

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

DISEÑO Y DESARROLLO DE EQUIPO DE PCR EN EL MARCO DE UN LABORATORIO AUTOSUSTENTABLE

Bellesi, Matías – LU 1035725

Glasman, Julieta – LU 1050557

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Prada, Federico

Año 2022

UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	7
1.1 La reacción en cadena de la polimerasa	7
1.2 Tecnología de los termociladores	11
2.0 Antecedentes	12
2.1 Electrónica del equipo: Plataforma ATMEL - Arduino	13
2.2 UADE – Laboratorio autosustentable	14
3.0 Objetivo general y específicos	15
4.0 Materiales y métodos	16
4.1 Lista de materiales “electrónicos” utilizados en el desarrollo	16
4.2 Protocolos para pruebas biológicas	17
5.0 Desarrollo y resultados	19
5.1 Diseño, desarrollo y ensayos del módulo sensor	19
5.2 Diseño y desarrollo y pruebas del módulo termo ciclador	29
5.3 Software Arduino	44
5.4 Pruebas del módulo termociclador	53
5.5 Diseño y desarrollo del programa de interfaz usuario-equipo	65
5.6 Ensayo de prototipo vs. PCR de UADE LABS	66
6.0 Discusión	74
6.1 Funcionalidad	74

6.2	Evaluación económica (comparación con comerciales y Open Source)	75
7.0	Conclusión	76
8.0	Bibliografía	78
9.0	Anexos	81

Agradecimientos

Queremos agradecer a Federico Prada por su ayuda al guiarnos y por tenernos paciencia con el tiempo que nos tomamos en hacer este proyecto. A Guillermina Zola por toda su ayuda y predisposición en el laboratorio. A Hector Bellesi por su asistencia y préstamo de herramientas y materiales para el Armado del equipo. A nuestras parejas Giselle Arnodó y David Brakin por la paciencia con el proyecto y carrera. A nuestros compañeros y amigos que nos ayudaron a transitar los años de carrera. Y finalmente a nuestros familiares y amigos por todo su apoyo durante estos años.

Resumen

Este proyecto buscó diseñar y desarrollar, de manera económica, un prototipo de equipo de PCR o cicladora en el contexto de un laboratorio autosustentable. El diseño consistió en un conjunto de termociclador con un módulo sensor cualitativo para discriminar la presencia de producto. Se desarrolla con el objetivo de que el equipo sea reproducible por cualquier investigador, profesor, estudiante o aficionado que desee poseer uno propio siguiendo una guía de armado, adquiriendo los diferentes componentes y utilizando el software desarrollado para este proyecto.

El prototipo desarrollado fue puesto a prueba por comparación con un equipo perteneciente a UADE LABS disponible en el laboratorio de UADE LABS cumpliendo la función de replicar una secuencia específica de ADN, detectada posteriormente en gel de electroforesis y por el módulo sensor.

Mediante los resultados se pudo concluir que el prototipo es funcional, puede ser utilizado en laboratorio y replicado para su uso. El proyecto puede ser continuado en el futuro ya sea realizando modificaciones del equipo para obtener mejoras funcionales o estéticas o también desarrollando kits para análisis que puedan ser utilizados como métodos de screening en conjunto con el equipo.

Abstract

This project sought to economically design and develop a prototype PCR equipment or cyclor in the context of a self-sustaining laboratory. The design consisted of a thermocycler assembly with a qualitative sensor module to discriminate the presence of product. It is developed with the aim that the equipment is reproducible by any researcher, teacher, student or hobbyist who wishes to have their own by following an assembly guide, acquiring the different components and using the software developed for this project.

The developed prototype was put to the test by comparison with commercial equipment available in the UADE LABS laboratory, fulfilling its function of replicating a specific ADN sequence, subsequently detected in the electrophoresis gel and by the sensor module.

Through the results it was possible to conclude that the prototype is functional, can be used in the laboratory and replicated for use. The project can be continued in the future either by making modifications to the equipment to obtain functional or aesthetic improvements or by developing kits for analysis that can be used as screening methods in conjunction with the team.

1.0 Introducción

1.1.- La reacción en cadena de la polimerasa

Aspectos básicos

Gracias al ingenio y dedicación de James Watson, Francis Crick y Rosalind Franklin, la comunidad científica contó, desde 1953, con uno de los secretos mejores guardados por la naturaleza: la estructura del ADN. No obstante, más allá de dicho conocimiento, hasta mediados de la década del '80, aun existían serias dificultades para realizar manipulaciones o análisis debido a que no era simple aislar, amplificar y/o identificar secuencias específicas de dicha molécula.

En 1986 el Dr. Kary Mullis, descubrió un proceso por el cual se podían producir millones de copias de un fragmento específico de ADN. Este proceso fue conocido como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis et al. 1986), trabajo por el cual ganó el Premio Nobel en el año 1993.

Gracias a esta técnica resultó mucho más fácil identificar la presencia o ausencia de una secuencia en particular y, de la misma forma, contar con una herramienta simple para generar miles de millones de copias en pocas horas.

Etapas de la PCR

La **primera** etapa de la PCR consiste en la **desnaturalización**. En esta fase la doble hélice se separa, gracias al aumento de temperatura de la muestra por sobre 90°C, en dos hebras. Se adiciona la Taq polimerasa (Brock, 1967), que soporta altas temperaturas y será la responsable de iniciar la síntesis más adelante. Además, se incorpora un primer. El primer es una cadena corta de polinucleótidos que se diseña específicamente para formar enlaces complementarios con el fragmento de ADN que se busca replicar.

La **segunda** parte de la PCR es la **hibridación**. Los *primers* se unen específicamente en una determinada secuencia de cada hebra desnaturalizada. Para promover dicha unión es necesario disminuir la temperatura, entre 40 °C y 65 °C.

La **tercera** etapa de la PCR es la **extensión**. Una vez que los *primers* forman los primeros enlaces con la secuencia de ADN complementaria se aumenta la temperatura entre 75°C y 80°C (temperatura a la cual la taq polimerasa posee su mayor registro de actividad) (Chien, et al. 1976). La taq polimerasa es una enzima que se sitúa en el *primer* y actúa sintetizando una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde. De esta forma cada hebra separada vuelve a formar una nueva doble hélice.

Estas tres etapas conforman un ciclo (**Figura 1**). Al calentar y enfriar nuevamente, se desnaturalizarán las 2 hélices de ADN conseguidas en el primer ciclo y al final se obtendrán 4 nuevas hélices de ADN. En cada ciclo se duplica la cantidad de ADN del ciclo anterior, según la fórmula 2^n , donde "n" es el número de ciclos. Al repetir los ciclos 30 veces o más se consigue aumentar de gran manera la proporción de copias de ADN. Gracias a que cada ciclo tarda pocos minutos, se obtienen millones de copias de la secuencia de interés en pocas horas. Según cada muestra a estudiar se corresponde un tiempo determinado para cada temperatura de cada paso de la PCR. 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.

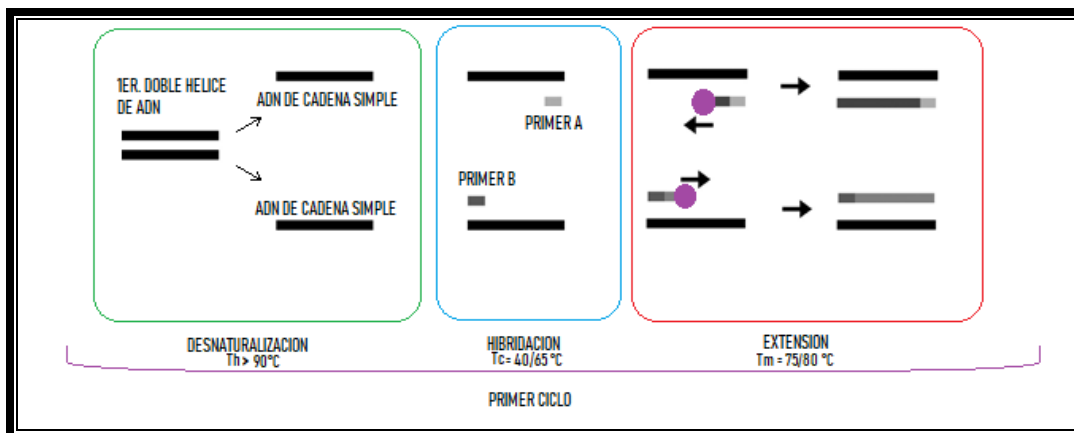


Figura 1: Primer ciclo completo de la PCR. Primer paso: desnaturalización de la doble hélice de ADN, donde T_h es la temperatura de desnaturalización. Segundo paso: hibridación de las cadenas simples de ADN con los *primers*, donde T_c es la temperatura de hibridación. Tercer paso: extensión de los *primers* por medio de la actividad sintética de la Taq polimerasa, donde T_m es la temperatura de extensión.

Luego de completar el número de ciclos específico para la muestra queda una etapa **final**. En la **elongación final** se lleva la temperatura a 70-74 °C durante 5-15 minutos, asegurando así que no quede ninguna cadena simple de ADN sin ampliar.

Tipos de PCR y aplicaciones

Existen diferentes tipos de PCR comerciales que cumplen o facilitan una función en específico.

Para una **PCR convencional** solo se necesita una ADN polimerasa, magnesio, nucleótidos, *primers*, el ADN molde que se desea amplificar y un termociclador. El mecanismo de la PCR es la reacción descrita anteriormente donde cada paso del ciclo debe ser optimizado por el investigador de acuerdo con el ADN molde y el set de *primers* utilizados. Este ciclo de amplificación se repite tantas veces como sea necesario según la muestra y el producto amplificado puede ser analizado.

La PCR cuenta con múltiples aplicaciones en diferentes áreas de interés como la medicina forense, medicina clínica o arqueología entre otras. La PCR convencional es una buena herramienta para conocer un diagnóstico de enfermedades infecciosas, devolviendo los resultados en pocas horas. También es una buena herramienta para el estudio taxonómico.

La **PCR de transcripción inversa o RT-PCR**, permite el uso de ARN como molde en vez de ADN como sucede en la convencional. Esto es gracias a que posee un paso adicional el cual permite la detección y amplificación del ARN. El ARN se transcribe de forma inversa en ADN complementario (cADN) utilizando una transcriptasa inversa.

El primer paso de la RT-PCR es la síntesis de un híbrido ADN / ARN. La transcriptasa inversa también tiene una función RNasa H, que degrada la porción de ARN del híbrido. La molécula de ADN de cadena sencilla restante sirve entonces como molde para la formación de cADN, mediante la actividad ADN polimerasa dependiente de ADN, de la transcriptasa inversa.

A partir de aquí, se utiliza el procedimiento de PCR convencional para amplificar el cADN. La posibilidad de revertir el ARN en cADN por RT-PCR tiene muchas ventajas. El ARN es monocatenario y muy inestable, lo que dificulta el trabajo con este material.

Las aplicaciones de la PCR de transcripción inversa son para muestras donde el material genético es ARN y no ADN. Gracias a esta técnica se puede conseguir las mismas respuestas que con una PCR convencional partiendo desde un material genético distinto. De esta forma se ha agrandado la capacidad, por ejemplo, de diagnóstico de distintos tipos de agentes infecciosos.

Tanto la PCR convencional como la RT-PCR se visualizan de la misma manera, por medio de una electroforesis. Este es el paso del revelado por medio de fluoróforos, estos son agentes intercalantes de ADN que se unen al surco menor del ADN bicatenario. Tras esta unión se produce un cambio de conformación que da lugar a un incremento de la fluorescencia. Entre ellos se encuentran los fluorocromos como el Bromuro de Etidio (Higuchi et al. 1992), el YOPRO® y YoYo® de Molecular Probes (Ishiguro et al. 1995; Ogura y Mitsuhahi, 1994) y el SYBR® Green I (Becker et al. 1996); entre otros.

Se consigue un valor estimativo de la cantidad de producto que obtengo luego de la reacción. Gracias a ese valor se pueden interpretar los resultados como positivo (presencia de la secuencia de ADN o ARN en la muestra) o negativo (ausencia de la secuencia de ADN o ARN en la muestra). Como el valor de la cantidad de producto es estimativo, se trata de una técnica cualitativa, ya que permite definir a que grupo de estudio pertenece una muestra (positiva o negativa) pero no permite saber el valor exacto.

La PCR real time o qPCR es una PCR cuantitativa ya que cuantifica de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN.

La PCR y la detección se producen en el mismo vial de forma simultánea, ahorrando un paso post-PCR como la electroforesis. Esta es una cualidad única de la qPCR, ya que en los otros tipos el revelado sucede una vez terminada la PCR. La qPCR posee incorporado un lector de fluorescencia que permite una lectura, en tiempo real, de la fluorescencia emitida dentro de cada vial donde se realice la amplificación. La señal lumínica producida por esta fluorescencia será filtrada a través de los filtros específicos para los fluoróforos utilizados y captada por un detector el cual devolverá una señal eléctrica. La misma será interpretada por el programa del equipo y permitirá detectar en tiempo real la cantidad de producto amplificado. A medida que aumentan los ciclos de PCR, aumenta también la intensidad de fluorescencia emitida.

Para investigar la comparación de los niveles de expresión génica (ARNm) entre diferentes tejidos, en un mismo tejido a lo largo del tiempo, o la respuesta de un tejido a diferentes tratamientos será de gran ayuda una PCR real time. Otra aplicación es el análisis de ARN en una muestra para determinar enfermedades infecciosas, un ejemplo es el caso SARS-Cov-2. Para detectar la presencia del virus en una persona se realizan pruebas moleculares, una de ellas es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real. Es una PCR real time que previamente posee el paso típico de las RT-PCR. Permite usar muestras de ARN y obtener una cuantificación de este.

Con respecto a las aplicaciones del PCR planteada en este proyecto se espera que cumpla con los mismos objetivos que una PCR convencional.

1.2 Tecnología de los termocicladores

Todo termociclador posee una placa soporte que varía de temperatura de manera homogénea en intervalos de tiempo que pueden ser programables, normalmente con rangos de temperatura de 4 °C a 96 °C donde ocurre la desnaturalización, hibridación y extensión de una molécula de ADN. Para esto el equipo debe contar con un sistema de calentamiento, uno de enfriamiento, un sistema de control y una interfaz con el usuario.

El sistema de calentamiento debe ser capaz de elevar la temperatura de la placa soporte de tubos de reacción hasta la temperatura deseada, en un tiempo determinado, y mantenerla de manera estable. Normalmente consta de una resistencia eléctrica, la cual al pasarle una corriente eléctrica produce calor. Pueden estar fabricadas a partir de diversas tecnologías, siendo las más usuales las que aprovechan las propiedades de alambres resistivos de Nicróm o FerroNiquel, que por su gran resistividad y difícil oxidación son comúnmente utilizado en elementos de calefacción eléctrica

El sistema de enfriamiento debe ser capaz de disminuir la temperatura de la placa soporte hasta la temperatura deseada. Usualmente, aprovechando al fenómeno de convección, se utilizan ventiladores, pero pueden tener otras tecnologías más sofisticadas como placas del tipo Peltier que

funcionan transfiriendo el calor de un sitio del dispositivo al otro. Presentan la ventaja que las mismas no disponen de partes móviles y pueden llevar temperaturas que no serían alcanzables por un ventilador, incluso por debajo del cero para preservar los reactivos.

El proceso de termociclado consume mucho tiempo. Los tiempos de reacción en los que se mantienen a una temperatura constante son fijos pero los períodos en los que se producen cambios de temperatura deben ser breves. Para lograr esto se busca que el sistema de calentamiento y el de enfriamiento puedan lograr el mayor cambio de temperatura en el menor tiempo posible y de esta manera reducir al máximo el tiempo total del proceso.

El sistema de control debe controlar a los sistemas de enfriamiento y calentamiento para llevar la temperatura y mantenerla en el tiempo según los parámetros indicados. Para esto debe contar con un sensor de temperatura y una capacidad de procesamiento.

La interfaz con el usuario consiste en la forma en que el usuario puede indicarle al equipo los parámetros de temperaturas, tiempos y número de ciclos al sistema de control. Normalmente consta de un *display* o pantalla para visualizar la información y un teclado para el ingreso de parámetros.

2.0 Antecedentes

Los equipos de PCR o cicladores son provistos por empresas dedicadas a la fabricación o importación de estos. Los mismos dan soporte a laboratorios de investigación e industriales, como así a hospitales y centros médicos.

Existen distintos valores en el mercado según el tipo de PCR. Una PCR convencional comercial esta aproximadamente USD5.000, mientras que una qPCR posee un valor de USD50.000. En este contexto económico, resulta muy complicado poder acceder a esta herramienta. A lo largo de la historia de la PCR, varios proyectos surgieron con idea de desarrollar equipos económicos y eficientes. Asimismo, muchos de dichos proyectos publicaron sus diseños haciéndolos de uso y/o código abierto. Algunos ejemplos de ellos son:

- COFFE CUP PCR de Instructables: La cual vale por debajo de los USD350.
- ARDUINO PCR de Instructables: La cual posee un valor por debajo de los USD85.

- OPENPCR de ChaiBio: Con un valor de USD500.

2.1 Electrónica del equipo: Plataforma ATMEL - Arduino

Arduino es una plataforma electrónica de *open-hardware* y *open-source*, flexible y fácil de usar para la creación de prototipos que incluye un versátil procesador ATMEL. Puede ser usado tanto para desarrollar objetos interactivos autónomos, como para ser conectado a una computadora y comunicarse con varios tipos de software y además conectarse a internet pudiendo crear un sistema de internet de las cosas con sus periféricos.

Este dispositivo está basado en una sencilla placa con entradas y salidas, analógicas y digitales, en un entorno de desarrollo que está basado en el lenguaje de programación Processing. Es un dispositivo que conecta el mundo físico con el mundo virtual, o el mundo analógico con el digital.

Arduino fue diseñado para crear prototipos de objetos o ambientes interactivos usando electrónica libre. Consiste en una tarjeta de circuito impreso que puede ser adquirida a bajo costo o ensamblarse siguiendo planos disponibles de forma gratuita, se desarrolló como fuente abierta con librerías para escribir códigos para controlar la tarjeta. Está basado, como se mencionó anteriormente, en una placa con un microcontrolador ATMEL y un entorno de desarrollo, diseñado para facilitar el uso de la electrónica en proyectos multidisciplinarios. Comercialmente existen varios tipos y modelos en función de su tamaño, poder de procesamiento, cantidad de entradas/salida, entre otras características, habiendo adoptado para la presente tesis el modelo DUE, luego de varias pruebas infructíferas con otros modelos de menores prestaciones.

Una de las características principales de Arduino es que puede tomar información del entorno a través de sus entradas analógicas y digitales (**Figura 2**), puede controlar luces, motores y otros actuadores.

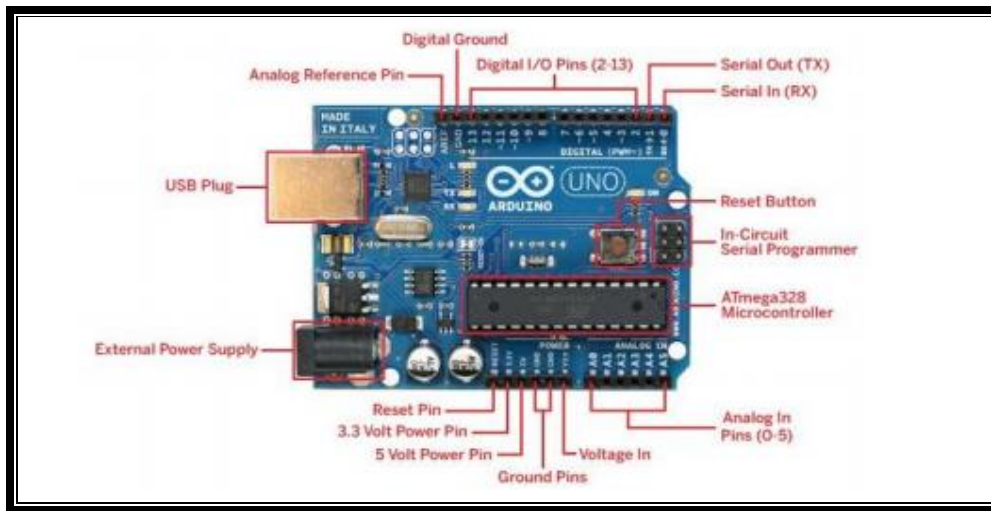


Figura 2: Componentes de placa Arduino: Los Arduino, y en general lo microcontroladores, tienen puertos de entrada, salida y comunicación. Se accede a esos puertos a través de pines, los cuales varían según la versión de Arduino.

2.2 UADE – Laboratorio autosustentable

En las Lic. en Biotecnología y Bioinformática de la UADE, las tesis o proyectos finales suelen estar orientados a la investigación. No obstante, un grupo de los mismos son presentados como desarrollos de productos científicos y tecnológicos. Dentro de este último grupo, existen trabajos/proyectos en el marco de un “**laboratorio autosustentable**”. Los trabajos finales tienen como parte de sus objetivos, ofrecer una solución a los problemas típicos que puede enfrentar cualquier laboratorio académico, pero, haciendo foco en la sustitución de importaciones y el cuidado del ambiente.

Algunos de los trabajos que se han propuesto formar parte de este subgrupo de tesis han sido:

- 1- El desarrollo de un marcador de peso molecular de ADN por Tomás Torcal.
- 2 - La producción y enriquecimiento de la enzima Taq-polimerasa por Victoria Lazzarini y Carolina Bognanni.
- 3 - El desarrollo de un marcador de peso molecular de proteínas para electroforesis en gel de poliacridamina usando fuentes proteicas no convencionales por Tamara Revello y Sebastián Assennato.

En nuestro caso, los termocicladores comerciales suelen ser muy costosos, por lo que no todos los laboratorios y espacios de enseñanza del país cuentan con uno. Más allá que el laboratorio de UADE posee dos equipos de PCR, nos consideramos parte de esta iniciativa, y nos propusimos ser parte del proyecto institucional de “laboratorio autosustentable”. Nuestro aporte tiene como propósito publicar el instructivo que permita fabricar una PCR con sensor de ADN de forma gratuita tanto para los UADE Labs como para cualquier laboratorio nacional, de contexto educativo/productivo, que no pueda asumir los gastos que conllevan equiparse con una PCR comercial.

3.0 Objetivo general y específicos

El **objetivo general** del presente trabajo es diseñar, fabricar y demostrar el funcionamiento de un prototipo de un equipo de PCR o termociclador que tenga la capacidad de amplificar y censar ADN sintetizado. Comparado con otros productos, ya existentes en el mercado, se propone el desarrollo de un equipo que resulte innovador en cuanto a su costo y que pueda ser utilizado como método de screening en trabajos prácticos de las Lic. en Bioinformática y Biotecnología y, también, en futuros proyectos finales.

Asimismo, proponemos desarrollar este equipamiento utilizando un código abierto, permitiendo su acceso a otras instituciones educativas, centros de investigación y/o centros de salud que no cuenten con un presupuesto para adquirir una cicladora.

Los **objetivos específicos** son:

- Desarrollo de un prototipo para la semicuatificación de producto (módulo sensor del equipo).
- Realizar pruebas a diferentes niveles de concentración de ADN con el prototipo sensor.
- Diseñar el prototipo del módulo PCR del equipo.
- Realizar pruebas con el fin de verificar el funcionamiento del prototipo.
- Poner a punto los parámetros de una técnica de PCR (cantidad de ciclos, duración y temperatura de cada ciclo, cantidad de muestra y primers necesarios), a fin de obtener

un protocolo de trabajo para poder ser utilizado en conjunto con el equipo de PCR.

4.0 Materiales y métodos

4.1 Lista de materiales “electrónicos” utilizados en el desarrollo (sin explicación, divididos por categorías)

El hardware es un ensamblado de múltiples partes que conforman dos módulos, el módulo termociclador y el módulo sensor.

Módulo Termociclador

El presente módulo consta de:

- Soporte de tubos: consta de un bloque de aluminio (reciclado de un disipador de un procesador de PC, el mismo fue adaptado en tamaño y masa para poder contener a los tubos de PCR).
- Fuente de 24V 15A 360W
- Tabla de madera de 17,5 cm x 30,0 cm x 2,0 cm
- Tabla de madera de 4,0 cm x 5,0 cm x 2,0 cm
- Dos resistencias PF2472 de 100 watts de potencia.
- *Cooler v80e12bga7-07.*
- Sensor LM35Z
- Gabinete de fuente de PC
- Placa Arduino Due
- *Display Arduino LCD KeyPad Shield (SKU: DFR0009)*
- Cables de 2mm², de 1,5 mm² y de 0,35 mm²
- Separadores caseros con tornillo y tubo cristal
- Placa de unión Arduino diseñada con el programa Altium (versión 2014).

- La placa base se envió a producir a China, pero puede producirse de manera artesanal, se detalla en el punto 5.2

El ensamblado de los componentes en la placa base se realizó de manera artesanal con soldador y rollo de estaño.

Modulo sensor

El presente módulo consta de:

- Detector dinero falso marca Interelec modelo MD-188
- *Digital Multimeter* DT830D
- Placa de prueba casera
- Sensor de Luz Ambiental Breakout Temt6000 Arduino
- Filtro de 600nm 11,8mm de diámetro
- Soporte de tubos impreso en 3d

4.2 Protocolos para pruebas biológicas

Todos los protocolos utilizados en las pruebas biológicas se encuentran detallados en el Anexo I.

Extracción de ADN

Para la obtención del ADN genómico (Miniprep) se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic ADN Purification Kit de la empresa Promega. Utilizado en una cepa XL1Blue de **E. coli** brindada por el laboratorio de UADE. Se siguió según el protocolo del kit en el punto para el aislamiento de ADN genómico para bacterias Gram Positivas y Negativas.

Protocolo de PCR

Para la preparación de la *mastermix* se siguió el protocolo de amplificación por PCR del gen 16s en bacterias del tp 3 de la Guía de Actividades Curso 2015 de la materia “Genética Molecular” de UADE.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- **rD1/fD1:**

95 °C 5 minutos	} 35 ciclos
94 °C 1 minuto	
55 °C 1 minuto	
72 °C 2 minutos	
72 °C 3 minutos	

Gel de Agarosa

El gel se preparó según el protocolo de la guía de laboratorio de la materia “Introducción a la Biología Molecular y Celular” del año 2013 de la UADE.

5.0 Desarrollo y resultados

El equipo se desarrolló por módulos para facilitar el avance en las diferentes funciones. Esta separación consta del módulo sensor por un lado y el módulo termociclador por otro. Este último, a su vez, se divide en componentes electrónicos y su programación y componentes mecánicos.

5.1 Diseño, desarrollo y ensayos del módulo sensor

El módulo sensor tiene la función de detectar y semi cuantificar el ADN. Esto se logra gracias a la fluorescencia del ADN unido al Bromuro de Etidio excitado con luz UV. La luz emitida por la fluorescencia es filtrada por un filtro específico para la longitud de onda correspondiente, es detectada por un detector, el cual emite una señal eléctrica que es amplificada y representada como un valor de intensidad lumínica.



Figura 3: Esquema del recorrido de la luz emitida hasta el detector de luz. El detector emite una señal de corriente eléctrica muy pequeña (en nano amperes) por lo que para interpretarla se necesita un amplificador el cual convertirá esta señal en voltaje el cual puede ser leído más fácilmente. Se utilizó un amplificador lineal, debido a que la concentración del analito es proporcional a la intensidad de la fluorescencia (transmitancia), a diferencia de la espectrometría de absorción en la que la concentración del analito es proporcional a la absorbancia (Denicola, 2017).

Placa de pruebas

Se realizó un circuito preliminar para evaluar cómo debía estar compuesto el amplificador, ya que el resultado de la lectura dependerá de la resistencia que se utilice.

Se utilizaron 5 posibles resistencias R1, R2, R3, R4 y R5 (**Figura 4**) de diferentes valores para observar cual genera una ganancia necesaria en el amplificador para poder observar una lectura. Cabe aclarar que podría haberse utilizado una resistencia variable o potenciómetro del tipo preset para circuitos impresos, pero fue descartado por ser inestable térmica y mecánicamente.

Para cambiar entre una resistencia y otra se utilizó una ficha de 10 pines con un conector jumper el cual cierra el circuito para utilizar cada resistencia según la posición (**Figura 4**). Se optó por la de máximo valor, R5 (resistencia de 100M entre terminal 2 y 6 de U1) ya que en las demás no se observaba señal de la detección

La placa para las pruebas iniciales se realizó por método de transferencia térmica. La producción de esta placa se realizó diseñando el circuito con el programa Altium (**Figura 5**) y se imprimió en una hoja de papel ilustración (**Figura 6**). La impresión se posicionó sobre el lado cobre de la placa Pertinax cobreado y mediante una plancha doméstica se transfirió la tinta al cobre.

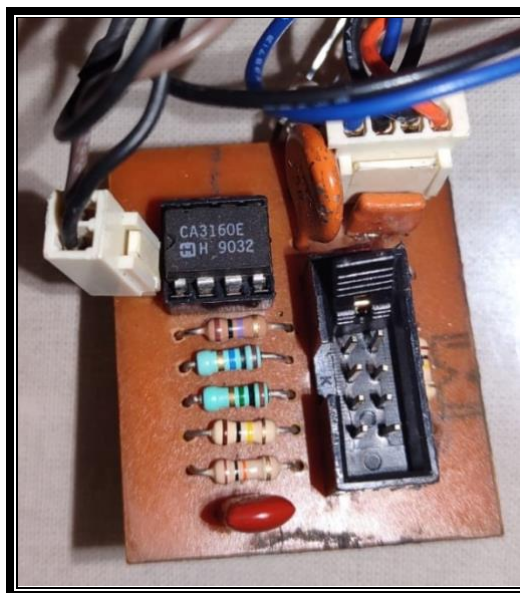


Figura 4: placa de pruebas con 5 resistencias y ficha selectora. Si bien el propósito original de esta placa era solamente buscar la resistencia correcta surgió una utilidad secundaria. La misma consiste en poder ser utilizada independientemente del termociclador debido a su pequeño tamaño. En conjunto con el detector, el soporte de tubos y un multímetro se utilizó para hacer diversas pruebas de medición de fluorescencia.

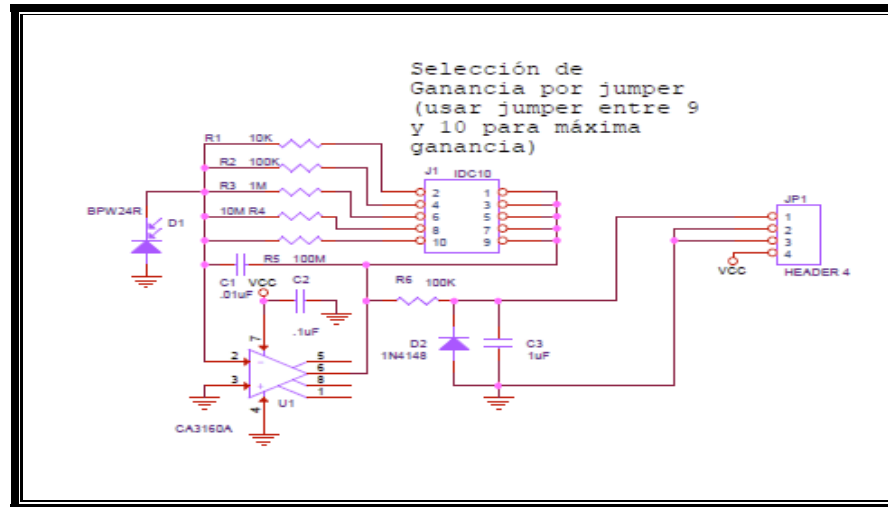


Figura 5: Circuito de placa de pruebas. El nivel de lectura observada varía según la resistencia seleccionada. En el circuito se observan las Resistencias de 1 a 5 que poseen diferentes valores. La placa permite seleccionar entre distintas resistencias que ajustan la ganancia del amplificador de forma tal de elegir la ganancia adecuada para el detector utilizado.

Lado soldadura (simple faz) / Lado de componentes

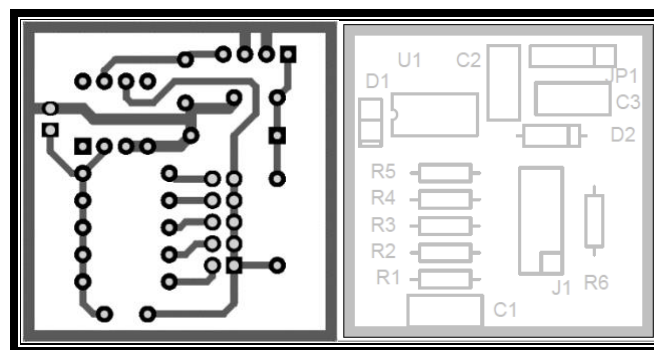


Figura 6: Diseño de impresión para placa de pruebas.

Detector

Inicialmente para medir la intensidad de luz de la emisión por fluorescencia se optó por un circuito implementado con un fotodiodo cuya señal es amplificada linealmente por un circuito de transimpedancia. Los amplificadores de transimpedancia, conocidos comúnmente como TIA por sus siglas en Inglés, son dispositivos que permiten tomar una señal de corriente y transformarla en una señal de tensión, preservando la integridad de sus propiedades.

Dicho circuito se tomó de la nota de aplicación del fabricante del fotodiodo utilizado, el cual es el más sencillo que se encontró en el mercado local, el modelo utilizado fue el BPW24R (**Figura 7**)



Figura 7: Fotodiodo BPW24R con rango de detección de 400 a 1100 nm con pico en los 900nm

La curva de absorbancia de este fotodiodo no trabaja bien con el rango de fluorescencia del bromuro de etidio, ya que el fotodiodo posee una curva de detección entre 400 y 1100nm alcanzando el pico en 900nm mientras que el bromuro de etidio necesita un pico 600nm, por lo que se reemplazó por un sensor de luz ambiental TEMT6000 (**Figura 8**), con una curva de detección más acorde (360 a 790 nm), llegando a un pico de 570nm.



Figura 8: Sensor de luz ambiental TEMA6000. con rango de detección de 360 a 790 nm con pico en los 570nm.

Filtro

Toda lámpara emite luz en un rango de longitud de onda y no a una longitud determinada solamente. Al buscar la señal de fluorescencia, toda luz no proveniente de la misma genera un “ruido” en la señal por lo que es necesario un filtro para poder realizar la separación de la luz proveniente de la lámpara UV de la emitida por la fluorescencia del ADN (**Figura 9**)

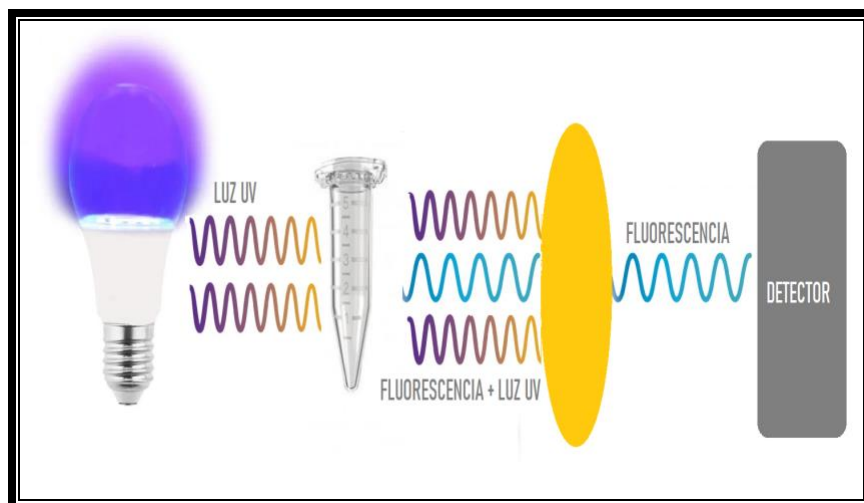


Figura 9: Esquema del recorrido de la luz emitida por la lámpara pasando por el tubo con reactivos y por el filtro hasta el detector de luz.

El filtro depende del fluoróforo utilizado. Debido a que el fluoróforo que se tenía disponible es el bromuro de etidio se utilizó este para realizar las pruebas. En el futuro se podría utilizar otro

fluoróforo simplemente cambiando los filtros. Para el bromuro de etidio el filtro debe ser de alrededor de los 600 nm.

Se utilizó inicialmente celofán de color naranja como un filtro económico, pero el mismo no logró un nivel de filtrado de luz apreciable para poder diferenciar el producido por la fluorescencia. Se optó por adquirir un filtro comercial importado de Inglaterra. Este filtro solo permite el pasaje de la luz a 600nm por lo que permite distinguir la luz producida por la lámpara UV respecto a la producida por fluorescencia.

Lámpara UV

Para producir la fluorescencia del BrEt junto al ADN se necesita una fuente de luz UV. El EtBt posee una excitación máxima a 300 nm y otra a 520 nm (**Figura 10**), por lo que la fuente de luz necesaria debe estar en el rango del ultravioleta (de 100 a 400 nm).

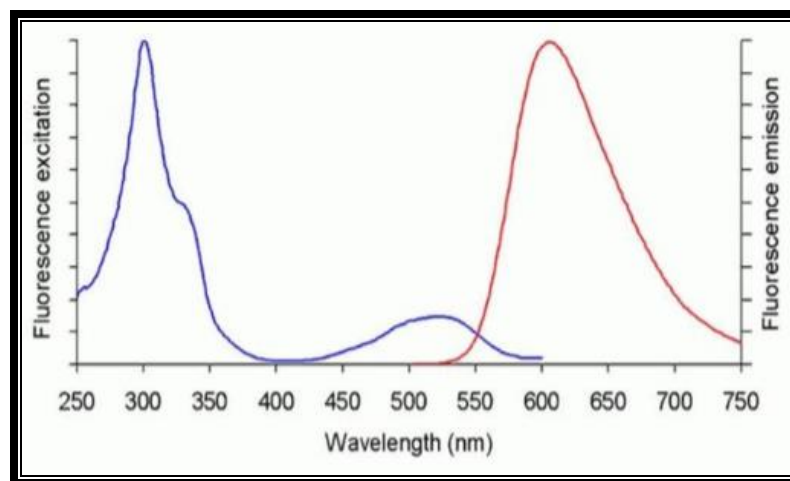


Figura 10: Espectro de excitación y emisión del BrEt. La línea azul muestra los dos picos de excitación en 300 nm y 520 nm. La línea roja representa el pico de emisión en 600 nm.

Se utiliza el bromuro de etidio (BrEt) en este proyecto principalmente por disposición del agente en el laboratorio. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN.

Se hicieron pruebas con lámparas led del rango violeta y ultravioleta de alta potencia (**Figura 11**), pero no llegaban a excitar a los tubos de prueba ya que sus picos de emisión de la lámpara led eran mayores a los 300 nm.

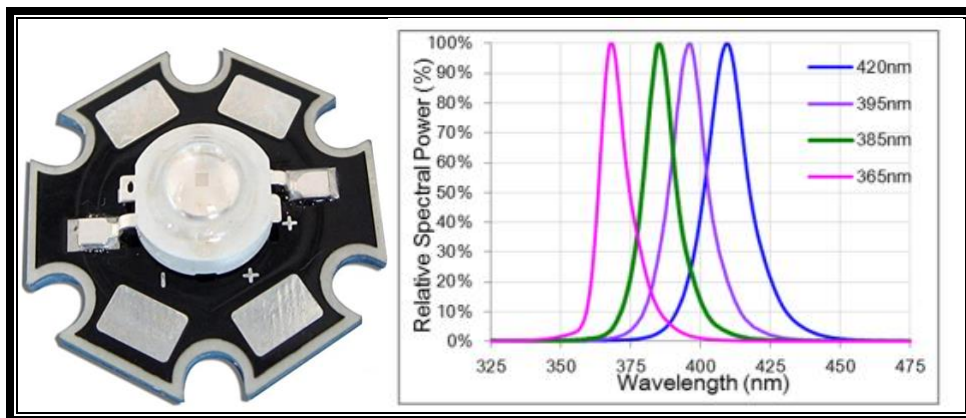


Figura 11: Lámpara UV de Alta potencia 3W-UV con su respectiva curva de emisión lumínica

Finalmente se probó con un detector de dinero falso genérico (**Figura 12**), el cual posee una lámpara fluorescente de luz ultravioleta la cual logró excitar los tubos de prueba de manera que el BrEt emitió fluorescencia observable a simple vista por lo que se decidió continuar con esta lámpara. Esto se debe a que el rango de emisión en esta lámpara contiene el espectro UV.

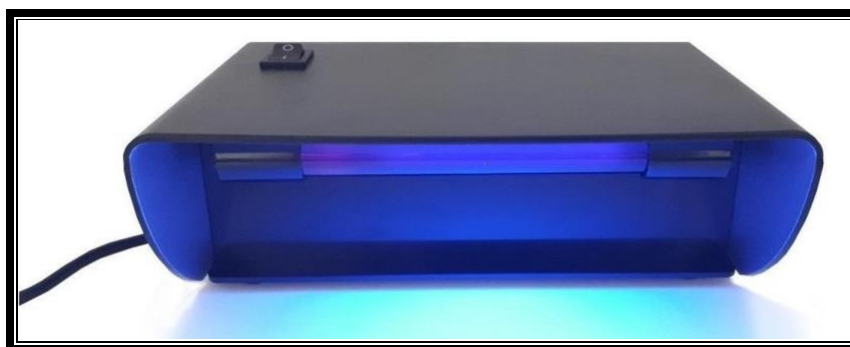


Figura 12: Detector de dinero falso genérico.

Soporte de tubos y ensamblado

Como se mencionó en el ítem anterior toda fuente lumínica no perteneciente a la fluorescencia es ruido para el detector, por lo que es importante aislar los tubos y el detector de manera que la única fuente lumínica sea la lámpara UV para los tubos y la fluorescencia para el detector, para esto se debe usar un soporte que permita realizar estas aislaciones.

Debido a la longitud y tamaño de la lámpara y a que el detector de billetes ya disponía del circuito eléctrico para su funcionamiento, se procedió a realizar el prototipo alrededor de este.

Se procedió a quitar y cambiar el sentido de orientación de la tapa del detector de billetes para poder realizar un soporte de tubos capas de encastrar con el mismo. El soporte de tubos se diseñó en la web <https://www.tinkercad.com/>. El mismo se puede imprimir en cualquier impresora 3D que posea las dimensiones necesarias (20 cm x 20 cm una medida estándar en impresoras 3D de Modelado por deposición fundida).

El link que contiene el archivo .STL para poder imprimir o modificar el diseño se encuentra en el Anexo I.

El diseño está compuesto de 3 piezas: la base que posee 4 ranuras para 4 sensores de luz con sus respectivos filtros. La pieza intermedia que posee 4 ranuras para depositar 4 tubos de 0,2 mL con huecos circulares para que pase la luz hasta los filtros y los sensores. Además, posee una ranura de mayor tamaño para poder encastrar la lámpara UV y una tapa para evitar que entre luz del exterior a las cámaras de los tubos. Las 3 piezas contienen además un juego de huecos y trabas para poder encastrar entre sí (**Figura 13**).

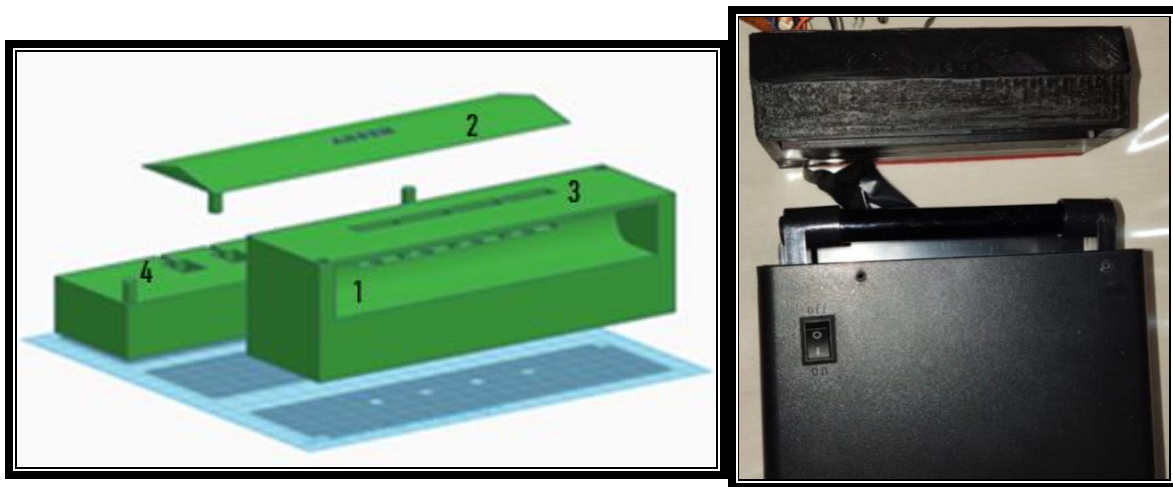


Figura 13: Soporte de tubos impreso en 3D (izquierda). Soporte impreso con lámpara UV (derecha).

En el esquema de la derecha se observan perfectamente las partes: 1) Soporte para lámpara UV. 2) Tapa para evitar filtraciones. 3) Soporte para tubos eppendorf. 4) Soporte para sensor de fluorescencia.

Para la impresión se utilizó material PLA de color rojo marca Grilon3. Es posible utilizar material de cualquier color, pero una vez realizada la impresión se procedió a pintar todo el soporte con pintura negro mate para evitar el reflejo no deseado de luz factible de provocar errores de lectura. El material PLA negro disponible al momento de realizar la pieza era brillante por lo que se tendría que pintar con negro mate al momento de utilizarlo, pero para observar mejor este pintado es más práctico utilizar otro color de material para poder tener mejor contraste.

En este prototipo se utilizó la placa de pruebas debido a la comodidad de no llevar todo el equipo completo al momento de realizar las mismas. La placa de pruebas se conectó al detector insertado en el soporte de tubos y a un multímetro DT830D (multímetro genérico de tamaño pequeño) para poder observar los valores de lectura. (**Figura 14**). La placa fue utilizada para realizar las pruebas, pero una vez demostrado el funcionamiento se puede prescindir de dicha placa y del multímetro uniendo los sensores de lectura directamente a la placa dedicada del termociclador la cual ya posee su propio circuito de lectura y su propio display.

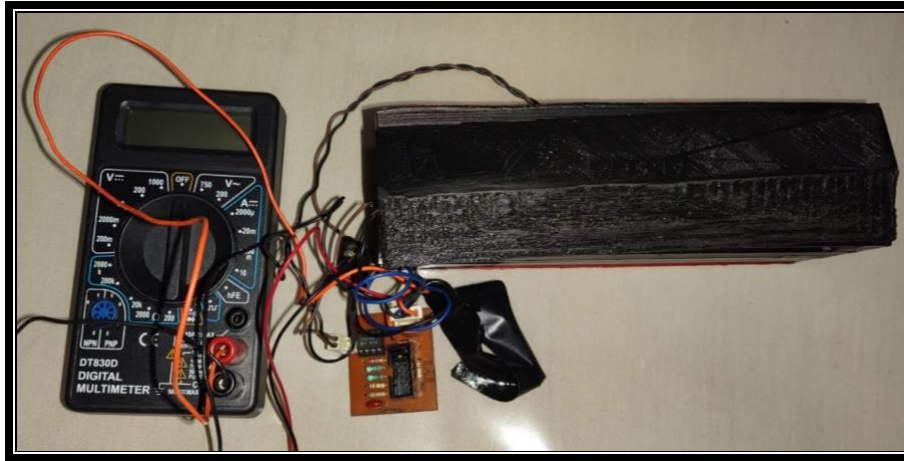


Figura 14: Módulo sensor utilizado en las pruebas. Compuesto por la placa de pruebas, el soporte de tubos impreso en 3d y un multímetro para observar las lecturas.

Versión final del módulo sensor

En su versión final el módulo sensor está unido a la placa Arduino DUE (Arduino, 2018). La salida del amplificador de transimpedancia en la placa da una señal proporcional a la intensidad de fluorescencia y es leído por una entrada analógica de la placa Arduino.

Pruebas del módulo sensor

Para comenzar a verificar el funcionamiento y lograr avanzar con la integración de las partes del equipo se decidió realizar una prueba con muestras con y sin ADN genómico. Si bien esta no fue una prueba cuantitativa sirvió para verificar el funcionamiento general del módulo sensor y proceder, en segunda instancia, con muestras de concentración conocida. La prueba real se describe más adelante cuando se realizan mediciones en tubos en los que se aplicó el proceso de PCR lo cual hace que haya una diferencia mayor en las concentraciones de ADN.

5.2 Diseño y desarrollo del módulo termociclador.

El módulo termociclador (**Figura 15**) tiene la función de variar la temperatura en los tubos donde sucede la reacción de PCR. Para esto debe tener 4 componentes fundamentales:

- soporte para tubos
- fuente de calor
- sistema de enfriamiento
- controlador de temperatura

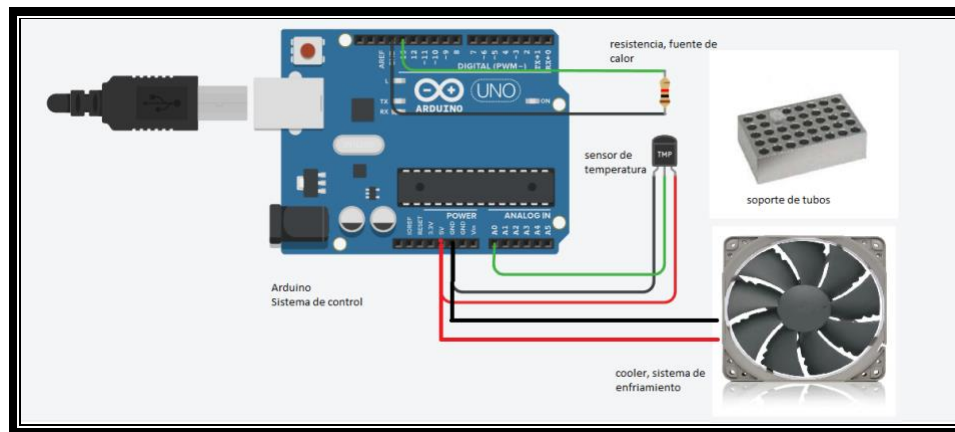


Figura 15: bosquejo del módulo termociclador con sus 4 componentes.

Soporte para tubos y fuente de calor

El diseño y fabricación del soporte de los tubos tuvo distintas etapas y prototipos antes de llegar al definitivo. Inicialmente se hizo toronar y mecanizar un gran bloque cilíndrico de aluminio, con tamaño suficiente para alojar varios tubos eppendorf de 1,5 ml (**Figura 16**)



Figura 16: Primer prototipo de soporte de tubos con la resistencia calefactora.

La inercia térmica de esa gran masa de material implicaba usar mucha energía para calefaccionar el bloque.

En esa oportunidad se utilizó una resistencia eléctrica tipo abrazadera para 220V. No se obtuvieron buenos resultados para lograr una temperatura precisa al llegar al punto de consigna. Dicha resistencia en conjunto con el soporte de masa excesiva producían un calentamiento muy lento, incompatible con el proyecto. Fue una primera aproximación que ayudó a comprender que, si se requiere calentar rápido y en forma precisa era obligatorio reducir la masa del bloque calefactor, al igual que el elemento calefactor.

Por esta razón, se construyó un bloque calefactor pequeño, con el tamaño suficiente para envolver tubos eppendorf de 200 μ L que son más utilizados en las reacciones de PCR de los TP's de UADE Labs (**Figura 17**).

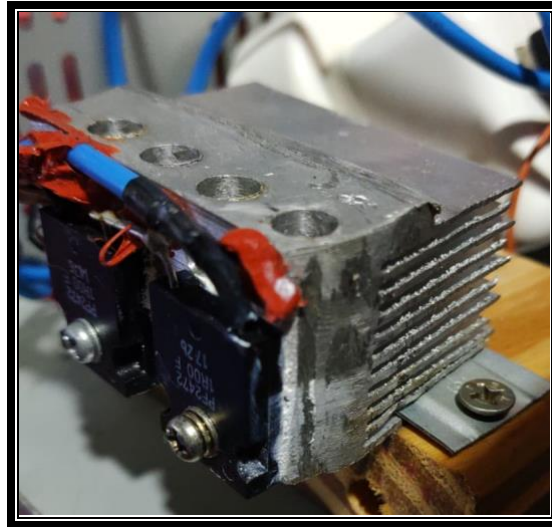


Figura 17: Prototipo final de soporte de tubos: fotografía del prototipo final de soporte de tubos con las resistencias calefactoras.

Se buscaron resistencias potentes y compactas, siendo el resultado de dicha búsqueda la resistencia marca Rideon con encapsulado TO-247.

El bloque se produjo a partir de un disipador de procesador de computadora de aluminio, que se lo corto hasta quedar en un bloque de 1cm de profundidad, 5cm de ancho y 3cm de alto, sin contar las “láminas de disipación”. Este volumen es suficiente para colocar las resistencias en la cara frontal y realizar los huecos para agregar los tubos en la cara superior y el sensor de temperatura en la parte inferior de uno de los laterales.

La pieza fue agujereada con taladro de banco con mechas para metal de 5 mm para el sensor de temperatura y de 2,75 mm para los huecos tornillo que sujetan las resistencias. Para los huecos de los tubos se utilizaron mechas de diferentes medidas hasta diferentes alturas para darle una forma cónica. En el caso de los huecos para los tornillos se procedió a pasarle un macho roscado de 3mm para darle la rosca necesaria para que el tornillo ajuste.

La calefacción se realiza mediante un par de resistencias de 1 ohm conectadas en serie (resistencia total 2 ohm) encapsuladas en formato TO-247 marca Rideon (Rideon, 2018) (**Figura 18**), alimentadas desde una fuente de 24V tipo industrial. Entre las resistencias y el bloque se colocó

grasa siliconada para mejorar la conductividad térmica evitando el aire entre las piezas ya que este disminuye la conductividad térmica.



Figura 18: Resistencia de alta potencia formato TO-247 marca Rideon

Sistema de enfriamiento

Para el enfriamiento se analizaron los diferentes *coolers* disponibles en el mercado pero finalmente se utilizó el modelo v80e12bga7-07 Nidec Ultraflo (Figura 19), debido a su tamaño compacto y gran potencia.



Figura 19: Cooler modelo v80e12bga7-07 Nidec Ultraflo

Controlador de Temperatura

Para la realización del sistema de incubación tipo PCR, se necesitó programar la temperatura en los viales en forma precisa, desde temperatura ambiente hasta alrededor de 100 °C. En primera instancia se hicieron pruebas con un controlador de temperatura con accionamiento tipo SI-NO mediante una placa Arduino clásica (Arduino UNO). La elección de la plataforma Arduino se debió a la facilidad de programación (lenguaje muy similar al “C”), bajo costo, fuertemente documentado, existencia de diversos accesorios en el mercado y facilidad de adquisición. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que la temperatura oscilaba varios grados desde la temperatura de consigna. Se decidió entonces utilizar un controlador tipo PID (Proporcional, Integral, Diferencial), mucho más sofisticado que el anterior. Dado el mayor requerimiento de hardware, se prefirió utilizar el modelo Arduino Due (**Figura 20**), mucho más poderoso desde el punto de vista del hardware (mayor velocidad, mayor capacidad de memoria, más terminales, etc.); pero sin abandonar el concepto de utilizar la plataforma Arduino, por las ventajas ya mencionadas.

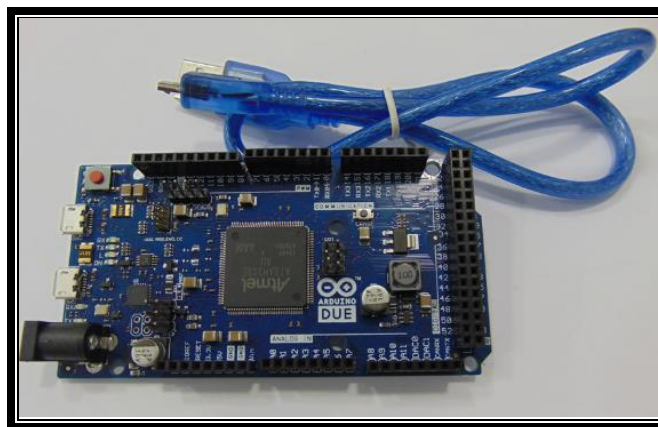


Figura 20: Placa Arduino Due, placa que se utilizó en el proyecto.

En la página web oficial de Arduino se detallan las características y uso de la placa Arduino y sus variantes oficiales. El compilador y el circuito del Arduino Due puede descargarse libremente a partir de esta página (Arduino, 2018). La información para realizar el controlador proporcional

integral diferencial (PID) se obtuvo de la página oficial de la biblioteca para control PID para utilizar con Arduino (PIDLibrary, 2018).

Los datos para permitir guardar variables en forma no volátil utilizando la memoria flash del Arduino DUE (que permite guardar la configuración sin que esos datos se pierdan al apagar el sistema) se obtuvieron de la página oficial de la biblioteca correspondiente (DueFlashStorage, 2018).

La descripción para el control de pantalla alfanumérica para utilizar con Arduino se obtuvo de la página de dicha biblioteca (LiquidCrystal, 2018). La versión gratuita "Comunidad" del programa compilador Visual Basic.Net de Microsoft se descargó de la página de Microsoft (Compilador Visual Studio, 2017).

Como teclado y pantalla, se optó por utilizar el accesorio comercial del Arduino (LCD Shield, 2018) (**Figura 21**).



Figura 21: pantalla alfanumérica dedicada a Arduino.

El teclado consta de 6 teclas tipo pulsador mecánico (**Figura 22 y Figura 23**)

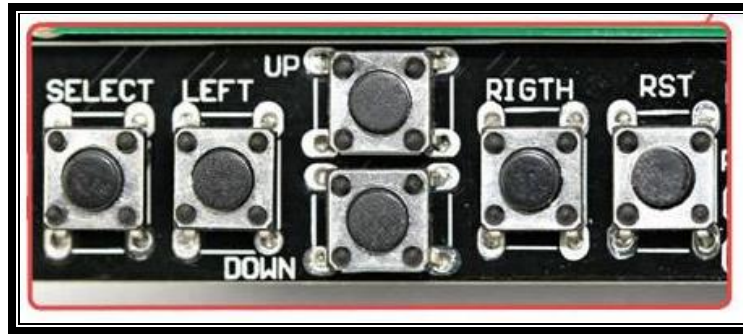


Figura 22: Teclado de la pantalla alfanumérica dedicada a Arduino

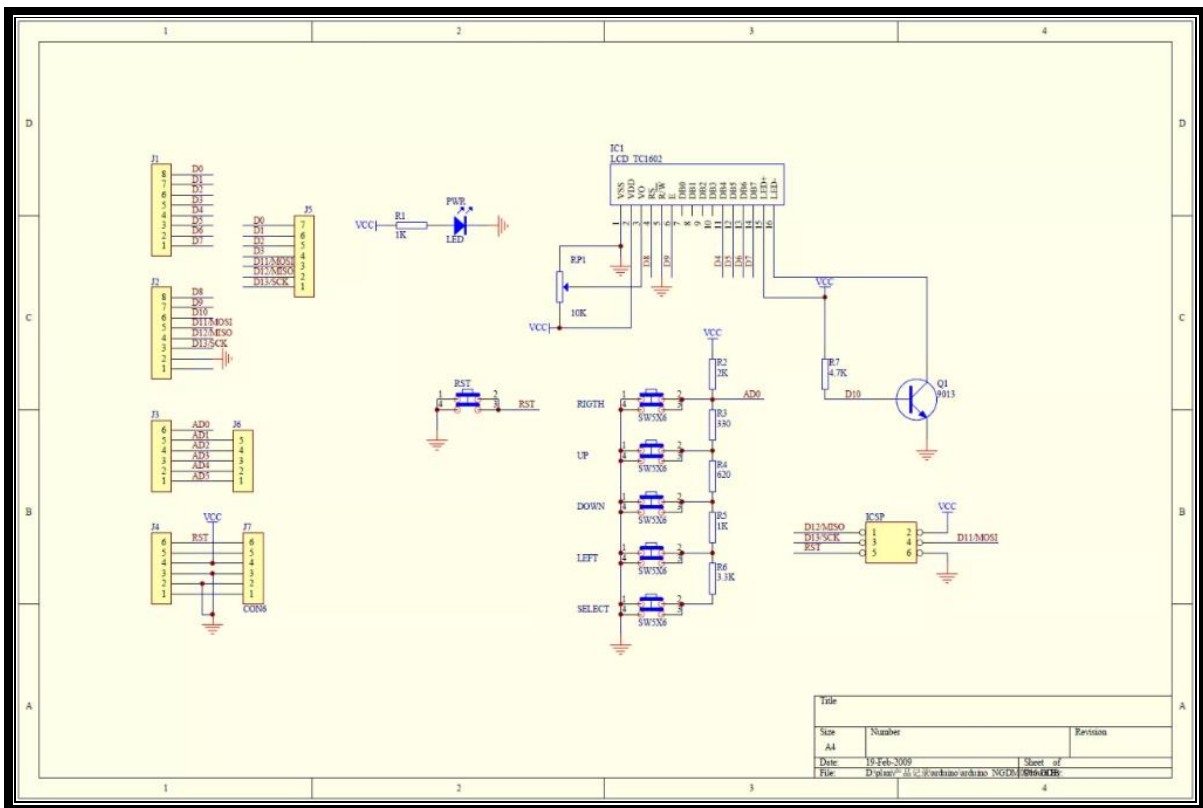


Figura 23: Circuito de Teclado y pantalla alfanumérica dedicada a Arduino

La medición de temperatura se realiza con un sensor marca National (hoy adquirida por Texas Instruments) modelo LM35 (Figura 24), el mismo presenta una tensión de salida

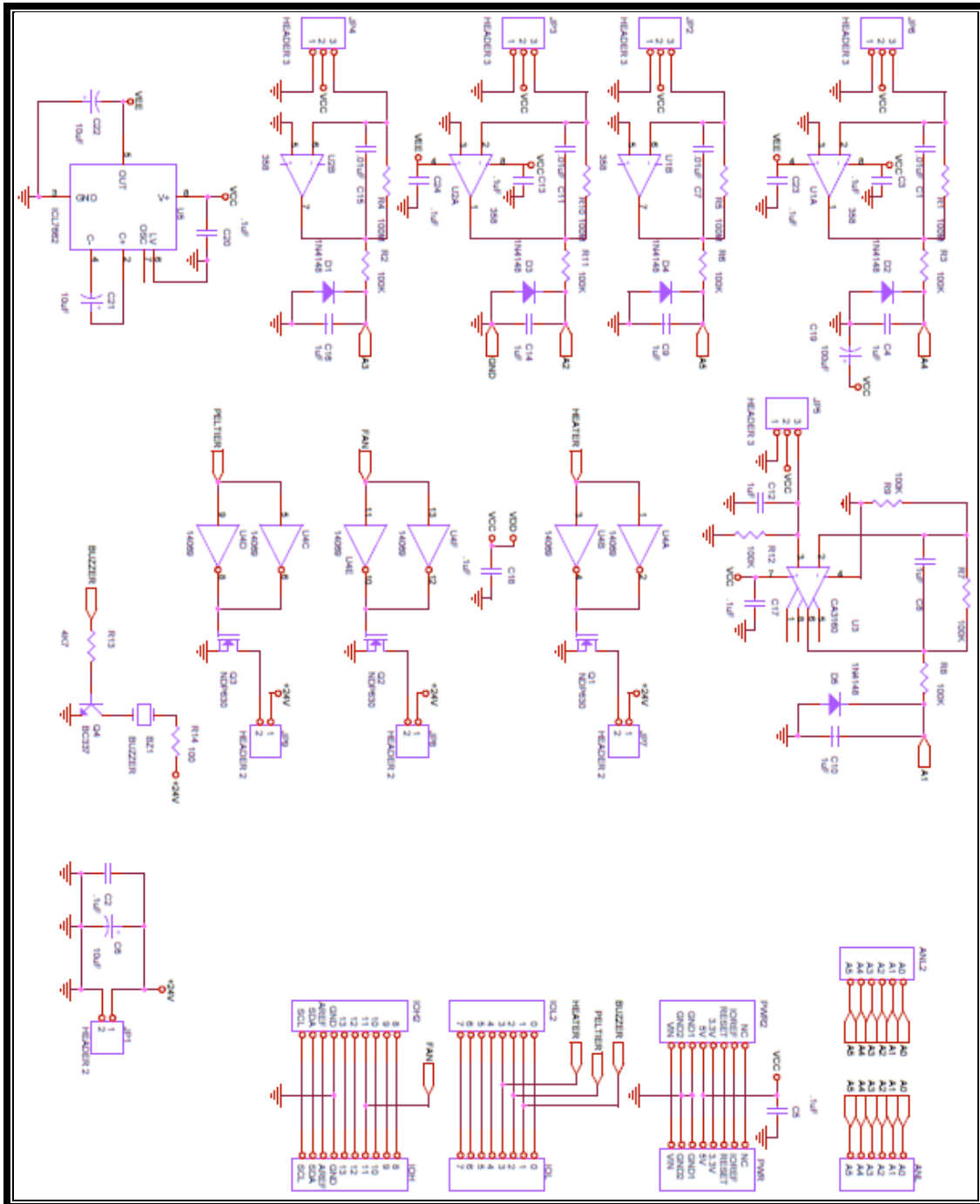


Figura 25: Circuito de la placa dedicada

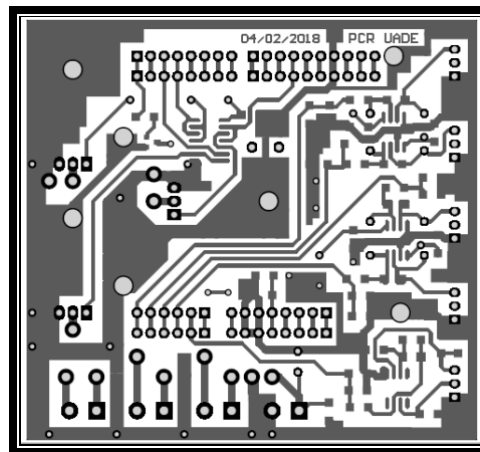


Figura 26: Diseño de impresión de conexiones Lado Soldadura

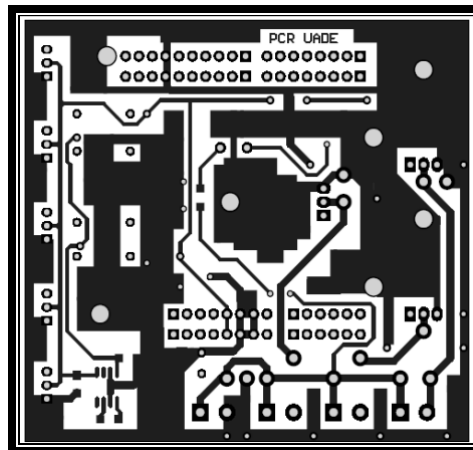


Figura 27: Diseño de impresión de conexiones Lado Componentes

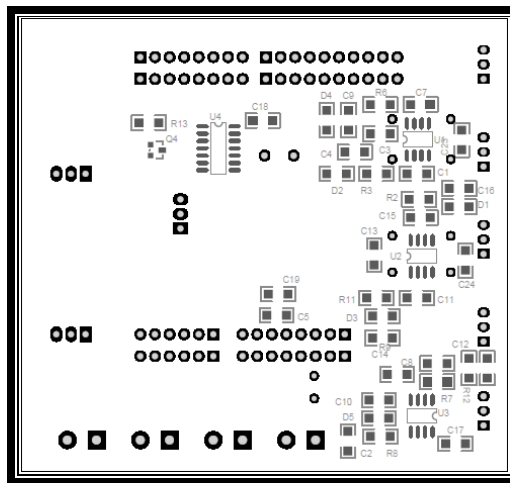


Figura 28: Diseño de impresión de Seda Lado soldadura

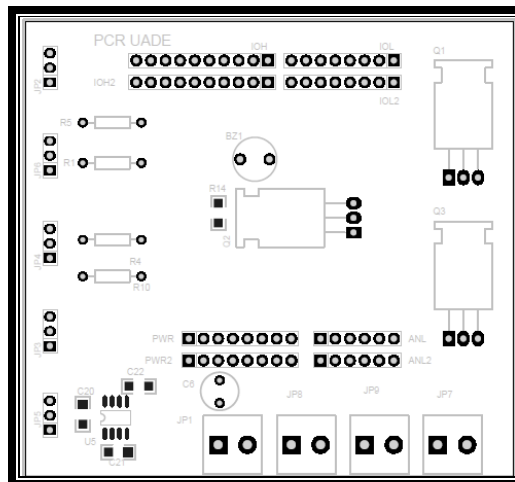


Figura 29: Diseño de impresión de Seda Lado Componentes

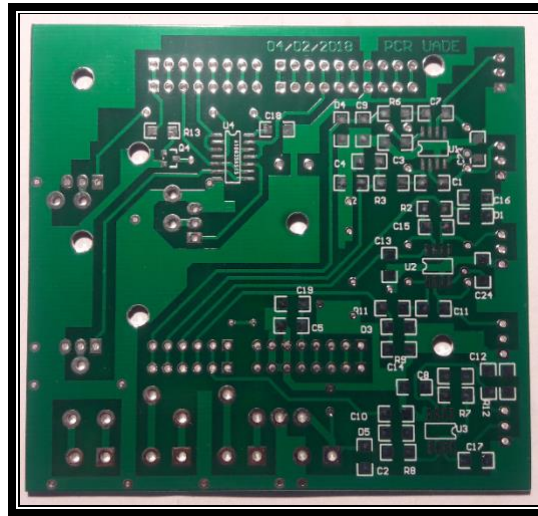


Figura 30: Placa impresa lado Soldadura.

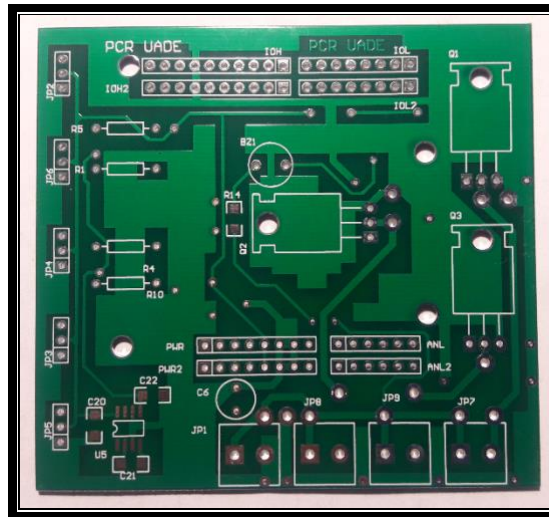


Figura 31: Placa impresa Lado Componentes.

Cableado

El cableado del calefactor y alimentación de 24V debe realizarse con cables de 1,5 mm² de sección mínimo, dada la alta corriente. El diagrama de cableado es muy sencillo; simplemente se conecta cada dispositivo a su bornera correspondiente (**Figura 32 y Figura 33**).



Figura 32: Guía de Cableado Borneras superiores

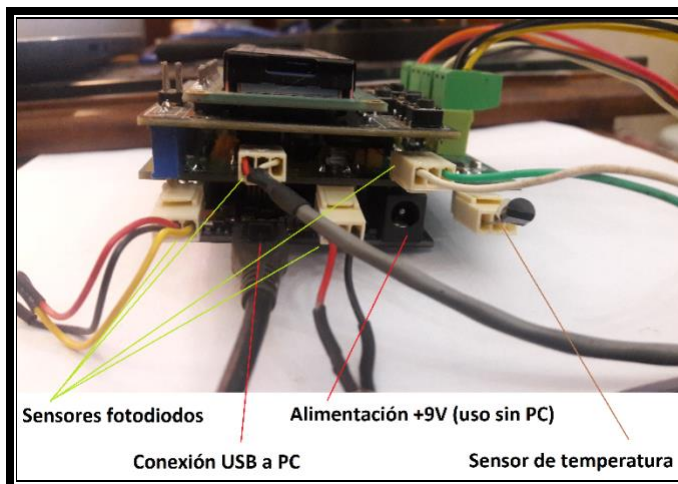


Figura 33: Guía de Cableado Borneras laterales

Montaje

Para el montaje se utilizó una tabla de madera de 30 cm x 17,5 cm x 2 cm. Se utilizó parte del chasis de una fuente de pc como soporte para el *cooler* y el soporte de tubos de aluminio. Este chasis se fijó con tornillos para madera a la tabla de madera utilizando huecos para tornillos ya existentes en el chasis.

Para el *cooler*, se aprovechó el hueco y posición para tornillos ya existentes para *cooler* pero colocándolo de manera externa. Sobre la base del chasis se acopló una madera de 5 cm x 7 cm x 2,5 cm con la función de ser soporte aislante para el soporte de tubos de aluminio, la cual fue atornillada desde la cara inferior del chasis. Para unir el soporte de tubos a la pieza de madera aislante se utilizó una placa de chapa de 6,5 cm x 1,8 cm colocándola sobre la primera pestaña disipadora inferior y atornillándola sobre la pieza de madera realizando la presión para que la misma sostenga el soporte de tubos (**Figura 34**).

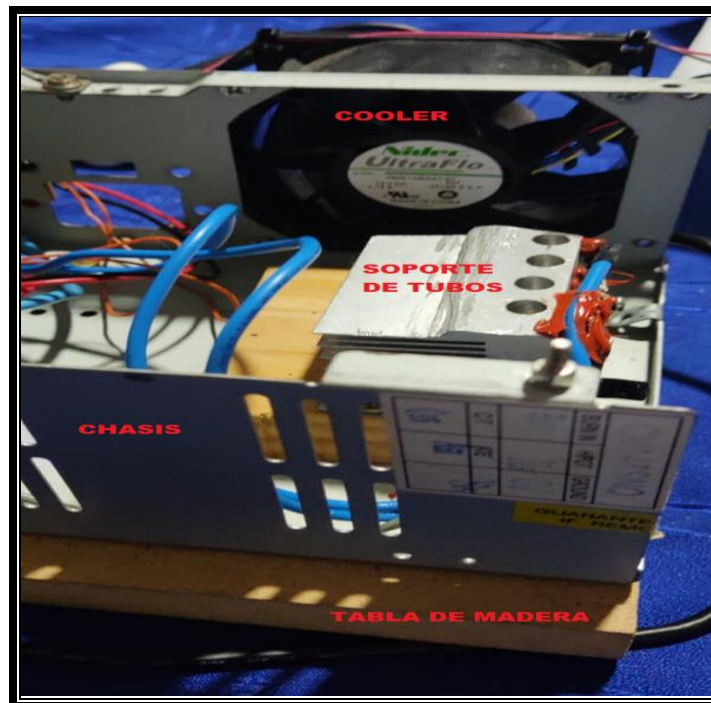


Figura 34: Cooler y soporte de tubos montado en Chasis sobre soporte de madera

Sobre el chasis también se montó una lámpara led roja con cables puestos en paralelo a las resistencias calefactoras (**Figura 35**). La función de la lámpara es poder observar de manera visual el momento en que las resistencias están funcionando en tiempo y forma esperados, solo siendo necesario durante las pruebas del equipo. La misma fue descartada en una versión final.

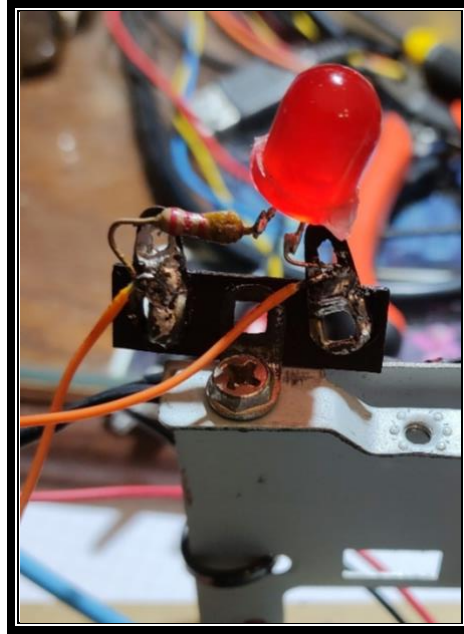


Figura 35: Lámpara led señal de calentamiento

La placa Arduino se montó utilizando dos soportes aislantes atornillados a la tabla de madera y utilizando los huecos ya existentes en dicha placa. Se atornillaron los soportes aislantes desde la cara inferior de la tabla.

La fuente se atornilló a la tabla de madera utilizando huecos para tornillos propios de la fuente y colocando los tornillos atravesando la tabla de madera desde la cara inferior.

Luego se realizó el cableado: se llevaron los dos cables de control del *cooler* a la ficha “fan” de la placa dedicada Arduino. Las resistencias calefactoras unidas en serie se unieron por cable de 1,5 mm a la ficha Rcal (resistencia calefactora) de la placa dedicada junto a la lámpara en paralelo. Los cables del sensor de temperatura se colocaron en la ficha JP5 de la placa dedicada. Un cable de 0,35 se unió entre el chasis de la fuente y el chasis soporte para conectar a masa. Los cables para proporcionar energía de la fuente se llevaron al conector 24 V de la placa dedicada.

Para alimentar la fuente se utilizó un cable con ficha a 220 volts para pared.

5.3. Software Arduino

Programa del Arduino (firmware)

Programar en Arduino es relativamente fácil, su estructura es muy similar al lenguaje C. Fue diseñado para que pueda ser utilizado por personas no expertas en programación o electrónica. Además, presenta como gran ventaja la posibilidad de utilizar bibliotecas. Estas son códigos de programas ya escritos por otros usuarios para funciones determinadas, por ejemplo el uso de un display o un sensor específico evitando tener que programar para dicha función o prácticamente realizar pequeñas modificaciones.

Se aprovechó al máximo las bibliotecas de programación ya hechas y compartidas en el sitio oficial de Arduino o en páginas dedicadas a ello. De esa forma se simplificó enormemente la programación y los errores dado que las bibliotecas se encuentran validadas. Es importante destacar que las bibliotecas utilizadas cuentan con la documentación necesaria para su uso.

El programa utiliza varias funciones externas (tomadas de las bibliotecas), declaradas con su correspondiente encabezamiento. Entre ellas tenemos: Biblioteca PID_v1.h (PID, 2018). Dicha biblioteca incluye todas las funciones asociadas al controlador PID. Entre las funciones incluidas en dicha biblioteca podemos enumerar:

- 1) PID: Configura el controlador PID
- 2) Compute: Efectúa el cálculo PID, para controlar la salida al calefactor.
- 3) Biblioteca LiquidCrystal.h (LiquidCrystal, 2018): Dicha biblioteca incluye todas las funciones asociadas a la pantalla
- 4) Biblioteca DueFlashStorage.h (DueFlashStorage, 2018): Biblioteca que incluye todas las funciones asociadas al almacenamiento de variables en la memoria Flash del Arduino DUE (para guardar configuración y ajustes que no se borren al apagar el sistema).
- 5) Biblioteca DueTimer.h (DueTimer, 2018): Esta biblioteca incluye todas las funciones asociadas a los temporizadores. Se utiliza para configurar un temporizador (*timer*) para que produzca una

interrupción cada 50 milisegundos (ms), y mediante código realizar acciones a cada segundo, permitiendo además el conteo del tiempo transcurrido.

Descripción del firmware:

Arduino es un programa que consta de declaraciones, configuración (*setup*), programa principal (*loop*) y funciones del usuario (una de ellas es una subrutina de interrupción).

En las declaraciones se encuentran los *headers* de las bibliotecas ya mencionadas, y encabezamientos de más declaraciones y funciones del usuario. Con el fin de facilitar la lectura del programa, se lo ha dividido en varios archivos.

- #include <PID_v1.h>
- #include <LiquidCrystal.h>
- #include <DueFlashStorage.h>
- #include <DueTimer.h>
- #include "DeclaracionesPID.h"
- #include "SubrutinasPID.h"
- #include "PantallasPID.h"

En el archivo "DeclaracionesPID.h" se encuentran muchas más declaraciones. Por ejemplo, distintas variables utilizadas, constantes asociadas a direcciones de memoria flash con el fin de guardarlos como parámetros de configuración. En el archivo "SubrutinasPID.h" se encuentran distintas subrutinas y funciones como por ejemplo la función PID, que es el corazón del programa.

En el archivo "PantallasPID.h" se encuentran las subrutinas que establecen los distintos textos que se muestran en pantalla, asociados a usos determinados. Luego de las declaraciones, se encuentra la subrutina de interrupción del temporizador, la cual actúa en forma fija cada 50 ms y al completar 20 interrupciones, incrementa el tiempo transcurrido en 1 segundo (siempre y cuando la temperatura se encuentre en la consigna establecida). Es decir, no se contabiliza el tiempo durante las rampas de calentamiento o enfriamiento. Se encuentra luego la subrutina de configuración (*setup*). Allí se definen las distintas terminales de la placa Arduino como entrada o salida. Por ejemplo:

```
pinMode (calentar, INPUT_PULLUP)
```

```
pinMode (calentar, OUTPUT);
```

El terminal “calentar” (terminal número 3 del Arduino, indicado como “calentar” en las declaraciones) queda establecido en primera instancia como entrada, con una resistencia conectada a +5V (*pull up*), para establecer dicho *pull up*, y luego se configura como salida, que será la que accionará la alimentación del calefactor. Luego se establece la resolución de las salidas analógicas en 12 bits (0 a 4095, siendo 0 la máxima potencia y 4095 la mínima). El calefactor se apaga estableciendo en la salida analógica el valor 4095:

```
analogWriteResolution(12);
```

```
//apago el calefactor
```

```
analogWrite(calentar,4095);
```

Se cargan luego las distintas variables de configuración guardadas en la memoria *flash*. Por ejemplo, si se lee el valor de la consigna de temperatura número 1, se asigna el valor leído a la variable `Consigna_t_H1`:

```
//carga la temperatura consigna alta Nro 1 (t_H1) desde la memoria no volátil
```

```
PROM.Bytes[0]=dueFlashStorage.read(DIRECCION_t_H1_1);
```

```
PROM.Bytes[1]=dueFlashStorage.read(DIRECCION_t_H1_2);
```

```
PROM.Bytes[2]=dueFlashStorage.read(DIRECCION_t_H1_3);
```

```
PROM.Bytes[3]=dueFlashStorage.read(DIRECCION_t_H1_4);
```

```
if (isnan(PROM.VariableLong)) {Consigna_t_H1=33;}
```

```
else {Consigna_t_H1=PROM.VariableLong;if(Consigna_t_H1>120) Consigna_t_H1=120;
```

```
if(Consigna_t_H1<33) Consigna_t_H1=33;}
```

Se establece la configuración del *timer* para la interrupción de la siguiente forma:

```
Timer3.attachInterrupt(InterrupcionTimer); Timer3.start(50000); // Calls every 50ms
```

Se configura el puerto serie para comunicación con la PC y el *ADC* (Convertidor Analógico Digital) con los comandos:

```
SerialUSB.begin(115200);
```

```
CadenaSerie.reserve(10);
```

```
//initialize the variables we're linked to
analogReadResolution(12);
Input = analogRead(sensorTMP);
```

Se inicializa el control PID en modo automático. Se pone en pantalla el texto de bienvenida y luego la pantalla principal, que indica la lectura de fluorescencia de 4 canales de medición. Se apagan el ventilador, el calefactor y el zumbador de la siguiente manera:

```
//turn the PID on
myPID.SetMode(AUTOMATIC);
//apago el ventilador
analogWrite(ventilar,4095);
//digitalWrite(ventilar,HIGH);
//apago el buzzer
digitalWrite(buzzer,LOW);
```

Programa principal (subrutina loop)

La subrutina loop consta de las indicaciones que el equipo debe tomar una vez encendido y que realizará infinitamente hasta que sea apagado.

Primero se lee el puerto serie, por si se recibe algún comando desde la PC. Si existen datos disponibles en el puerto serie son leídos:

```
if (SerialUSB.available()>0){
//leemos la opción enviada
FlagSerie=SerialUSB.read();}
```

Según el carácter recibido desde la PC, se establecen distintas funciones. Si se recibe el carácter:

“V” se enciende el ventilador

“c” se da comienzo al controlador de temperatura del calefactor, con su pantalla correspondiente.

“v” se apaga el ventilador

“p” se envían los parámetros de configuración a la PC

“P” se reciben los parámetros de configuración desde la PC

“L” Lectura del fluorímetro

Luego se leen los fotodiodos, para la lectura de la fluorescencia, con el ADC de 12 bits.

Ejemplo para el fotodiodo 1:

```
x = 1;
```

```
do {
```

```
  analogReadResolution(12);
```

```
  sensorValueDO1 = sensorValueDO1 + analogRead(sensorDO1); // realizar la lectura del
  fotodiodo 1
```

```
  x++;
```

```
} while (x < 10000); //para arduinos de 3.3V rapidos
```

```
  InputDO1 = (double)sensorValueDO1/10000.0; //para arduinos de 3.3V y 12 bits de resolucion
  lcd.setCursor(3,0);
```

```
  lcd.print(InputDO1,1);
```

Luego, si el sistema está en la pantalla de leer los fotodiodos, envía la lectura de los mismos a la PC, de la siguiente manera:

```
if (FlagLeyendoFluor==1) {
```

```
  SerialUSB.print("D1_");
```

```
  SerialUSB.println(InputDO1);
```

```
  SerialUSB.print("D2_");
```

```
  SerialUSB.println(InputDO2);
```

```
  SerialUSB.print("D3_");
```

```
  SerialUSB.println(InputDO3);
```

```
  SerialUSB.print("D4_");
```

```
  SerialUSB.println(InputDO4);
```

```
  FlagLeyendoFluor=0;}

```

Finalmente se lee el teclado, siendo la única tecla activa en este caso, “select” y al presionarla el sistema entra al modo menú y configuración, mediante la subrutina “configurar”:


```
case btnSELECT:
    {/lcd.print("SELECT");
    configurar();
    break;}
```

Subrutina Configurar

La misma se encuentra en el archivo “PantallasPID.h”. Es la subrutina que permite elegir entre las distintas pantallas, con sus correspondientes funciones. Se lee el teclado y las distintas pantallas se eligen mediante las flechas hacia arriba y hacia abajo y se establecen con la tecla “select”. La primera pantalla posible es el ingreso al modo calefactor PID, accediendo a la función Pantalla_PID(0), que se encuentra en el archivo SubrutinasPID.h.

```
case 0:
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("<Control PID> ");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print("<Consigna t_H1> ");
    lcd_key = read_LCD_buttons(); // leo los pulsadores
    //si voy a PID no arranca automaticamente
    if (lcd_key==btnSELECT) Pantalla_PID(0);
    break;
```

Las otras pantallas, en su mayoría son de configuración, permitiendo ajustar los tres niveles de temperatura del ciclo inicial, los tres niveles de temperatura de los ciclos repetitivos, la temperatura final, el número de ciclos, los tiempos de calentamiento para cada nivel de temperatura, las constantes de calibración del sistema PID y finalmente el menú “Salir”, que permite volver a la pantalla anterior. Cada pantalla de configuración de parámetros redirige el sistema a la correspondiente subrutina de configuración de parámetros. Hay una subrutina para cada parámetro y las mismas se encuentran en el archivo “PantallasPID.h”

Función PantallaPID()

La función PantallaPID() trabaja por cada ciclo en forma secuencial. La del primero toma los tiempos de cada temperatura de dicho ciclo (cada ciclo consta de tres temperaturas establecidas) y los carga en las variables de trabajo. A medida que se va realizando cada ciclo, las variables de trabajo, van incrementando según el tiempo de cada ciclo. Esas variables de trabajo se utilizan para comparar con el tiempo transcurrido y verificar cuando culmina cada ciclo.

Tiempo [1] = Consigna_tpo_CicloH1;

Tiempo [2] = Tiempo [1] + Consigna_tpo_CicloL1;

Tiempo [3] = Tiempo [2] + Consigna_tpo_CicloM1;

Aquí se puede observar, a modo de ejemplo, la comparación respecto al tiempo trascurrido y tomar acción si la comparación es verdadera y el ciclo es el inicial:

```
if((TiempoTranscurrido<Tiempo[1])&&(TiempoTranscurrido<Tiempo[2])&&(TiempoTranscurrido<Tiempo[3]))
{
if (Ciclo==1)
{
Setpoint = (float)Consigna_t_H1;
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print("tH1=");
sStatus="tH1";
lcd.print(Consigna_t_H1);
}
}
```

Se efectúa la lectura de la temperatura, se compara con el valor de consigna, y se establece el control PID. Hay dos juegos de constantes de ajuste para el controlador PID, si se está lejos de la consigna, se utiliza el juego de constantes que permite un calentamiento más fuerte, a los fines de acelerar el proceso, y cuando se está cerca de la consigna, se utiliza el juego de constantes que permite un ajuste suave, a los fines de mejorar la precisión del control de temperatura.

```

do
{
analogReadResolution(12);
sensorValueTMP = sensorValueTMP + analogRead(sensorTMP); // realizar la lectura de
temperatura
x++;
}
while (x < 10000); // para arduinos de 3.3V rapidos
Input = (double)sensorValueTMP/222570.0; // para arduinos de 3.3V y 12 bits de resolucion
    El programa lee 10000 veces el valor de la suma de esas lecturas y se la divide por una
    constante para informar como temperatura.
double gap = abs(Setpoint-Input); // distance away from setpoint
if(gap < 22)
{ //we're close to setpoint, use conservative tuning parameters
myPID.SetTunings(Kp, Ki, Kd);
}
else
{
//we're far from setpoint, use aggressive tuning parameters
myPID.SetTunings(aggKp, aggKi, aggKd);
}
if(gap < 0.7)
{
FlagEnConsigna=1;
}

```

Si desde la PC se envió el comando de lectura, se envían las variables a la PC vía puerto serie.

```
if (FlagLeyendoPID==1)
```

```
{
SerialUSB.println(Input);//Imprimimos el valor de la lectura de la temperatura
SerialUSB.println(TiempoTranscurrido-1);//Imprimimos el valor del tiempo transcurrido
SerialUSB.println(Ciclo);//Imprimimos el número de Ciclo
SerialUSB.println(Setpoint);//Imprimimos la temperatura consigna en curso
SerialUSB.println(sStatus);//Imprimimos la temperatura consigna en curso
FlagLeyendoPID=0;
}
```

El programa lee si se pulsa alguna tecla y si se pulsa la flecha hacia la derecha se inicia el calentamiento. Por el contrario, si se presiona la flecha hacia la izquierda, se da fin al calentamiento manualmente.

```
lcd_key = read_LCD_buttons(); // leo los pulsadores
if (lcd_key==btnLEFT) FlagCalentando=0;
if (lcd_key==btnRIGHT) FlagCalentando=1;
```

5.4 Pruebas del módulo termociclador

Prueba de temperatura para ajustar la PCR (sensor de temperatura vs termómetro)

Para ajustar la temperatura que informa el equipo se colocó un termómetro de mercurio en uno de los orificios de soporte de tubos. Se llevó a 95 °C para comprobar como informaba y se fue modificando la constante desde el valor aproximado 276484.0 teórico al valor más exacto 222570.0 para el equipo.

Ajuste de parámetros de las constantes.

El PID, como se mencionó anteriormente, utiliza 3 constantes (Kp, Ki, Kd) para poder realizar los ajustes de temperatura de forma proporcional. La modificación de estos parámetros cambiará el tiempo que se tarda en llegar a una temperatura determinada. Es necesario buscar cuales son los valores óptimos para que el tiempo que tarda el equipo en llegar a la temperatura deseada sea el mínimo posible. Además, la inercia del aumento rápido de temperatura puede provocar que se supere la temperatura deseada. Es por esto que los valores deben ser tales que el tiempo sea el mínimo posible pero que la temperatura se mantenga en la deseada.

Para poder observar cuales son los valores óptimos de estos parámetros se realizaron pruebas manteniendo fijas dos constantes y variando una y se midió el tiempo que tardaba en estabilizar en la temperatura a alcanzar (90°C). Se eligió el valor de 90°C ya que es la temperatura máxima que debe alcanzar el termociclador en una corrida estándar. Solo se controló con el calentamiento ya que en enfriamiento no se utiliza el sistema PID. El parámetro Kd no se modificó ya que las instrucciones del PID recomendaban no alterarlo.

En la **Tabla II** se presenta el primer ensayo donde se registró la variación de temperatura sobre el tiempo con un Kp, Ki y Kd específicos, los cuales son los recomendados en la biblioteca seleccionada. Como los resultados no fueron acertados se siguieron haciendo ensayos donde solo el parámetro Kp fue variando (dejando fijos los parámetros Ki y Kd). Dichos ensayos se realizaron hasta conseguir una variación de temperatura en un tiempo relativamente satisfactorio. Las variaciones para dichos ensayos se pueden observar en las **Tablas III y IV**. Luego se dejó fijo el

parámetro K_p en 2 y se empezó a variar el parámetro K_i . Los resultados de las mediciones se presentan en las **Tablas V, VI, VII y VIII** donde en los tres primeros casos se detuvo el ensayo ya que superó la temperatura a alcanzar. En las condiciones de la **Tabla VIII** se detuvo el ensayo ya que los valores oscilaban demasiado. *En resumen, los valores de K_d , K_p y K_i quedan fijos en $K_d=2$, $K_i = 0,045$ y $K_d = 0,15$ (Tabla I)*

Prueba	K_d	K_p	K_i	Problema
1(Tabla II)	0.15	20	0.04	Supera el t objetivo
2(Tabla III)	0.15	5	0.04	Supera el t objetivo
3(Tabla IV)	0.15	2	0.04	K_p OK
4(Tabla V)	0.15	2	0.08	Supera la T objetivo
5(Tabla VI)	0.15	2	0.02	Supera la T objetivo
6(Tabla VII)	0.15	2	0.038	Supera la T objetivo
7(Tabla VIII)	0.15	2	0.045	K_p y K_i OK

Tabla I: Evolución de resultados.

Kp : 20	
Ki: 0,04	
Kd:0,15	
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	20
5	23
10	30
15	40
20	48
25	64
30	72
35	83
40	90
45	98
50	100
55	101
60	101
150	90

TABLA II: primer ensayo de temperatura sobre el tiempo.

Kp : 5	
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	27
5	30
10	37
15	46
20	56
25	69
30	77
35	82
40	87
45	90
50	91
55	92
60	92
94	90

TABLA III: Se varió el parámetro KP a 5 dejando fijo los demás.

Kp : 2	
Calentamiento	
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	28
5	32
10	39
15	48
20	59
25	70
30	77
35	81
40	84
45	86
50	87
55	88
60	89
65	89
70	90

TABLA IV: Se vario el parámetro KP a 2 dejando fijo los demás.

Kp : 2	Ki:0,08
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	27
5	31
10	40
15	50
20	58
25	71
30	78
35	83
40	86
45	89
50	90
55	92
60	93
65	95

TABLA V: Se varió el parámetro Ki a 0,08 dejando fijo los demás.

Kp : 2	Ki:0,02
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	30
5	33
10	40
15	51
20	60
25	72
30	78
35	81
40	84
45	86
50	87
55	88
60	88
75	88

TABLA VI: Se varió el parámetro Ki a 0,08 dejando fijo los demás

Kp : 2	Ki:0,038
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	29
5	32
10	39
15	48
20	58
25	70
30	77
35	82
40	84
45	86
50	87
55	88
60	89
65	89

TABLA VII: Se varió el parámetro Ki a 0,038 dejando fijo los demás

Kp : 2	Ki:0,045
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	27
5	30
10	38
15	47
20	57
25	68
30	77
35	81
40	84
45	86
50	88
55	89
60	89
65	90
70	90,5
75	90
80	90,5

TABLA VIII: Se varió el parámetro Ki a 0,045 dejando fijo los demás.

Con los valores de Kd, Kp y Ki fijos en $K_d = 2$, $K_i = 0,045$ y $K_d = 0,15$; se modificó la diferencia de temperatura en la que el programa pasa de calentamiento máximo a calentar con control PID. Con una temperatura objetivo de 90°C , se fue probando en que diferencia de temperatura se obtiene el mejor tiempo para alcanzar y mantenerse en la temperatura objetivo. Se pueden observar los resultados en las **Tablas IX y X**. En la **Tabla X** se observa como a partir de los 55 segundos la temperatura se mantiene y deja de oscilar. Con diferencias menores de temperatura la inercia del calentamiento rápido eleva el tiempo. *Es por esto que se definió una diferencia de temperatura de 22°C como la óptima para el cambio de calentamiento máximo a calentamiento por PID (Tabla XI).*

Prueba (Kd: 0.15 – Kp: 2 – Kd: 0.045)	Diferencia de temperatura	Problema
1(Tabla IX)	20	Oscila demasiado la T
2(Tabla X)	22	OK

Tabla XI: Evolución de los resultados.

	Diferencia de Temperatura actual vs objetivo para paso a PID: 20 °C
Kp : 2	
Ki: 0,045	
Kd:0,15	
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	26
5	30
10	39
15	48
20	58
25	68
30	78
35	85
40	88
45	89
50	91
55	92
150	90

TABLA IX: Medición de temperatura en función del tiempo con diferencia temperatura de 20°C de cambio a PID.

	Diferencia de Temperatura actual vs objetivo para paso a PID: 22 °C
Kp : 2	
Ki: 0,04	
Kd:0,15	
t(en segundos)	Temperatura (°C)
0	29
5	32
10	38
15	48
20	58
25	69
30	76
35	83
40	86
45	88
50	89
55	90

TABLA X: Medición de temperatura en función del tiempo con diferencia temperatura de 22°C de cambio a PID.

5.5 Diseño y desarrollo del programa de interfaz usuario-equipo.

El programa para PC está escrito en lenguaje Visual Basic .NET de Microsoft, en su versión gratuita 2017. El mismo se compone de un formulario que ocupa toda la pantalla y en el que se ubican distintas etiquetas (Label) y cuadros de texto (TextBox) para mostrar o configurar variables. Este programa facilita el uso y configuración del sistema pero, de ninguna manera, es obligatorio su uso ya que se puede utilizar de manera autónoma con el display/teclado del equipo. Cuatro Labels muestran las lecturas de la fluorescencia y otros muestran el estado del sistema, como ser temperatura, tiempo transcurrido, número de ciclo, próximas consignas.

Un conjunto de cuadros de texto muestra los parámetros de configuración y permiten la edición (**Figura 36**). A diferencia de los TextBox, los Labels no se pueden editar. El botón “Leer” establece la lectura de los parámetros de configuración desde el sistema Arduino. El botón “Guardar” almacena la configuración editada en pantalla en el sistema Arduino. El botón “Iniciar” inicia los ciclos de calentamiento. El botón “Ventilar” permite accionar manualmente el ventilador por si se quiere enfriar de manera manual el soporte o para comprobar que el mismo funcione.

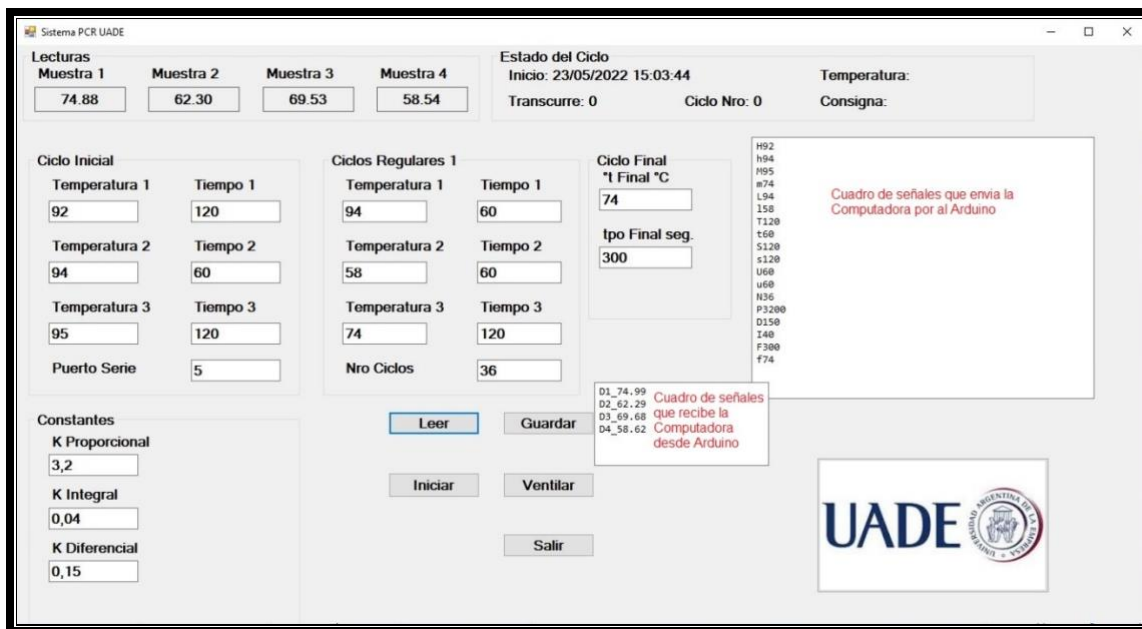


Figura 36: Ventana de visualización del programa de interfaz usuario-PC

En el Anexo III se encuentra el código del programa.

5.6 Ensayo de prototipo vs. PCR de UADE LABS

El prototipo tuvo resultados positivos técnicamente según se demostró en las pruebas y verificaciones anteriores. No obstante, para garantizar su funcionamiento en el contexto del laboratorio, fue necesario diseñar un ensayo de amplificación de ADN. En otras palabras, observar si el equipo es funcional en el marco de un contexto experimental. Para ello, se realizó un ensayo con dos cicladoras (la fabricada en este proyecto y una UADE LABS) en paralelo. El material genético amplificado (Cepa XL1Blue de E.Coli.) se utilizó para poder comprobar la funcionalidad del módulo sensor realizando lecturas y contrastando de manera visual en transiluminador y, al mismo tiempo, con una electroforesis para comprobar que el amplicón fuera específico.

Diseño del ensayo funcional

Como se mencionó anteriormente, el ensayo fue diseñado para testear el prototipo en el contexto de las necesidades del laboratorio. En principio, es necesaria una comparación entre el prototipo y un termociclador UADE LABS. Este último se puede considerar como referencia o patrón ya que corresponde a un equipo en uso y por lo tanto su funcionalidad no está puesta en duda.

Como control negativo se diseñaron tubos en los que no se agregó material genómico, de esta manera no se obtiene una banda producto de la amplificación. La presencia de banda en estos tubos se consideraría una contaminación.

Además, para poder analizar la variación de fluorescencia antes y después del termociclado en los tres conjuntos (Prototipo, UADE LABS y tubos sin genómico) se utilizaron tubos con la misma preparación, pero no se les realizó el termociclado. Estos tubos permiten analizar si el ADN utilizado como templado es capaz de generar una señal al momento de la lectura de fluorescencia, funcionando como un Blanco.

Se preparó *mastermix* para 14 tubos en total con un volumen final de 490 μ L.

Se prepararon 4 tubos para control negativo, 2 tubos para Ensayo, 3 para Control Positivo UADE LABS y 5 tubos blanco. Debido a la necesidad de mayor volumen para hacer las pruebas de detección en gel y con el módulo sensor se duplicaron los valores del ensayo según tp 3 de la Guía de Actividades Curso 2015 de la materia Genética Molecular de UADE, para obtener un volumen final por tubo de 40 μ L. (**Tabla XII**).

Sin genómico: 35 μ L de <i>mastermix</i> + 5 μ L de H ₂ O + 5 μ L de bromuro de etidio/100 mL de <i>buffer</i> TAE 10x
Cicladora UADE LABS: 35 μ L de <i>mastermix</i> + 5 μ L de ADN genómico + 5 μ L de bromuro de etidio/100 mL de <i>buffer</i> TAE 10x
Prototipo: 35 μ L de <i>mastermix</i> + 5 μ L de ADN genómico + 5 μ L de bromuro de etidio/100 mL de <i>buffer</i> TAE 10x

Tabla XII: Composición de cada tubo según su función.

De cada conjunto de tubos (UADE LABS, Prototipo y sin genómico) se aplicó termociclado a la mitad y la otra mitad se dejó sin termociclar.

De cada tubo se tomaron 10 μ L para sembrar en gel de electroforesis. A los tubos que contenían los 30 μ L restantes se les agregó 100 μ L de *buffer* TAE con bromuro de etidio para ser utilizados en la detección de fluorescencia.

En la **Tabla XIII** se puede observar cómo se sembraron los tubos, a qué tipo de ciclador estaban asignados, si había presencia o no de ADN genómico, si se realizó el termociclado y si hubo presencia de banda las cuales se pueden ver en la foto del gel de agarosa (**Figura 37**).

Calle	Tubo	Genómico	Termociclado	Presencia de banda	Observación
1	Control negativo	AUSENCIA	NO	NO	Se verifica ausencia de contaminación sin termociclado
2	Control negativo	AUSENCIA	NO	NO	
3	Control negativo	AUSENCIA	SI	NO	Ausencia de contaminación luego termociclado
4	Control negativo	AUSENCIA	SI	NO	
5	Blanco	PRESENCIA	NO	NO	Obtención de tubos para cuantificar la señal basal sin amplificación
6	Blanco	PRESENCIA	NO	NO	
7	Blanco	PRESENCIA	NO	NO	
8	Blanco	PRESENCIA	NO	NO	
9	Blanco	PRESENCIA	NO	NO	
10	Control positivo	PRESENCIA	SI UADE LABS	SI	Se verifica el funcionamiento del dispositivo UADE LABS y los reactivos del ensayo
11	Control positivo	PRESENCIA	SI UADE LABS	SI	
12	Control positivo	PRESENCIA	SI UADE LABS	SI	
13	Ensayo	PRESENCIA	SI Prototipo	SI	Se verifica el funcionamiento del prototipo
14	Ensayo	PRESENCIA	SI Prototipo	SI	
MARCADOR	-	-	-	-	

TABLA XIII: Resultados obtenidos para cada tubo analizados por electroforesis en el presente trabajo.

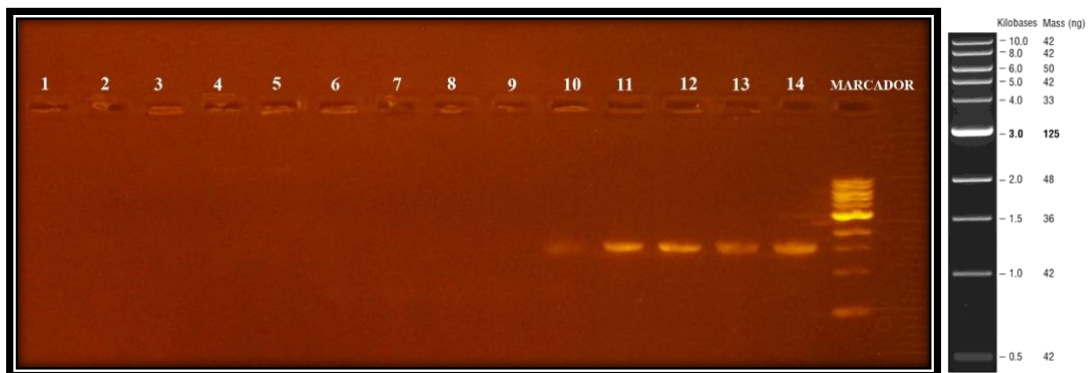


Figura 37: Resultados de la corrida electroforética del ADN correspondiente al genómico, controles, muestras y marcador (1 kb ADN Ladder de BioLabs).

Los tubos se sembraron en las calles 1 a 14 y el marcador de peso molecular de ADN en calle 15. Presencia de banda en las calles 10 a 14 de 1500pb

En todos los tubos en los que no se realizó el proceso de termociclado (1, 2 y 5 al 9) no hubo presencia de banda. Esto se debería a que la concentración de ADN disponible no resulta suficiente para producir una señal visible. Además, la ausencia de banda indica que no hubo una contaminación. En los tubos 3 y 4 en los que si se realizó el proceso de termociclado tampoco hubo presencia de banda, indicando que no hubo una contaminación.

En los tubos 10 a 12, correspondientes a los sometidos al termociclado con la PCR de UADE LABS se observa una banda correspondiente al producto de PCR que se buscó amplificar, el gen 16S de 1500 pb, conocido como “la huella genética bacteriana”, o sea, que se sabe que su búsqueda debería devolver un producto (“generar un amplicón”) de PCR. Los tubos 13 y 14 que corresponden a los sometidos al termociclado con el prototipo, también presentan una banda con el mismo número de pares de base (1500 pb) que la observada en los tubos 10 – 12.

Detección de fluorescencia

El objetivo de este ensayo fue observar si hay diferencias significativas en la emisión de fluorescencia para poder diferenciar la amplificación de ADN. Esto fue comprobado primero en

un transiluminador de manera visual y luego con el módulo sensor de manera medible con los tubos del ensayo funcional.

Con el módulo sensor se tomaron lecturas de fluorescencia de todos los tubos. Se utilizó el equipo Transiluminador de la Marca: UVP, Modelo: M-20 para tener una comparación visual de los diferentes niveles de fluorescencia. Se hizo primero una prueba sin filtros (**Figura 38**) para diferenciar de manera ocular el cambio de intensidad fluorescencia en los diferentes tubos y luego una con filtro para diferenciar la luz naranja (**Figura 39**) para observar el cambio de intensidad de fluorescencia pero observando solamente el rango de fluorescencia específico del bromuro de etidio (600nm). Con respecto a la detección de fluorescencia en los controles negativos (tubos n° 1, 2, 3 y 4) se observa una intensidad de fluorescencia muy baja y sin diferencias apreciables con respecto a los blancos (tubos 5 a 9). En los tubos termociclados tanto en los controles positivos (tubos 10 a 12) como en los del ensayo (tubos 13 y 14) se observa un aumento en la intensidad de la fluorescencia, en comparación con la observada en los tubos de control negativo (tubos 1 a 4) y los blancos (tubos 5 a 9).

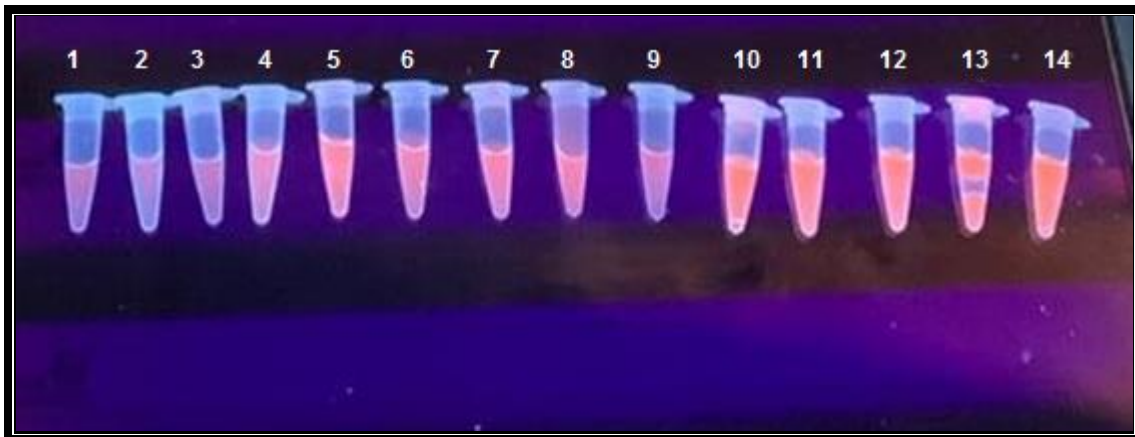


Figura 38: Fotografía de los tubos 1 a 14 en el transiluminador sin utilizar filtro.

Se puede observar el cambio de intensidad de la fluorescencia.

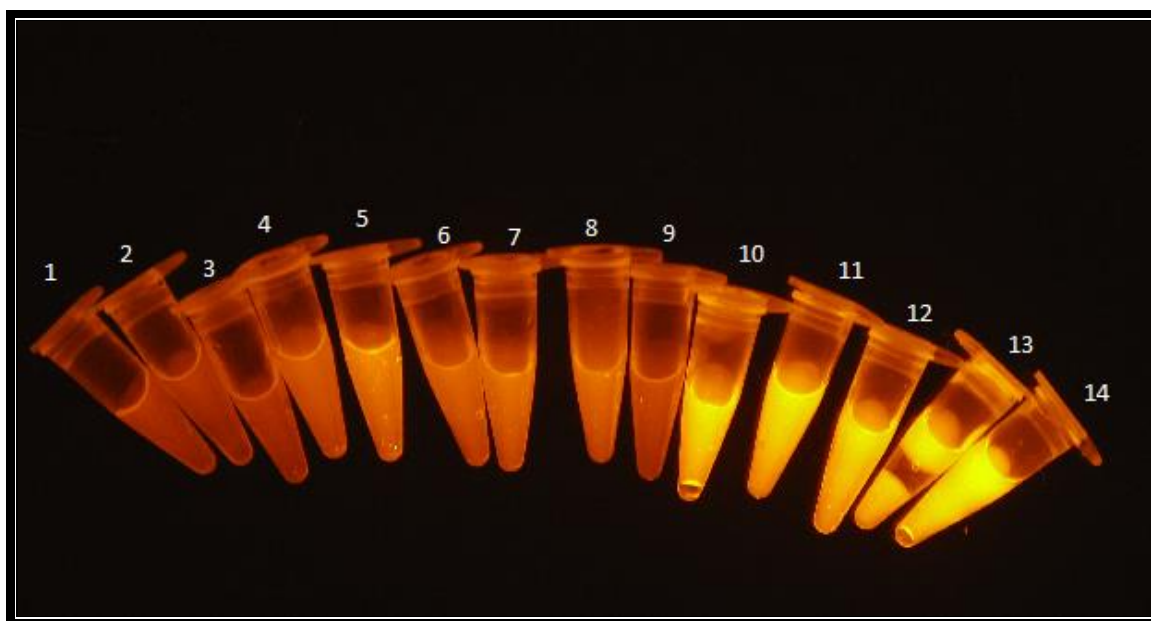


Figura 39: se presenta la fotografía de los tubos 1 a 14 utilizando un filtro en el rango del color naranja.

Se puede observar el cambio de intensidad de la fluorescencia específicamente en el rango de fluorescencia del bromuro de etidio (600 nm).

Finalmente, con el módulo sensor se leyó la señal lumínica por fluorescencia de los tubos del ensayo de funcionalidad y además un tubo más con solo *buffer* TAE y Bromuro de Etidio con la misma concentración utilizada en los demás tubos. Se consideró el resultado obtenido del tubo que contiene solo *buffer* TAE y Bromuro de Etidio como Blanco y se le restó al valor obtenido en los demás tubos para representar la señal de fluorescencia del AD (Tabla XIV). Los valores se les asigna unidades de RLU (Unidades Relativas de Luz)

Calle	Tubo	Genómico	Termociclado	LECTURA (en RLU)	VALOR (en RLU)
0	Blanco	SOLO buffer TAE + BrEt (Blanco)	-	2,7	0
1	Control negativo	AUSENCIA	NO	3,7	1
2	Control negativo	AUSENCIA	NO	3,7	1
3	Control negativo	AUSENCIA	SI UADE LABS	3,7	1
4	Control negativo	AUSENCIA	SI PROTOTIPO	3,8	1,1
5	Blanco	PRESENCIA	NO	3,8	1,1
6	Blanco	PRESENCIA	NO	3,7	1
7	Blanco	PRESENCIA	NO	3,7	1
8	Blanco	PRESENCIA	NO	3,7	1
9	Blanco	PRESENCIA	NO	3,3	0,4
10	Control positivo	PRESENCIA	SI UADE LABS	4,6	1,9
11	Control positivo	PRESENCIA	SI UADE LABS	4,9	2,2
12	Control positivo	PRESENCIA	SI UADE LABS	5,2	2,5
13	Ensayo	PRESENCIA	SI PROTOTIPO	5,0	2,3
14	Ensayo	PRESENCIA	SI PROTOTIPO	5,2	2,5

Tabla XIV: Valores de lectura obtenidos con el módulo sensor para cada tubo antes y después del proceso de PCR. Tomando la señal de lectura del tubo 0 como “blanco”, se puede restar la misma para obtener resultados más precisos. En el cuadro se considera como Valor la lectura de la muestra menos la lectura del blanco.

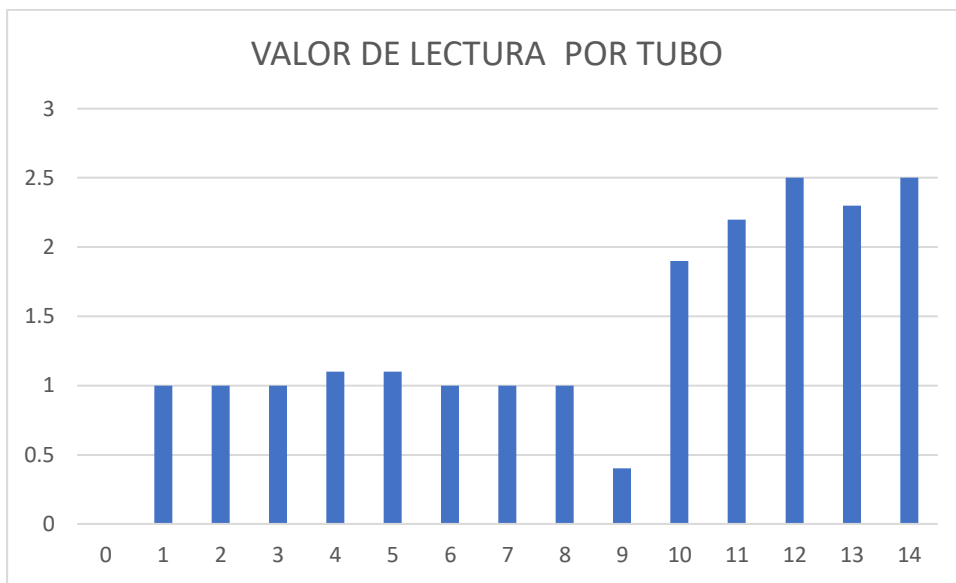


Figura 40: Gráfico de valores obtenidos de lectura lumínica de cada tubo.

Se puede observar el cambio de intensidad lumínica en RLUs en los tubos del 10 al 14 pertenecientes a los tubos con ADN genómico termociclados tanto en el prototipo como en el termociclador de UADE LABS

6.0 Discusión

6.1 Funcionalidad

Lecturas

Para la prueba de fluorescencia primero se observó en el equipo transiluminador de manera visual. Se puede observar (**Figura 39**) una diferencia apreciable entre los tubos donde debería haber ocurrido una amplificación del ADN y por consiguiente un aumento en la fluorescencia lo cual es esperable ya que a mayor concentración de ADN mayor luminiscencia. Las lecturas con el sensor muestran valores similares entre los mismos tipos de tubos sin presentar diferencias significativas entre la PCR de UADE LABS y el prototipo. La lectura se incrementó en los tubos 10 a 14 presentando valores entre 1,9 y 2,5, más del doble que en los demás tubos (entre 0,4 y 1,1). El incremento en la lectura en estos últimos tubos indica que el prototipo permitió una amplificación del ADN similar a la observada en la PCR de UADE LABS.

Calentamiento y Enfriamiento

Si bien el prototipo es funcional como termociclador, los tiempos podrían mejorarse para poder obtener resultados más rápidamente. Se podría mejorar los tiempos de enfriamiento y calentamiento disminuyendo la masa del soporte, lo ideal sería mecanizar una pieza de aluminio con el menor volumen posible, pero por los costos esto debería producirse en cantidad.

Para este proyecto este modelo dio un tiempo de enfriamiento suficiente pero no se descarta que se pueda obtener mejores resultados y llegar a temperaturas más bajas utilizando placas Peltier, las cuales podrían ser agregadas en un futuro proyecto. Estas placas son mucho más silenciosas que el ventilador. Además, podrían utilizarse tanto para el calentamiento como para el enfriamiento. Para utilizar las mismas sería necesario disminuir considerablemente la masa del soporte ya que no poseen la potencia de la resistencia ni el ventilador utilizado.

6.2 Evaluación económica (comparación con comerciales y Open Source)

Lista de componentes y su adquisición (los precios indicados corresponden a la fecha (10/06/2019):

- 1 (una) Módulo Arduino DUE: El mismo puede adquirirse en el exterior, en la página oficial a USD 38.50, como así también en el mercado local, a USD 31.
- 1 (un) Módulo display con teclado para Arduino. En el exterior su precio es de USD 4.65. En el mercado local su precio ronda los USD 8.
- 1 (una) Placa de diseño propio, la cual se hizo hacer en PCBGOGO (empresa china) a un costo de USD 1.00 c/u (cantidad mínima 5 unidades) y USD 11 de cargo de correo oficial (sin impuestos).
- 1 (un) conjunto de componentes para el armado de la placa anterior: Se pueden consultar los precios de cada componente en el Anexo II
- Los archivos de producción están en la página siguiente: <https://www.dropbox.com/s/o3j1ylyufle3j8/PID.zip?dl=0>

El mismo proveedor que fabrica los circuitos impresos, brinda el servicio de compra de componentes y ensamblado de la plaqueta. El costo aproximado es de USD 400 para 5 plaquetas. En este caso, por tratarse de un prototipo, se realizó el ensamblado manualmente, soldando los componentes uno a uno.

El soporte se imprimió con una impresora 3D personal, en caso de tener acceso a una el único costo sin contar el tiempo y electricidad sería el del PLA, un rollo de 1KG cuesta alrededor de USD 12 pero se utiliza una cantidad considerablemente menor (alrededor de 150 gr el prototipo final y puede ser reducido).

El Filtro de 600 nm tiene un costo de USD 25.

Objetos como disipador, tabla de madera y chasis no tuvieron un costo real ya que se utilizó material de descarte. A nivel funcional solo el disipador debería ser comprado en caso de replicar el proyecto, pero sería recomendable buscar un disipador de la menor masa posible y al menor precio posible. En el mercado local se puede encontrar a partir de USD 10.

Un termociclador solo está alrededor de los USD 4000 localmente y un termociclador real time supera 5 veces ese valor.

Finalmente se calculó que el costo del prototipo armado es de aproximadamente USD 360, que corresponde a casi un 10% de los termocicladores comerciales.

7.0 Conclusión

El propósito del trabajo fue el desarrollo de un prototipo funcional de un termociclador y un módulo sensor de ADN que a futuro pueda ser utilizado como metodología de diagnóstico, investigación y educación. De acuerdo con los resultados obtenidos el propósito fue alcanzado. Toda la información del proyecto quedará disponible para la realización de futuras pruebas con el fin de conseguir un mejoramiento del mismo.

Logro

Se logró cumplir los objetivos de hacer un termociclador y un sensor funcional, si bien se pueden realizar mejoras a futuro este proyecto puede ser utilizado e incluso replicado fácilmente para ser utilizado en diferentes instituciones.

Este proyecto puede ser utilizado como punto de partida para futuros proyectos tanto desarrollando aplicaciones como en el mejoramiento del mismo

Mejoras a futuro

Como se mencionó anteriormente se pueden mejorar los tiempos de enfriamiento y calentamiento. El punto principal para mejorar es disminuir la masa del soporte de tubos, pero implica la problemática de poder adquirir o desarrollar dicho soporte lo cual puede aumentar considerablemente el costo.

La tecnología de las placas Peltier podría disminuir considerablemente el tamaño y los tiempos y lograr temperaturas menores. También podrían surgir nuevas tecnologías o mejoras de las actuales que ayuden en este punto.

El módulo sensor si bien se desarrolló en base a las limitaciones de la tecnología adquirible, es bastante sencillo de mejorar en tamaño si se pueden adquirir lámparas led que produzcan luz UV con intensidad y frecuencia necesarias. Incluso puede ser fácilmente acoplado al módulo termociclador como un equipo de PCR en Tiempo Real.

Siguiendo este lineamiento se podría evolucionar a una PCR en Tiempo Real pero ya haciendo cambios mayores tanto a nivel hardware como software.

Tanto en la versión actual del proyecto como una mejorada se puede desarrollar un gabinete para una mejor presentación. Se podrían desarrollar kits de armado del equipo para ser distribuidos a diferentes instituciones.

Finalmente, el punto a mejorar más importante sería desarrollar aplicaciones para el equipo, fácilmente se podrían desarrollar kits de diagnóstico que funcionen como pruebas rápidas o de screening. Algunos ejemplos podrían ser: en salud por ejemplo detección de virus o bacterias como target. En alimentos detección de patógenos, contaminaciones cruzadas, GMO. En educación podría desarrollarse un simple kit, por ejemplo de GFP (Proteína verde fluorescente), para enseñar la técnica de PCR y técnicas de ingeniería genética.

8.0 Bibliografía

REFERENCIAS:

- * BECKER, Andreas, et al. A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Analytical biochemistry*, 1996, vol. 237, no 2, p. 204-207.
- * BROCK, Thomas D. Life at High Temperatures: Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. *Science*, 1967, vol. 158, no 3804, p. 1012-1019.
- * CHIEN, Alice; EDGAR, David B.; TRELA, John M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of bacteriology*, 1976, vol. 127, no 3, p. 1550-1557.
- * DENICOLA ANA. 2017; Espectroscopía de Fluorescencia. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Uruguay.
- * HIGUCHI, Russell, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 1992, vol. 10, no 4, p. 413-417.
- * ISHIGURO, Takahiko, et al. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus ARN by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Analytical biochemistry*, 1995, vol. 229, no 2, p. 207-213.
- * MULLIS, Kary, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. En *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. p. 263-273.
- * OGURA, M., et al. Use of the fluorescent dye YOYO-1 to quantify oligonucleotides immobilized on plastic plates. *BioTechniques*, 1994, vol. 16, no 6, p. 1032-1034.

SITIOS WEB:

* ARDUINO (en línea) (Consulta Junio 2018 a Mayo 2019)

<https://www.arduino.cc>

<https://www.arduino.cc/en/uploads/Main/arduino-Due-schematic.pdf>

* COMPILADOR VISUAL STUDIO (en línea) (Consultado Junio 2017)

<https://visualstudio.microsoft.com/es/downloads/>

* DUEFLASH (en línea) (Consultado Junio 2018)

<https://github.com/sebnil/DueFlashStorage>

* DUEFLASH, Funciones asociadas al manejo de la memoria flash de la placa Arduino Due. (en línea) (Consultado Marzo 2018)

<https://github.com/sebnil/DueFlashStorage>

* DUETIMER Funciones asociada al manejo de los temporizadores (timers) de la placa Arduino DUE. (en línea) (Consultado Marzo 2018)

<https://github.com/ivanseidel/DueTimer>

* LCD SHIELD Especificaciones de la placa display para Arduino. (en línea) (Consultado Febrero 2018)

<http://www.profetolocka.com.ar/2015/10/15/lcd-y-keypad-shield-para-arduino/>

* LIQUIDCRYSTAL Funciones asociadas al manejo de la pantalla LCD alfanumérica, para entorno Arduino. (en línea) (Consultado Marzo 2018)

<https://www.arduino.cc/en/Reference/LiquidCrystal>

* MEASUREMENT TECHNIQUES pág. 7, 2012. Nota de aplicación del fabricante de fotodiodos Vishay. (en línea) (Consultado Junio 2017)

<https://www.vishay.com/docs/80085/measuram.pdf>

* NATIONAL SEMICONDUCTOR LINEAR APPLICATION HANDBOOK 1994, página 908.: (en línea) (Consultado Marzo 2018)

https://ia801701.us.archive.org/3/items/NationalSemiconductorLinearApplicationsHandbook1994/NationalSemiconductorLinearApplicationsHandbook1994_text.pdf

* PID Biblioteca de funciones controlador PID para entorno Arduino. (en línea) (Consultado Marzo 2018)

https://github.com/br3ttb/Arduino-PID-Library/blob/master/PID_v1.h, acceso: marzo 2018.

* POWER MOSFET TRANSISTOR DATA 1988. Manual de transistores marca Motorola. (en línea) (Consultado Marzo 2018)

https://ia800602.us.archive.org/8/items/bit savers_motoroladaPowerMOSFETTransistorData_75374944/1988_Motorola_Power_MOSFET_Transistor_Data.pdf

* RIDEON. Especificaciones resistor de potencia compacto marca Rideon. (en línea) (Consultado Marzo 2018)

<https://riedon.com/resistors/view/to-247-power-film-resistors-pf2470/>

SITIOS DE COMPRAS

* OPENPCR de la empresa Chai Bio (<https://www.chaibio.com/>)

* OPENQPCR de la empresa Chai Bio (<https://www.chaibio.com/openqpcr>)

* Sensor De Luz Ambiental Breakout Temt6000 Arduino (<https://candy-ho.com/producto/sensor-de-luz-ambiental-breakout-temt6000-arduino/>)

* Filtro de 600nm 11.8mm de diámetro (<https://www.edmundoptics.co.uk/p/118mm-diameter-600nm-filter-experimental-grade/1812/>)

* Fotodiodo (pico 570nm) (<https://www.vishay.com/docs/81579/temt6000.pdf>)

* Filtro UADE LABS importado de Inglaterra. (<https://www.edmundoptics.co.uk/p/118mm-diameter-600nm-filter-experimental-grade/1812/>)

* Led del rango violeta y ultravioleta (<http://www.elumiled.com/ELMS-262-led-3w-uv-ultravioleta-395nm-400nm-con-pre-disipador>)

* Cooler modelo v80e12bga7-07 Nidec Ultraflo (<https://gmelectronica.com.ar/producto/v80e12bga7-07/>)

* Módulo Arduino DUE (<https://store.arduino.cc/usa/duel>)

* Módulo display con teclado para Arduino. (<https://www.oddwires.com/16x2-character-lcd-display-shield-with-keypad-for-arduino/>)

* Placa de diseño propio, en PCBGOGO (empresa china). Los archivos de producción están en la página siguiente: <https://www.dropbox.com/s/o3j1ylayufle3j8/PID.zip?dl=0>

9.0 Anexos

ANEXO I

Extracción de ADN

3.G. Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
- water bath, 80°C
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
- 50mM EDTA (pH 8.0) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysozyme (Sigma Cat.# L4919) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysostaphin (Sigma Cat.# L7386) (for gram positive bacteria)

1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5ml microcentrifuge tube.

2. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes to pellet the cells. Remove the supernatant. For Gram Positive

Bacteria, proceed to Step 3. For Gram Negative Bacteria go directly to Step 6.

3. Resuspend the cells thoroughly in 480µl of 50mM EDTA.

4. Add the appropriate lytic enzyme(s) to the resuspended cell pellet in a total volume of 120µl, and gently pipet to

mix. The purpose of this pretreatment is to weaken the cell wall so that efficient cell lysis can take place.

Note: For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml

lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis*,

Micrococcus luteus, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, and *Brevibacterium albidum*) lyse

efficiently using lysozyme alone.

5. Incubate the sample at 37°C for 30–60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × g and remove the

supernatant.

6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.

7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.

8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2–5 times to mix.

9. Incubate at 37°C for 15–60 minutes. Cool the sample to room temperature.

10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for

20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.

11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.

12. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 3 minutes.

13. Transfer the supernatant containing the DNA to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600µl of room

temperature isopropanol.

Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid

in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.

14. Gently mix by inversion until the thread-like strands of DNA form a visible mass.

15. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes.

16. Carefully pour off the supernatant and drain the tube on clean absorbent paper. Add 600µl of room temperature

70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA pellet.

17. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes. Carefully aspirate the ethanol.

18. Drain the tube on clean absorbent paper and allow the pellet to air-dry for 10–15 minutes.

19. Add 100µl of DNA Rehydration Solution to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour.

Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the ADN by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.

20. Store the ADN at 2–8°C.

Protocolo de PCR

Materiales necesarios

1- ADN bacteriano.

2- Eppendorfs

3- Agua bidestilada estéril.

4- Primers:

Nombre	Secuencia 5´-3´
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC
fD1	AGAGTTTGATCCTgGCTCAG

5- dNTPs

6- MgCl₂

7- Buffer de Taq polimerasa

8- Taq polimerasa

9- Tips

10- Pipetas

11- Termociclador

12- Hielo

Procedimiento:

1- Descongelar en hielo los reactivos

2- Centrifugar si el contenido no está en el fondo del tubo

3- Prepara la siguiente master mix (hacer las cuentas para 3 tubos):

Buffer	1X
MgCl ₂	3 mM
Primers (10 μM)	1.5 μM/cada uno
dNTP (2 mM)	200 μM
Polimerasa (5 U/μL)	0.55 U
H ₂ O	μl
Total	17.5 μl

La master mix se prepara según el número de reacciones a utilizar. En este caso 3.

Una vez preparada se divide en dos (17,5 μL) en cada tubo y se agrega o el ADN problema o agua en el caso del blanco.

Master Mix	17.5 μl
ADN problema /H ₂ O	2.5 μl
<hr/>	
Total	20 μl

4- Se colocan las muestras en el termociclador y se corre el programa adecuado para los primers a utilizar.

Gel de Agarosa

1 - Pesar 1g de agarosa y disolver en 100 mL de buffer TAE 1X

2 - Calentar la mezcla contenida en un matraz, en un microondas dando pulsos de 30 segundos hasta lograr una mezcla homogénea. (Se debe evitar la ebullición)

3 - Armar el cassette donde ira el gel.

- 4 - Vaciar con mucho cuidado la mezcla caliente de agarosa/buffer caliente evitando hacer burbujas y coloque un peine en un extremo.
- 5 - En un papel film se tiñe las muestras de ADN que se van a correr. Se usa 4 ul de cada muestra que se tiñen con 2 ul de buffer de siembra 3X.
- 6 - Se siembra la mezcla de 6 ul resultante de cada muestra y un marcador de peso molecular (PM)
- 7 - Conectar la fuente teniendo cuidado de que el polo positivo esté en el lado opuesto al sitio de siembra. Correr a voltaje constante (3-5 V/cm, donde cm representan la distancia entre los electrodos en la cuba de electroforesis y no está relacionado con la longitud del gel) hasta que el azul de bromofenol haya migrado unos 10 cm.
- 8 - Apagar la fuente. Colocar el gel sobre un transiluminador ultravioleta. Observar manteniendo los ojos protegidos de la radiación UV como indique el docente.

Soluciones utilizadas

Solución de agarosa:

Agarosa 0.8%

Bromuro de etidio 10 mg/ml

TAE 1X

Buffer de siembra 3X:

Xilene-cianol 0.1%

Azul de bromofenol 0.1%

Glicerol 15%

Buffer de corrida (TAE 50X):

Tris base 242 g

Ácido Acético glacial 57,1 ml

EDTA 0.5 M pH 8 100 ml

H₂O hasta 1 li

ANEXO II

1 (un) conjunto de componentes para el armado de la placa:

Item	Reference	Part	Código proveedor externo	Precio		
				UDS	Mercado libre	Precio \$
1	ANL	HEADER 6 H	<u>5-535541-4</u>	USD 2,08	<u>MLA-</u> <u>688074341</u>	\$ 12,66
2	ANL2	HEADER 6 M	649-54101-T30-08 (cortar 6 pines)	USD 0,52	<u>MLA-</u> <u>624184130</u>	\$ 4,25
3	BZ1	BUZZER	<u>SD1209TT-A1</u>	USD 2,29	<u>MLA-</u> <u>680090861</u>	\$ 74,44
4	C1	.01UF	<u>12065C103KAT2A</u>	USD 0,24	<u>MLA-</u> <u>777798278</u>	\$ 0,75
5	C2	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
6	C3	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
7	C4	1UF	<u>C1206C105K6RACTU</u>	USD 1,05	<u>MLA-</u> <u>669328933</u>	\$ 37,23
8	C5	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
9	C6	10UF	<u>C1206X106K3RACTU</u>	USD 0,97	<u>MLA-</u> <u>759069327</u>	\$ 57,53
10	C7	.01UF	<u>12065C103KAT2A</u>	USD 0,24	<u>MLA-</u> <u>777798278</u>	\$ 37,49

11	C8	1UF	<u>C1206C105K6RACTU</u>	USD 1,05	<u>MLA-</u> <u>669328933</u>	\$ 372,25
12	C9	1UF	<u>C1206C105K6RACTU</u>	USD 1,05	<u>MLA-</u> <u>669328933</u>	\$ 372,25
13	C10	1UF	<u>C1206C105K6RACTU</u>	USD 1,05	<u>MLA-</u> <u>669328933</u>	\$ 372,25
14	C11	.01UF	<u>12065C103KAT2A</u>	USD 0,24	<u>MLA-</u> <u>777798278</u>	\$ 37,49
15	C12	1UF	<u>C1206C105K6RACTU</u>	USD 1,05	<u>MLA-</u> <u>669328933</u>	\$ 372,25
16	C13	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
17	C14	1UF	<u>C1206C105K6RACTU</u>	USD 1,05	<u>MLA-</u> <u>669328933</u>	\$ 372,25
18	C15	.01UF	<u>12065C103KAT2A</u>	USD 0,24	<u>MLA-</u> <u>777798278</u>	\$ 37,49
19	C16	1UF	<u>C1206C105K6RACTU</u>	USD 1,05	<u>MLA-</u> <u>669328933</u>	\$ 372,25
20	C17	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
21	C18	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
22	C19	100uF	<u>EKY-500ETD101MHB5D</u>	USD 0,54	<u>MLA-</u> <u>758536787</u>	\$ 15,00
23	C20	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
24	C21	10UF	<u>C1206X106K3RACTU</u>	USD 0,97	<u>MLA-</u> <u>759069327</u>	\$ 57,53

25	C22	10UF	<u>C1206X106K3RACTU</u>	USD 0,97	<u>MLA-</u> <u>759069327</u>	\$ 57,53
26	C23	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
27	C24	.1UF	<u>C1206C104MMREC7210</u>	USD 0,28	<u>MLA-</u> <u>625090719</u>	\$ 1,38
28	D1	LL4148	<u>512-LL4148</u>	USD 0,10	<u>MLA-</u> <u>764698186</u>	\$ 24,70
29	D2	LL4148	<u>512-LL4148</u>	USD 0,10	<u>MLA-</u> <u>764698186</u>	\$ 24,70
30	D3	LL4148	<u>512-LL4148</u>	USD 0,10	<u>MLA-</u> <u>764698186</u>	\$ 24,70
31	D4	LL4148	<u>512-LL4148</u>	USD 0,10	<u>MLA-</u> <u>764698186</u>	\$ 24,70
32	D5	LL4148	<u>512-LL4148</u>	USD 0,10	<u>MLA-</u> <u>764698186</u>	\$ 24,70
33	IOH	10	HEADER <u>571-5-535541-8</u>	USD 2,29	<u>MLA-</u> <u>767694860</u>	\$ 74,00
34	IOH2	10	HEADER <u>649-54101-T30-08 (cortar</u> <u>10 pines)</u>	USD 0,52	<u>MLA-</u> <u>624184130</u>	\$ 25,49
35	IOL	8	HEADER <u>571-5-535541-6</u>	USD 1,91	<u>MLA-</u> <u>767803853</u>	\$ 49,00
36	IOL2	8	HEADER <u>649-54101-T30-08 (cortar 8</u> <u>pines)</u>	USD 0,52	<u>MLA-</u> <u>624184130</u>	\$ 25,49
37	JP1	2	HEADER <u>649-OQ02545000JOG</u>	USD 0,26	<u>MLA-</u> <u>646697292</u>	\$ 44,90
38	JP2	3	HEADER <u>538-22-05-7038</u>	USD 0,85	<u>MLA-</u> <u>764886403</u>	\$ 59,49

39	JP3	3	538-22-05-7038	USD	MLA- 764886403	\$ 59,49
40	JP4	3	538-22-05-7038	USD	MLA- 764886403	\$ 59,49
41	JP5	3	538-22-05-7038	USD	MLA- 764886403	\$ 59,49
42	JP6	3	538-22-05-7038	USD	MLA- 764886403	\$ 59,49
43	JP7	2	649-OQ02545000JOG	USD	MLA- 646697292	\$ 44,90
44	JP8	2	649-OQ02545000JOG	USD	MLA- 646697292	\$ 44,90
45	JP9	2	649-OQ02545000JOG	USD	MLA- 646697292	\$ 44,90
46	PWR	8	571-5-535541-6	USD	MLA- 767803853	\$ 49,00
47	PWR2	8	649-54101-T30-08 (cortar 8 pines)	USD	MLA- 624184130	\$ 25,49
48	Q1	IRF630	511-IRF630	USD	MLA- 614114952	\$ 101,43
49	Q2	IRF630	511-IRF630	USD	MLA- 614114952	\$ 101,43
50	Q3	IRF630	511-IRF630	USD	MLA- 614114952	\$ 101,43
51	Q4	BC817	BC817K-40HVL	USD	MLA- 709790063	\$ 111,74
52	R1	100M	588-MOX750221006J	USD	MLA- 675117969	\$ 492,65

53	R2	100K	<u>RCS1206100KFKEA</u>	USD 0,30	<u>MLA-</u> <u>784488071</u>	\$ 145,00
54	R3	100K	<u>RCS1206100KFKEA</u>	USD 0,30	<u>MLA-</u> <u>784488071</u>	\$ 145,00
55	R4	100M	<u>588-MOX750221006J</u>	USD 6,30	<u>MLA-</u> <u>675117969</u>	\$ 492,65
56	R5	100M	<u>588-MOX750221006J</u>	USD 6,30	<u>MLA-</u> <u>675117969</u>	\$ 492,65
57	R6	100K	<u>RCS1206100KFKEA</u>	USD 0,30	<u>MLA-</u> <u>784488071</u>	\$ 145,00
58	R7	100K	<u>RCS1206100KFKEA</u>	USD 0,30	<u>MLA-</u> <u>784488071</u>	\$ 145,00
59	R8	100K	<u>RCS1206100KFKEA</u>	USD 0,30	<u>MLA-</u> <u>784488071</u>	\$ 145,00
60	R9	100K	<u>RCS1206100KFKEA</u>	USD 0,30	<u>MLA-</u> <u>784488071</u>	\$ 145,00
61	R10	100M	<u>588-MOX750221006J</u>	USD 6,30	<u>MLA-</u> <u>675117969</u>	\$ 492,65
62	R11	100K	<u>RCS1206100KFKEA</u>	USD 0,30	<u>MLA-</u> <u>784488071</u>	\$ 145,00
63	R12	100K	<u>RCS1206100KFKEA</u>	USD 0,30	<u>MLA-</u> <u>784488071</u>	\$ 145,00
64	R13	4K7	<u>KTR18EZPF4701</u>	USD 0,20	<u>MLA-</u> <u>699173679</u>	\$ 106,46
65	R14	100	<u>CRCW1206100RJNEAC</u>	USD 0,12	<u>MLA-</u> <u>699169176</u>	\$ 95,54
66	U1	LMC662	<u>LMC662CMX/NOPB</u>	USD 1,51	<u>MLA-</u> <u>733808558</u>	\$ 333,61

67	U2	LMC662	<u>LMC662CMX/NOPB</u>	USD 1,51	<u>MLA-</u> <u>733808558</u>	\$ 333,61
68	U3	ALD1704	<u>ALD1704ASAL</u>	USD 4,95	N/D	
69	U4	74HC14	<u>SN74HC14NS</u>	USD 0,44	<u>MLA-</u> <u>611143517</u>	\$ 51,69
70	U5	ICL7662	<u>ICL7662CBA+</u>	USD 2,99	<u>MLA-</u> <u>612081309</u>	\$ 634,58

1 (un) conjunto de componentes externos a la placa:

71	JP2h	HEADER 3H	<u>61900311621</u>	USD 0,13	<u>MLA-</u> <u>657223650</u>	\$ 3,78
72	JP3h	HEADER 3H	<u>61900311621</u>	USD 0,13	<u>MLA-</u> <u>657223650</u>	\$ 3,78
73	JP4h	HEADER 3H	<u>61900311621</u>	USD 0,13	<u>MLA-</u> <u>657223650</u>	\$ 3,78
74	JP5h	HEADER 3H	<u>61900311621</u>	USD 0,13	<u>MLA-</u> <u>657223650</u>	\$ 3,78
75	JP6h	HEADER 3H	<u>61900311621</u>	USD 0,13	<u>MLA-</u> <u>657223650</u>	\$ 3,78
76	pin	pin hembra	<u>08-56-0109 (Cut Strip)</u>	USD 0,24		
77	JP7h	HEADER 2h	TENF02	USD 2,00	<u>MLA-</u> <u>672103664</u>	\$ 17,49
78	JP8h	HEADER 2h	TENF02	USD 2,00	<u>MLA-</u> <u>672103664</u>	\$ 17,49

79	JP9h	HEADER 2h	TENF02	USD 2,00	MLA- <u>672103664</u>	\$ 17,49
80	JP1h	HEADER 2h	TENF02	USD 2,00	MLA- <u>672103664</u>	\$ 17,49
81	U6	LM35	<u>LM35DZ/NOPB</u>	USD 2,05	MLA- <u>625388327</u>	\$ 65,00
82	D6	BPW24	<u>BPW24R</u>	USD 4,95	MLA- <u>723885153</u>	\$ 458,70
83	RQ	Calefacto r	<u>PF2472 1R00</u>	USD 8,05	MLA- <u>651478520</u>	\$ 1.166,89
84	LVPS	Fuente 24V	<u>TXH 480-124</u>	USD 25,22	MLA- <u>750373095</u>	\$ 1.750,00
85	FAN	Ventilado r	<u>9GA0612P9G001</u>	USD 15,30	MLA- <u>689622521</u>	\$ 596,37

ANEXO III

CODIGO

https://drive.google.com/drive/folders/1fH5hxcEAZJeTAVLLHOdTRZB1sbMgmcd_?usp=sharing