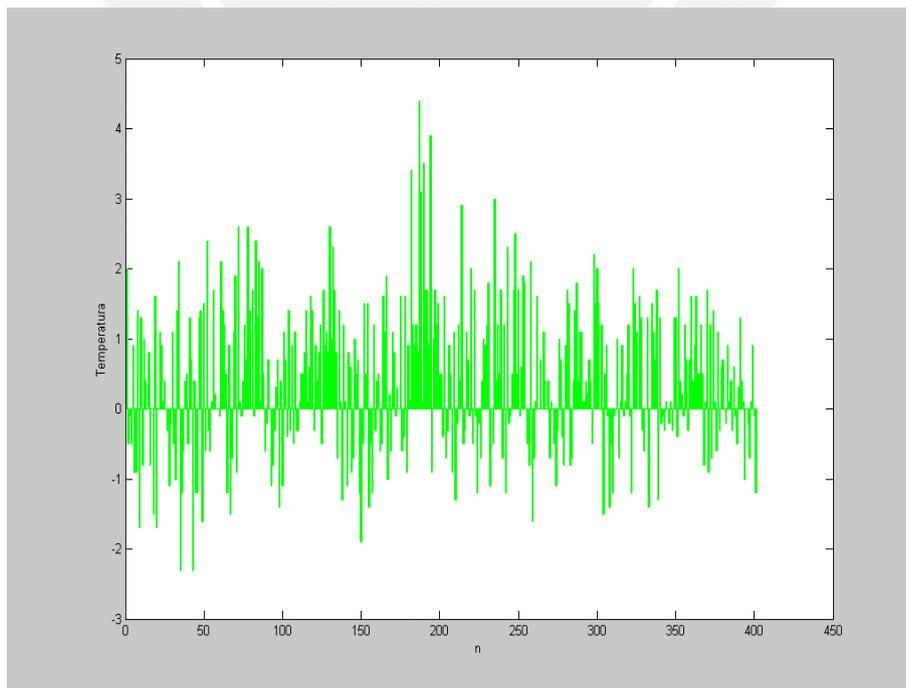


Figura 5.8 Histograma de la variable del error en la etapa de hibridación.

Análisis en el punto de estabilización 72°C

Para la etapa de extensión se grafican los valores de temperatura alrededor del valor deseado que es en este caso 72 °C.

En los 3 casos el valor medio de la temperatura y su valor es 71.8°C, está muy cerca del valor programado pero no ocurre lo mismo con los valores instantáneos. En la gráfica 5.9 se muestra la dispersión de la temperatura alrededor de la temperatura de 72°C.

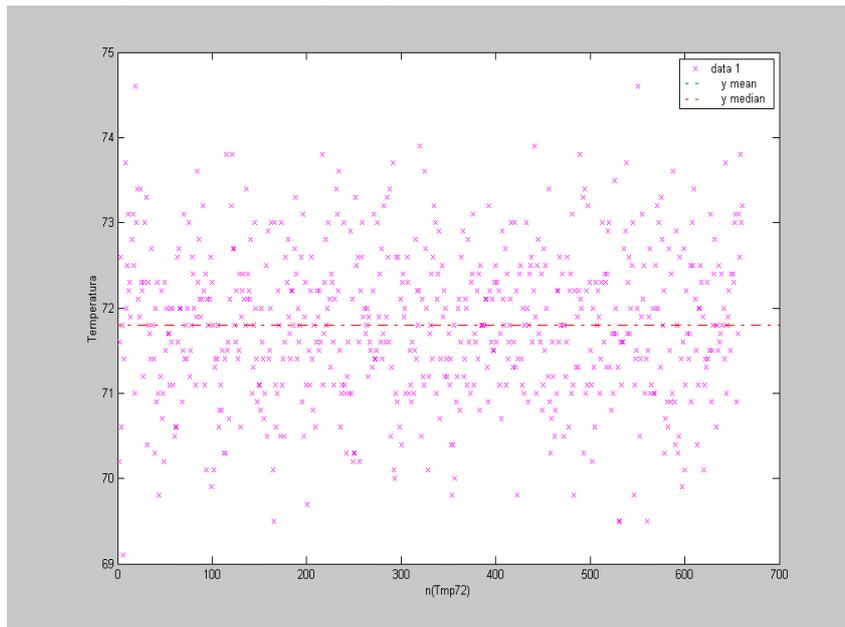


Figura 5.9 Estadísticas para la variable temperatura: Media =71.8, Mediana = 71.8

MCMXVII

5.4 COSTOS

La tabla 5.2 muestra el costo de los materiales.

Tabla 5.2

ITEM	INSUMO	CANT	SUB TOTAL (S/.)
1	Microcontrolador PIC 16F877	1	28.00
2	Pantalla LCD 20x4 Optrex	1	50.00
3	Teclado 16 botones	1	20.00
4	Mosfet driver LT1158	2	24.00
5	Mosfet IRFZ44	4	18.00
6	Optoacoplador 4N25	1	1.00
7	Bobina 180uH	2	48.00
8	Bobina 120uH	2	48.00
9	Amplificador de instrumentación INA125	1	20.00
10	Termilinear 44018	1	140.00
11	Integrado MAX232	1	2.50
12	Celda Peltier 1.4-127-10L	2	72.00
13	Celda Peltier 0.8-254-06L	2	72.00
14	Ventilador 12V	2	10.00
15	Disipador de calor	2	15.00
16	Plata pura y maquinado	1	650.00
17	Bloque de aluminio	1	48.00
18	Separador de aluminio	1	65.00
19	Componentes diversos	1	20.00
20	Pasta conductora	1	3.50
	TOTAL DE MATERIALES		1,355.00
	COSTO DE INGENIERÍA (2 Ingenieros x 6 meses) = 2 x 3,000 x 6		36,000.00
	COSTO TOTAL		37,355.00

CONCLUSIONES

1. Se diseñó un software escrito en lenguaje ensamblador, con el que se manejó el control térmico en los bloques y se midieron los valores de temperatura, lográndose variaciones entre 0°C y 96°C , superando así el rango deseado.
2. Se construyó la etapa de control del sistema basada en un microcontrolador PIC16F877, y la etapa de potencia basada en un puente H con Mosfets de potencia (ver capítulo 5) y filtro pasabajo LC, cumpliéndose los objetivos propuestos en la tesis.
3. El bloque metálico de plata construido no resulta óptimo, careciendo de hermeticidad y forma precisa. La técnica empleada para su fabricación (fundición y rectificación manual de la superficie) no son las más adecuadas.
4. Se importó un bloque metálico de aluminio y las pruebas realizadas en él resultan en un retardo en la respuesta de temperatura de aproximadamente 200 segundos respecto al bloque de plata. Si bien es cierto que es considerable, el patrón de variación de temperatura, *i.e*, la forma de la gráfica tiempo vs. temperatura, no se ve afectada. Por ello se podría también fabricar un bloque metálico en Aluminio.
5. Con el bloque de plata, el sistema desarrollado realiza el calentamiento y enfriamiento a una velocidad aproximada de 0.4°C/s , utilizando una sola celda Peltier modelo 0.8-254-06L. Con la celda Peltier modelo 1.4-127-10L se logró mejorar la velocidad de enfriamiento, llegó hasta 0.8°C/s , pero la velocidad de calentamiento permaneció en 0.4°C/s .
6. El rango de temperaturas logradas en el Módulo Digital Programable va desde 0°C hasta 96°C , pudiendo así construir un sistema con características similares a los módulos comerciales. Esto se logró con el uso de un arreglo de termistores conocido como Termilinear cuya respuesta proporciona una adecuada linealidad en todo el rango de trabajo, existiendo un error de 0.8°C en temperaturas superiores a los 85°C , entre 0.5°C y 0.8°C en el rango de 80°C hasta 85°C y un error menor a 0.35°C para temperaturas inferiores a 80°C .
7. El teclado numérico y la pantalla de cristal líquido (LCD) elegidos, fueron adecuados para el ingreso y visualización de los datos procesados en el Módulo Digital Programable desarrollado.
8. El sistema Disipador de calor-Ventilador que se usó fue suficiente para evacuar el flujo de calor absorbido desde la bandeja de plata en los ensayos con los dos materiales y así alcanzar las temperaturas objetivo.

9. Los resultados han sido sometidos a análisis estadísticos haciendo uso del programa MATLAB, pudiéndose observar variaciones puntuales de temperatura menores a 2.5°C tanto en las etapas de calentamiento como enfriamiento, como se pueden observar en los gráficos No. 5.5, 5.7 y 5.9. Las causas se pueden deber a interferencias externas en la temperatura del bloque metálico por no tener un aislamiento térmico adecuado.
10. La principal fuente de error de medición de temperatura del sistema es el contacto no óptimo entre el sensor de temperatura y el bloque metálico (el de plata o el de aluminio). El sensor tiene forma redondeada y no tiene el mismo contorno que el fondo del agujero maquinado con un taladro en ambos bloques metálicos. La pasta conductora utilizada no es totalmente eficiente para reducir este error. De igual manera el sistema mecánico total no está fijo y se generan desplazamientos y movimientos entre sus componentes que derivan o pueden derivar en resultados inesperados.



RECOMENDACIONES

1. Se sugiere utilizar dos celdas Peltier para realizar los ensayos y obtener una velocidad de cambio de temperatura alrededor de 1°C/s . Sin embargo, se debe incrementar la rampa de temperatura hasta un valor aproximado de 2°C/s para disminuir el tiempo de duración de cada ciclo de PCR y estar acorde a especificaciones de equipos comerciales. Para esto es imprescindible mejorar el diseño del bloque metálico para los tubos portamuestras empleando herramientas como software de diseño mecánico para modelar el bloque y realizar simulaciones y estudios de la transferencia de calor, temas que le competen al área de la Ingeniería Mecánica. En la figura 1 se puede apreciar el bloque metálico de Biometra [6] el cual tiene una forma bastante compleja.

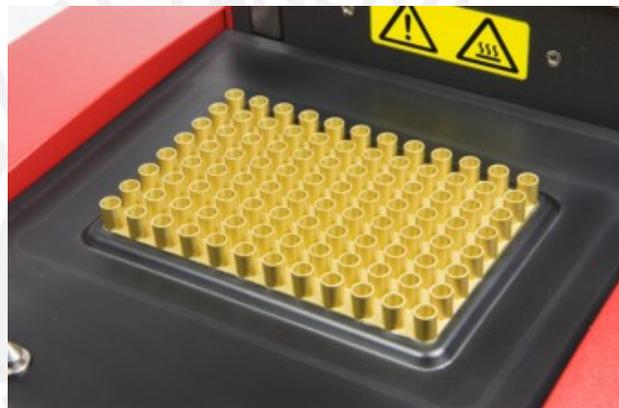


Figura 1. Bloque metálico del fabricante Biometra [6].

La hermeticidad debe incluir una cubierta de material aislante térmico alrededor de la celda Peltier para impedir la disipación de calor al medio ambiente como se sugiere en la figura 2a. La figura 2b muestra la tapa de cierre del compartimiento superior, que tiene un elemento calentador que evita la condensación en las muestras.

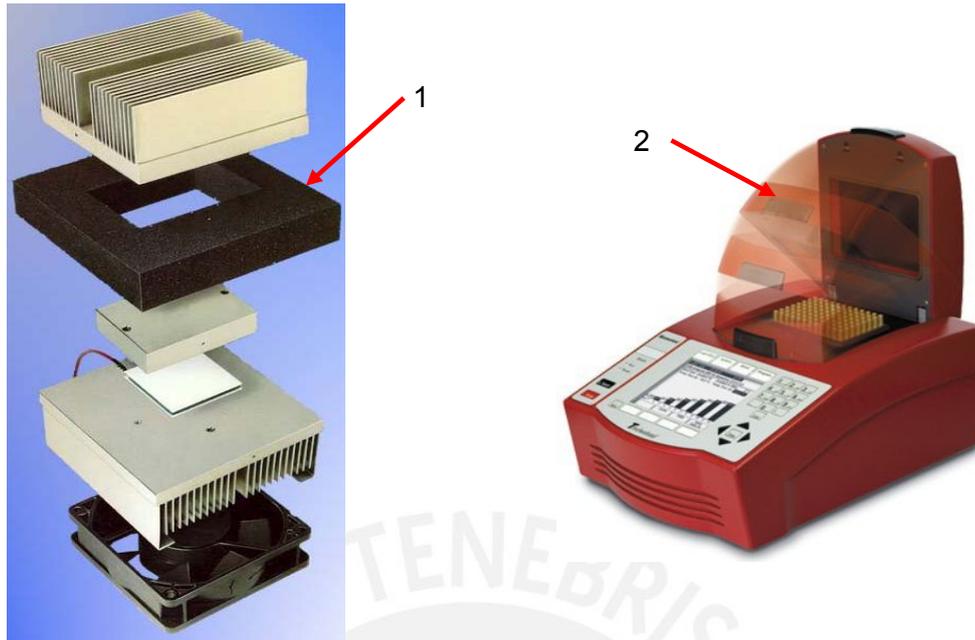


Figura 2. (a): Sistema bloque metálico-peltier-disipador con un material termoaislante alrededor de la celda Peltier (1). (b): Termociclador del fabricante Biometra con tapa para evitar condensación en microtubos (2).

2. Al finalizar todos los ciclos del PCR, se deben llevar las muestras a una última etapa de enfriamiento en donde se mantiene indefinidamente a una temperatura aproximada de 10°C. A esta etapa también se le conoce como Conservación.
3. Se debe mejorar el sistema de fijación y contacto del sensor al bloque metálico y del bloque metálico al disipador de calor para tener un bloque fijo con menores pérdidas térmicas y con índices de error bajos por manipulación de los componentes mecánicos o del sensor de temperatura.
4. Se podría optimizar el control del duty cycle, mediante la implementación de alguna técnica del control clásico (P, PI, PD, PID) para la temperatura.
5. Si bien se empleó la comunicación serial con la PC para posteriormente graficar los valores de temperatura, se recomienda desarrollar un programa ejecutable en la PC para mostrar una gráfica en tiempo real de la temperatura y la información del avance del proceso PCR con la correspondiente impresión de un reporte final de resultados.
6. Se desconoce aún la respuesta al cambio de temperatura en una muestra dentro de los microtubos colocados encima del bloque metálico. Las pruebas y los resultados han sido efectuados directamente dentro del bloque metálico. Por existir una interfaz adicional bloque metálico-microtubo se espera un cambio en la respuesta a la temperatura sobre la muestra misma. Para medir la

temperatura dentro del microtubo se sugiere utilizar los microtubos comerciales elaborados con polipropileno puro (al 99.9%), polímero que ofrece un alto coeficiente de conductividad térmica y resistencia a temperaturas de hasta 150°C.

7. Se recomienda diseñar una fuente de alimentación específica para este sistema con un manejo de potencia eficiente y adecuado para los requerimientos.
8. Se recomienda coordinar con Ingeniería Mecánica el diseño y construcción de un chasis para alojar las tarjetas electrónicas y el sistema de fijación del bloque metálico conteniendo el dissipador de calor y ventilador.



BIBLIOGRAFIA

- [1] Angulo Usategui, J; Angulo Martínez, I. (1999) *Microcontroladores PIC Diseño práctico de Aplicaciones*. Mc Graw Hill/interamericana de España, S.A.U. Madrid.
- [2] Apex Microtechnology; Application Note 30 PWM Basics. Fecha de consulta: 10 de Agosto del 2008. <http://apex.cirrus.com/en/products/apex/documents.html>.
- [3] Apex Microtechnology (2001) PWM Low Pass Filtering. Application Note 32. Fecha de consulta: 10 de Agosto del 2008. <http://apex.cirrus.com/en/products/apex/documents.html>
- [4] Aplicaciones de la Secuenciación de ADN. Fecha de consulta . Disponible en: http://www.mpfh.gob.pe/iml/div_bioadn.php
- [5] Bannister, B.R.; Whitehead, D.G. (1994) *Instrumentación: Transductores e Interfaz*. Addison Wesley Iberoamericana. Estados Unidos
- [6] Biometra. Fecha de consulta: 05 de diciembre del 2008. www.biometra.de/roll.html
- [7] Burr-Brown (1998). *Instrumentation Amplifier with Precision Voltage Reference*. INA 125 Datasheet.
- [8] Coughlin, Robert; Driscoll, Frederick (1999) *Amplificadores Operacionales y Circuitos Integrados Lineales*. Prentice Hall. México
- [9] Curtis, Elena; Barnes, Sue. (2008). *Biología*. Ed. Médica Panamericana.
- [10] DALLAS SEMICONDUCTOR MAXIM (2002) *PWM Temperature Controller for Thermoelectric Modules. Application Note 1757. (2002)*
- [11] Departamento de máquinas y motores – térmicos – Escuela Universitaria Politécnica de Donostia-San Sebastián. España.
- [12] Eppendorf. Video de PCR y procesos adjuntos. Real-time PCR. Fecha de consulta: 05 de diciembre del 2008.
<http://www.eppendorfn.com/int/?l=131>
<http://www.eppendorfn.com/int/index.php?l=131&sitemap=2.1&pb=fbfa65f41e5b02f3&action=products&contentid=1&catalognode=22330>
- [13] Hitachi. HD44780U (Dot Matrix Liquid Cristal Display Controller/driver).
http://www.datasheetcatalog.com/datasheets_pdf/H/D/4/4/HD44780UA00FS.shtml
- [14] Horenstein, Mark (1995). *Microelectrónica: Circuitos y dispositivos*. Prentice Hall Inc. México.
- [15] Huang, L., Wang W., Murphy M. (August 1999). *Peltier Effect module for highly localized temperature manipulations*. *American Institute of Physics*, Pag. 4398 –4403.
- [16] Interfacing to HITACHI 44780 based LCD. <http://homepage.hispeed.ch/peterfleury/avr-lcd44780.html>
- [17] Jegalian, Karin (1999); *The Gene Factory. Technology Review. Vol102 / No. 2*
- [18] Leigh, James R., *Applied Control Theory*. (1988). Institute of Electrical Engineers.
- [19] Linear Technology (1996). *Linear Technology Magazine Circuit Collection, Volume II. Application Note 66*. http://www.datasheetcatalog.com/datasheets_pdf/L/T/1/1/LT1158.shtml
- [20] Linear Technology, LT1158 datasheet. *Half Bridge N-channel Power MOSFET driver*.
<http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/lineartechnology/Lt1158.pdf>
- [21] Marlow Thermoelectric Cooler. Marlow Industries Inc. www.marlow.com [22] MELCOR. Structure and Function. MELCOR es actualmente parte del Grupo LAIRD TECHNOLOGIES <http://www.lairdtech.com>
Thermoelectric Handbook. Archivo actualizado en la web de Laird Technologies. Accesible en: <http://www.lairdtech.com/Products/Thermal-Management-Solutions/Thermoelectric-Modules/>

- [23] Mitra S, D'Souza S, Cooper, R (1999). Technology Inc. *Using the Analog-to-Digital (A/D) converter*
- [24] MJ RESEARCH Product Catalog (2000).
<http://www.labtrade.com/mjr/mjr.htm>
- [25] National Semiconductor. (1986). *LM34/LM35 Precision Monolithic Temperature Sensors*. Application Note 460.
- [26] Palacherla, Amar. Microchip Technology Inc. (2002). *Using PWM to generate Analog Output*. AN538.
- [27] Palmer, M. Microchip Technology Inc. (1999) *Using the PWM*. AN564
- [28] Parodi, A; Pérez, R; Bedo, G. Sección Genética Evolutiva – Facultad de Ciencias. Montevideo-Uruguay. *Técnicas de ADN recombinante*.
- [29] Richard Markell (1996) *Application Note 66*, Linear Technology Magazine Circuit Collection. Linear Technology.
- [30] Savant, C.J/ Roden, M / Carpenter, G. (1992). *Diseño Electrónico*. Addison-Wesley Iberoamericana. Estados Unidos.
- [31] Schilling, Donald; Belove, Charles (1993) *Circuitos Electrónicos discretos e integrados*. Mc Graw Hill. España.
- [32] Shu-Hui Chen (2003). Pharma Genomics. *Microchip Electrophoresis and the analysis of PCR products*
- [33] SUPERCOOL AB. *Thermoelectric Solutions*. Hoy es parte de Laird Technologies. Catálogo informativo descargado de internet. (2004)
<http://www.europanthermodynamics.com/thermoelectrics/Supercool%20PDFs/Supercool%20TEA%20brochure.pdf>
- [34] Stapleton, H; O'Grady A, Analog Devices (2001) *Isolation Techniques for high-resolution data-acquisition systems*. EDN, pag 113-118.
- [35] Techne 4400. Fecha de consulta: 2 de Marzo del 2004
<http://www.techneusa.com/lifescienceproducts.htm>
<http://www.bcgrouptnl.com/Process/Techne/4400.htm>
- [36] Tellurex Corporation (2002). Introduction to thermoelectrics. FAQ.
<http://www.tellurex.com/cthermo.html>
<http://www.tellurex.com/12most.html>
<http://www.tellurex.com/pdf/peltier-faq.pdf>
- [37] The Scientist Inc. (1998). *Thermal Blocks Table*.
- [38] Trolander, H (1997). Thermistor Development. *Isotech Journal of Thermometry*. Vol 8 / No. 2
- [39] Kimberle Chapin, Tsai-Ling Lauderdale. Evaluation of a Rapid Air Thermal Cycler for detection of *Micobacterium Tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. Agosto 1997, p. 2157-2159.
- [40] Universidad Politécnica de Madrid. Departamento de Electrónica, Automática e Informática Industrial. Práctica de Servosistemas. *Modelado de una célula Peltier*.
- [41] Wolfson Microelectronics. Class D Headphone Filter Component Selection. WAN_0181
- [42] <http://www.labroe.com/boletines/1/pcr.aspx>. Laboratorio Clínico ROE. Fecha de consulta: 20 de Setiembre del 2008.
- [43] http://es.wikipedia.org/wiki/Amplificaci%C3%B3n_gen%C3%A9tica. Consultas en Wikipedia. Fecha de consulta: 20 de Setiembre del 2008.
- [44] <http://es.wikipedia.org/wiki/ADN>. Consultas en Wikipedia. Fecha de consulta: 20 de Setiembre del 2008

- [45] [http://www.unavarra.es/ets02/Introduccion%20a%20TE\(c\).htm](http://www.unavarra.es/ets02/Introduccion%20a%20TE(c).htm). Fecha de consulta: 16 de Setiembre del 2008.
- [46] <http://es.wikipedia.org/wiki/Termoelectricidad>. Fecha de consulta: 22 de Setiembre del 2008.
- [47] Winder, Edmund; Ellis Arthur; Lisensky, George. Thermoelectric Devices: Solid-State Refrigerators and Electrical Generators in the Classroom, Journal of Chemical Education Oct 1996 Vol. 73 N°10 p. 940
- [48] YSI. YSI Precision Thermistor and Probes Catalog. www.ysi.com
- [49] <http://equipos.pucp.edu.pe/equipos/ver.php?id=30>. Fecha de consulta: 30 de octubre del 2009.
- [50] Laboratorio BioRad.
http://www.bio-rad.com/evportal/en/US/LSR/Category/75f1b406-3746-4580-a998-74245b094f56/Thermal_Cyclers
- [51] Laboratorio Eppendorf.
<http://www.eppendorf.com/int/index.php?sitemap=2.3&pb=45ffd85fd374b06c&action=products&contentid=1&catalognode=65631&productpage=3>
- [52] Laboratorio Stratagene.
<http://www.stratagene.com/homepage/>
- [53] Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Julie Logan, Kirstin Edwards, Nick Saunders. (2009) Caister Academic Press, Norfolk, UK
- [54] Universidad de Bristol. The Core. Thermal Physics. Tutorials
<http://www.gly.bris.ac.uk/www/core/physics/thermal.html>
- [55] MattWorks. Matlab.
<http://www.mathworks.com/>
- [56] Texas Instruments. *Closed-Loop Temperature Regulation Using UC3638 H-Bridge Motor Controller and a Thermoelectric Cooler*. Application Report SLUA202A. Septiembre 2001.
- [57] Sistelec Automatización Industrial. Termoelectricidad y Celdas Peltier. Documento en pdf: Más info sobre celdas Peltier.
www.sistelec.com.ar
- [58] MELCOR. *CP Series TECs*. Accesible en:
http://www.knap.at/datenblaetter/pel/pel_mel_cp.pdf
- [59] MULLIS, Kary (1990), "The unusual origin of the polymerase chain reaction". Scientific American" vol. 262, págs. 56-65.
- [60] GIDEMS. Grupo de Investigación de Equipos Médicos y Sistemas.
<http://gidems.pucp.edu.pe/>
- [61] Equi-LaB. Grupo de Desarrollo de Equipos para Laboratorios Biológicos
<http://www.e-quipu.pe/pucp/equipos/ver.php?id=23>
- [62] QIAGEN. Rotor Gene Q. Accesible en:
<http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneQ.aspx#Tabs=t0>