

REPRODUÇÃO DO CICLO PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) ATRAVÉS DO DESENVOLVIMENTO DE UM TERMOCICLADOR

BERGAMANN, Guilherme H. - guibergamann@hotmail.com (UNIBRASIL)

FAVERI, Leonardo - faver_i@hotmail.com

PEREIRA, Khawan M. - khawan_marafongf2@hotmail.com

PACHOLOK, Mariano - marianopacholok@unibrasil.com.br

SCHNEIDER, Fábio A. - fabioschneider@unibrasil.com.br

A técnica da PCR (Polimerase Chain Reaction) permite que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado em apenas algumas horas. A PCR se baseia em três etapas fundamentais, definidas pela temperatura e tempo de cada ciclo. Até os últimos anos, essa técnica era aplicada consecutivamente sendo um processo bastante demorado. No entanto, atualmente têm surgido equipamentos como os termocicladores que automatizam esse processo. Assim, a fim de conhecer o funcionamento deste tipo de equipamento e da reprodução dos ciclos da PCR, é proposta a construção e simulação de um protótipo de termociclador. Por meio de levantamentos bibliográficos e análise de um equipamento similar foram investigados tanto o funcionamento da máquina quanto os materiais envolvidos para sua fabricação. Para que o protótipo atenda os requisitos presentes na aplicação da técnica PCR, o estudo foi dividido em quatro fases, sendo elas: sistema lógico, sistema eletroeletrônico, análise térmica e estrutura mecânica da máquina. O projeto foi elaborado para reproduzir o ciclo da PCR e atender as necessidades do pesquisador na área de biotecnologia possibilitando que o dispositivo seja utilizado para realizar os vários processos que exigem esta técnica.

Palavras-chave: PCR; Termociclador; Biotecnologia; Controle de temperatura.

A técnica da PCR foi desenvolvida por Randy Saiki e Kary Mullis. Este, tentou publicar seu trabalho mas não sendo aceita pelas principais revistas científicas não aceitando a teoria proposta por Mullis, embora conseguido publicar um artigo sobre amplificação do gene da β -globina humana na *Methods in Enzymology*. Nos primeiros testes da PCR o cientista utilizou a enzima da DNA polimerase de *E. Coli*, mas se tornava um processo extenso por que tinha que ser adicionada manualmente a cada ciclo de amplificação, sendo destruída toda vez que a temperatura era elevada para 95°C para a desnaturalização do DNA. O problema foi resolvido pela descoberta da enzima taq polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, cuja bactéria, resiste a temperaturas que eram necessárias para o procedimento da técnica. Como o

processo era manual e extenso tornou-se necessário a automatização do processo, vindo em 1989 o primeiro termociclador.

O objetivo da técnica PCR é a duplicação da dupla fita de DNA, havendo diversas aplicabilidades. Por exemplo: o estudo do padrão de expressão gênica (transcritos raros); seleção de clones recombinantes; sequenciamento direto de produtos amplificados; detecção de mutações em genes específicos; estudos diagnósticos de doenças infecciosas, detecção de bactérias, vírus e protozoários parasitas).

Existe uma gama de técnicas da PCR que variam entre tempo de duração das etapas, número de ciclos da etapa intermediária, tempo de subida/descida em cada ciclo entre outros. O funcionamento deste equipamento pode ser descrito a partir de três etapas distintas. A etapa inicial caracteriza-se pela elevação da temperatura a 95°C de 2 a 10 minutos. A etapa intermediária consiste em aproximadamente 30 ciclos cada qual com a seguinte sequência: separação da dupla fita a 95°C por 30 segundos; anelamento dos “primers” na sequência alvo do DNA, a 60°C durante 30 segundos; e a extensão da fita reproduzida, a 72°C durante 45 segundos. Na etapa final temos novamente a extensão da fita a 72°C de 7 a 10 minutos.

Para a realização dos ciclos acima mencionado, o estudo do protótipo de um termociclador foi separado em quatro fases, sendo elas: sistema lógico, sistema eletroeletrônico, análise térmica e estrutura mecânica da máquina.

A automação do sistema foi utilizado o microcontrolador Arduino ATmega2560, o qual conta com um open-source Arduino Software (IDE), em que é feita toda a programação de controle de temperatura, duração de cada ciclo e inversão de polaridade da pastilha Peltier. O circuito eletroeletrônico tem como principais componentes: o sensor de temperatura, o módulo relé com 2 canais 5v o qual tem como função a ponte H e as células Peltier. Estas também conhecidas como pastilhas termoelétricas que são feitas de Telureto de Bismuto (Bi_2Te_3) e operam como bombas de calor. Quando uma corrente é aplicada, o calor se move de um lado para o outro, se os polos onde a corrente elétrica flui são invertidos, muda-se o sentido de transmissão de calor, como mostrado na figura a seguir.

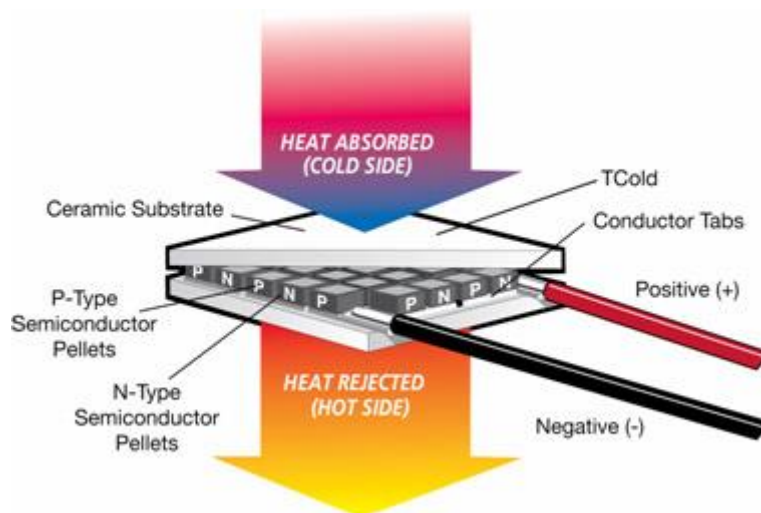


Figura 1. Pastilha Peltier e funcionamento

O componente que é responsável por essa inversão é um Módulo Relé com 2 canais, que fará a função de ponte H do circuito mudando o fluxo de calor da Peltier.

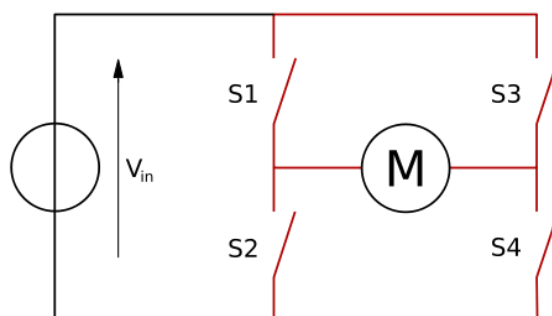


Figura 2. Esquema de funcionamento da ponte H

Enquanto as chaves S1 e S4 estão ligadas e S2 e S3 estão desligadas, fecha-se o circuito e permite a passagem de corrente para a pastilha determinando o sentido do fluxo de calor. Desligando as chaves S1 e S4 e ligando S2 e S3 inverte o sentido da corrente que passa pela Peltier e conseqüentemente muda o sentido.

Para medir a temperatura em que a bandeja de amostras atinge pelo calor transferido pela bomba de calor foi utilizado o sensor LM35 que pode ser utilizado em temperaturas que vão desde -55°C à 150°C .

Com os componentes acima citados foram montados os circuitos de forma separada para realizar os testes do funcionamento da ponte H e sensor de temperatura e por fim unir todo o circuito.

Primeiro, foi montado o relé com o Arduino para o teste da ponte H, com as pastilhas Peltier, atingindo a temperatura necessária para a realização das etapas do ciclo da PCR.

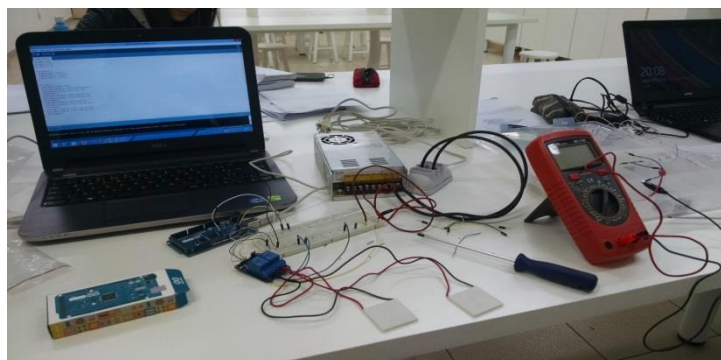


Figura 3. Teste da ponte H

Em segundo foi feito a programação do display LCD com o sensor de temperatura para determinar a precisão da leitura.

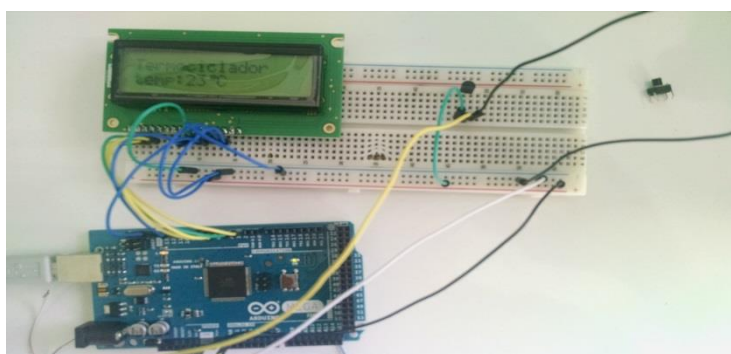


Figura 4. Teste do display LCD e sensor de temperatura

E por fim foram unidos os dois circuitos para o teste de todos os componentes envolvidos para a análise de desempenho.

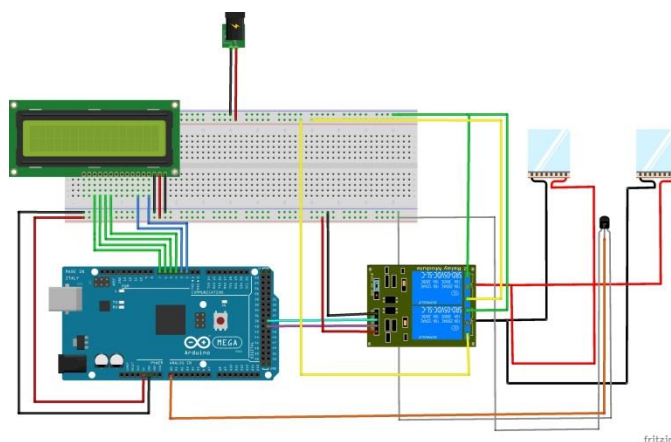


Figura 5. Circuito completo

Ao realizar os testes dos componentes no circuito completo, foi constatado uma grande variação na medição do sensor LM35, não tendo a precisão necessária para o projeto, sendo necessária a substituição por outro tipo de sensor. A ponte H obteve êxito na inversão de polaridade utilizada na pastilha Peltier.

Para desenvolver a estrutura mecânica do termociclador primeiro foi observado um já existente, a partir do mesmo foram tiradas medidas para que o protótipo fosse desenhado com duas peças simples, uma bandeja de amostras onde seriam colocados os tubos de eppendorf e uma tampa para cobrir as amostras. O material escolhido para o desenvolvimento de ambas as peças foi o alumínio, por ser relativamente leve em comparação a outros metais condutores térmicos.

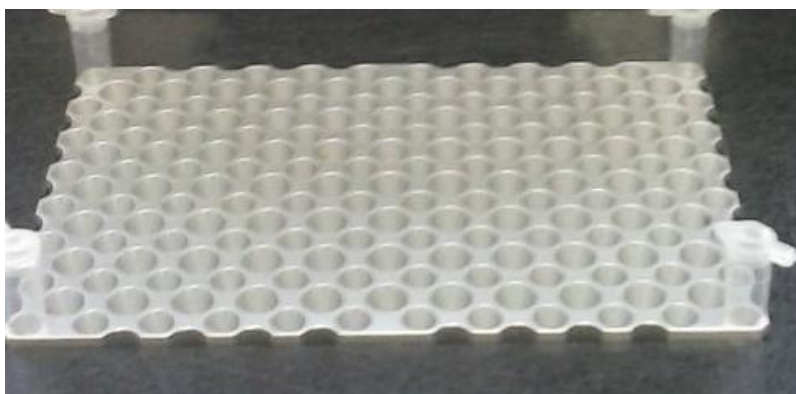


Figura 6. Bandeja de amostras

As dimensões da bandeja de amostras e da tampa foram desenhadas de maneira que utilizasse toda a área útil de maneira eficiente em relação ao tamanho das células Peltier.

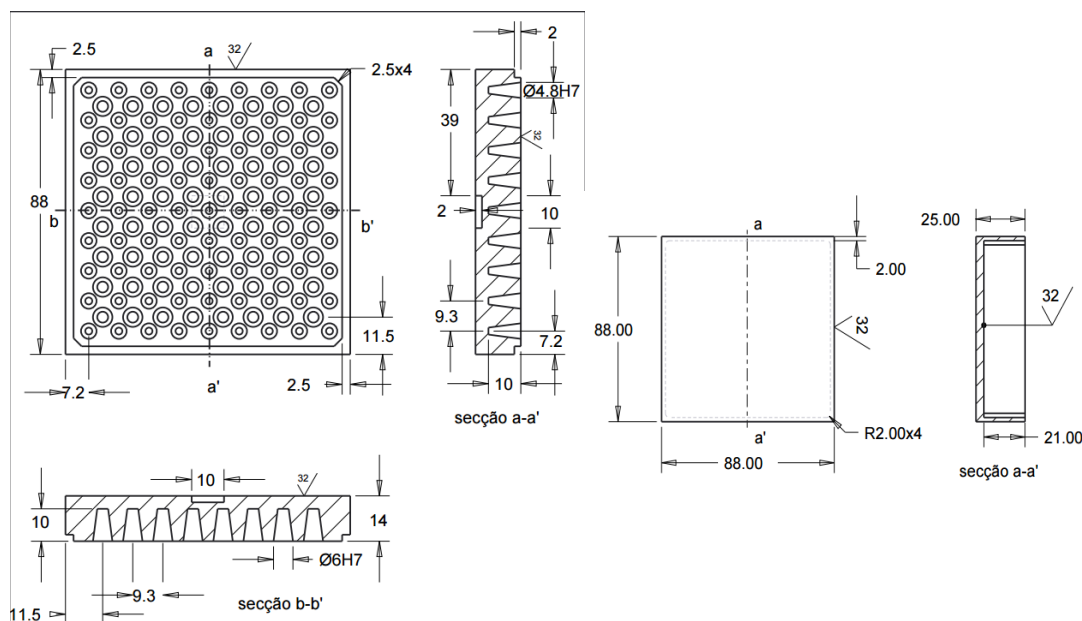


Figura 7. Desenhos Técnicos da bandeja de amostras e da tampa

As pastilhas Peltier serão distribuídas de forma igual na base da bandeja de amostras e fixadas com pasta térmica para que o isolamento térmico aconteça de forma eficiente.

Quanto a análise térmica é importante citar que a transferência do calor acontece por duas maneiras diferentes, por condução, que acontece diretamente pelo contato da bandeja com as pastilhas e pela convecção natural do ar, já que não existe nenhuma forma de exaustão como coolers ou ventiladores para a circulação do ar, portanto ela acontece de forma natural, onde o ar circula sem forças externas.

Referências Bibliográficas

CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERIA MECANICA, 8., 2007, Cusco. Simulación y Análisis Térmico de un Prototipo de Porta Muestras para un Termociclador para Uso en Ingeniería y Biología Molecular. San Miguel: Pontificia Universidad Católica del Perú, 2007. 8 p.

VILELA, W. A.; FERREIRA, P. A. Estudo e Montagem de um Sistema de um Controle de Temperatura para Caracterização de Células Solares. 2014. 30 p. Relatório Final de Projeto de Iniciação Científica - (PIBIC/CNPq/INPE).

SOUSA FARIAS, M. M.; ARANTES, R. C. Controle da Temperatura da Água Utilizando Microcontrolador. 2013. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro Universitário de Brasília - UniCEUB.

Clube da Eletrônica, Sistema de refrigeração termoelétrico por efeito Peltier. Disponível em: <http://www.clubedaeletronica.com.br/Anima/A_refrigera/Anima%20019.htm > Acesso em: 08 de Maio de 2015.

SANTIN, A. O.; POLETTI OLIVEIRA, A. R.; LEISMANN, I. A. Cooler Peltier Microcontrolado. Disponível em: <<http://www.ppgia.pucpr.br/~santin/ee/2007/1s/3/>> Acesso em: 08 de Maio de 2015.

http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20-%20Biologia%20Celular/Principios_da_PCR.pdf >Acessado em out 2015.

<http://www.peltier.com.br/> >Acessado em out 2015.

<http://www.arduino.cc> >Acessado em out 2015.

<http://depto.icb.ufmg.br/dmor/pad-morf/pcr2.htm> > Acessado em Out 2015.