CONSTRUCCIÓ D'UN TERMOCICLADOR A CASA

Laura Salvadó Bautista
Glòria Fusté Constantí
INS Joan Guinjoan
2n BAT A
11/12/19

Índex

1. Introducció 3
2. Objectius del treball 3
3. La genètica pel treball 4
3.1 Els nucleòtids 4
3.2 L'ADN 6
3.3 Els oligonucleòtids 8
3.4 L'ADN polimerasa 8
3.5 La dissolució tampó 10
4. Els laboratoris de genètica 10
4.1 Què són? 10
4.2 Procediments 12
4.2.1 PCR 12
4.2.2 Clonació 18
4.2.3 Electroforesi 20
4.2.4 Centrifugació 21
5. El *Biohacking* 22
5.1 Què és? 22
5.2 Orígens 24
5.3 Aparells 27
6. El termociclador 30
6.1 Utilitat 31
6.2 Parts 32
6.3 Construcció 36

6.3.1 Part estructural 36
6.3.2 Part electrònica 43
6.4 Pressupost 46
6.5 Comprovació 47
6.5.1 Els errors 47
6.5.2 L'experiment 53
6.5.3 Millores 56
7. Conclusions 57
8. Bibliografia i webgrafia 58
9. Agraïments 59
10. Annexos 60

1. Introducció

La genètica molecular és una de les branques de la biologia que crida més l'atenció degut a tot el que es pot saber d'un mateix en un fragment molt petit d'ADN. Però tothom la veu com una disciplina que només es treballa en els centres d'investigació degut a la seva complexitat i ha fet que es necessiti un equip d'alta tecnologia per analitzar mostres tan petites.

La realitat és que alguns equips usats en genètica no són tan complexos com aparenten, alguns només fan canvis de temperatura, d'altres només són un corrent elèctric i n'hi ha que només giren a la mateixa velocitat que un trepant.

Partint d'aquesta idea sorgeix aquest treball que vol demostrar que es poden fer experiments de genètica molecular a casa fabricant un mateix l'equip necessari amb materials reutilitzats. La qual cosa fa que el preu dels materials sigui més assequible que comprant l'aparell ja construït.

El tema se'm va ocórrer en veure una *TEDtalk* anomenada "Cómo convertirse en un biohacker" realitzada per Núria Conde, una *biohacker* que es construïa els seus propis aparells de laboratori i que, juntament amb altres persones, va formar una empresa anomenada *DIYBIO* especialitzada en fer aparells de laboratori amb materials reciclats.

Tots aquests termes com *biohacking* o *biohacker* semblen molt moderns, però la idea de fer aparells de laboratori a casa ha existit sempre, per exemple Marie Curie va construir una versió més petita de la màquina de rajos X dins d'un camió per poder fer radiografies als soldats.

Malgrat semblar una idea molt perillosa per la falta de control sobre els experiments realitzats la pròpia ONU ha dit que els pros de fer ciència a casa superen els contres que se li poden trobar.

2. Objectius del treball

El principal objectiu del treball és demostrar que es pot fer genètica a casa construint un laboratori amb l'equipament bàsic i un pressupost reduït.

A l'intentar acomplir aquest objectiu en sorgeixen de nous com la necessitat de reproduir els aparells propis d'un laboratori de genètica molecular i comparar els seus resultats amb els dels aparells convencionals. L'aparell escollit és un termociclador, que s'utilitza per amplificar la quantitat d'ADN.

Termociclador. FONT: www.fishersci.es

Un altre dels objectius és explicar i donar a conèixer el concepte de *biohacking*, mostrar els beneficis que pot aportar i com evitar els riscs al no controlar que fa cada *biohacker*.

Per últim també es vol entendre millor algun dels procediments habituals en laboratoris de recerca, com la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) o l'electroforesi.

3. La genètica pel treball

Per tal de poder entendre el contingut del treball és necessari tenir uns coneixements bàsics sobre certs aspectes de la genètica molecular com, per exemple, què és l'ADN i què el forma o què són les dissolucions tampó. És per aquest motiu que aquest punt explica aquests coneixements necessaris per entendre el treball.

3.1 Els nucleòtids

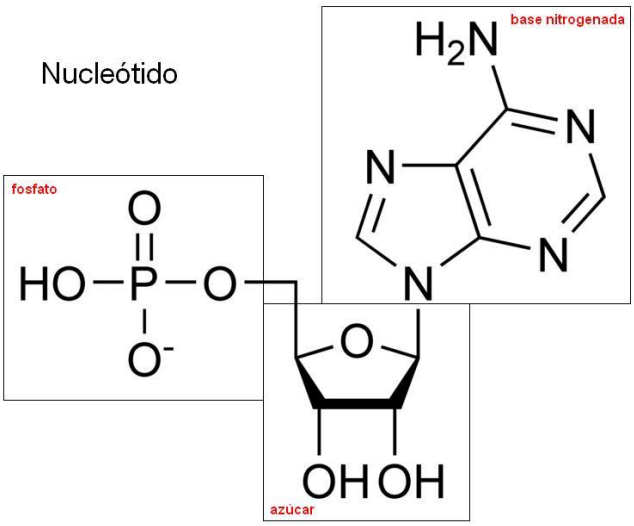
Els nucleòtids són la unitat d'estructura bàsica dels àcids nucleics (biomolècula orgànica). Cada nucleòtid està format per una molècula d'àcid fosfòric (H_3PO_4) i per un nucleòsid units mitjançant un enllaç fosoèster.

Per altra banda, un nucleòsid està format per la unió d'una pentosa i una base nitrogenada per un enllaç N-glucosídic.

Una pentosa és un glúcid (biomolècula orgànica formada per carboni, hidrogen i oxigen en proporció $C_nH_{2n}O_n$,) monosacàrid (glúcid d'una sola cadena de carbonis formada per entre 3 i 7 carbonis) format per la unió de 5 carbonis, la qual té forma cíclica per ser més estable.

Aquesta pentosa, en els nucleòsids, pot ser una ribosa (la qual donarà lloc al ribonucleòtid que forma l'ADN) o una desoxiribosa (la qual dona lloc al desoxiribonucleòtid que forma l'ARN), això depèn de si hi ha o no un oxigen en el segon carboni de la pentosa, si falta aquest oxigen es tracta d'una 2-desoxiribosa, normalment anomenada desoxiribosa.

Una base nitrogenada és un compost químic format per oxigen, carboni, hidrogen i nitrogen que té un caràcter bàsic, és a dir, pot captar ions hidrogen (protons, H^+) gràcies al parell d'electrons lliures que té un nitrogen. Aquestes bases nitrogenades es poden classificar en dos tipus: en púriques, les quals estan formades per dos anells i són l'adenina (A) i la guanina (G); o pirimidíniques, les quals estan formades per un sol anell i són la citosina (C), la timina (T, pròpia de l'ADN) i l'uracil (U, propi de l'ARN). Les bases amb el mateix nombre d'anells es diferencien entre elles perquè tenen radicals diferents.



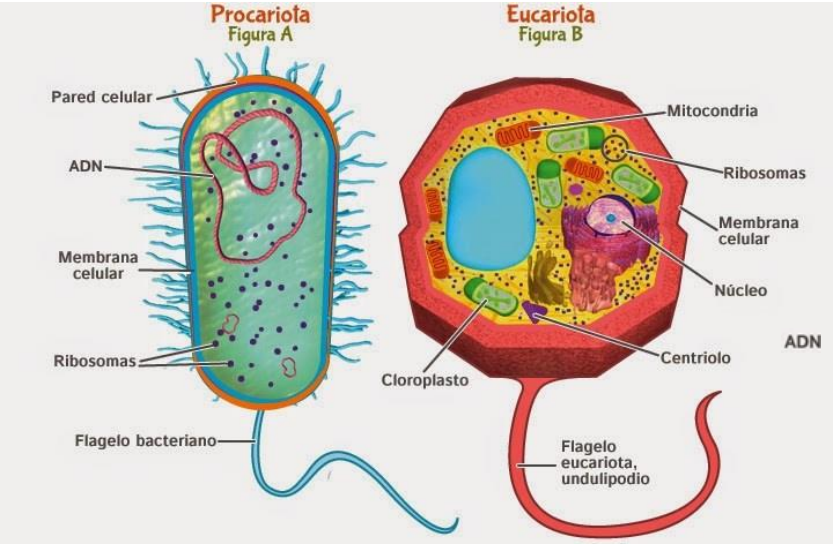
Estructura del nucleòtid. FONT: www.aprobarselectividad.com

Els nucleòtids habitualment es troben formant àcids nucleics, però també es poden trobar en estat lliure on fent altres funcions com el transport d'energia (adenosinatrifosfat, ATP), l'amplificació del senyal de les hormones (monofosfat d'adenosina, AMP cíclic) o intervenint en les reaccions d'oxidació-reducció (nicotinamida adenina dinucleòtid, NAD).

3.2 L'ADN

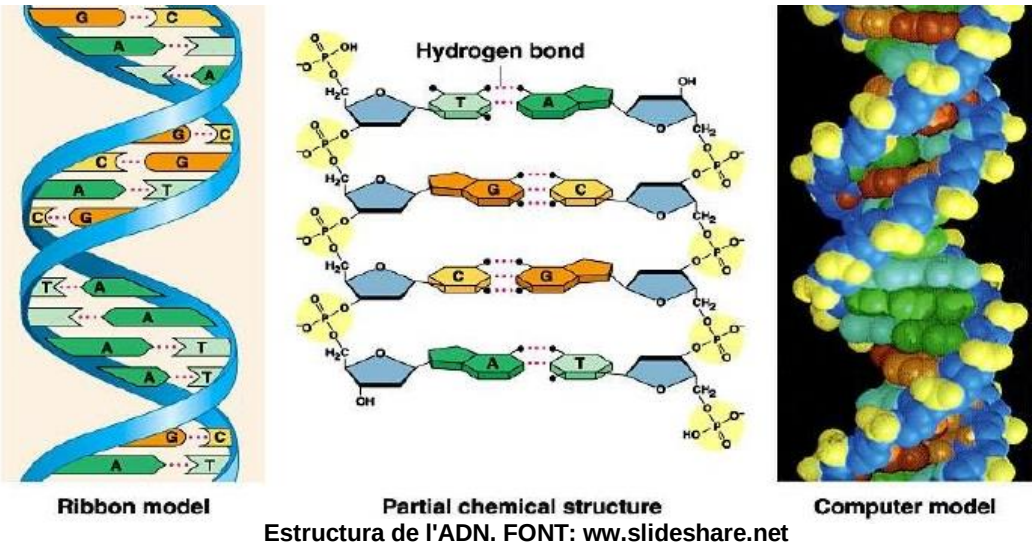
L'àcid desoxiribonucleic (ADN o *DNA*) és una molècula que emmagatzema la informació biològica que necessita un organisme per poder viure i que al duplicar-se l'hereta les noves cèl·lules.

L'ADN es troba dins de les cèl·lules, bacteris i en alguns virus (els retrovirus). Depenent del tipus de cèl·lula l'ADN es localitza en llocs diferents, en el cas de ser una cèl·lula procariota (més simple) al no tindre embolcall nuclear l'ADN es troba lliure pel citoplasma (espai interior de la membrana cel·lular on es troben els orgànuls cel·lulars), però si es tracta d'una cèl·lula eucariota la major part de l'ADN es troba dins d'aquest embolcall nuclear (membrana dins del citoplasma que separa l'ADN de la resta d'orgànuls). Cal remarcar que una part de l'ADN es troba dins d'alguns orgànuls transductors d'energia com són els mitocondris i els cloroplasts.



Estructura cèl·lules eucariota i procariota. FONT: www.cuadroscomparativos.com

Segons el model de la doble hèlix de Watson i Crick, l'ADN està format per dues cadenes llargues (ADN bicatenari) de desoxiribonucleòtids (amb bases nitrogenades d'adenina, timina, guanina i citosina), sintetitzades de 5' a 3'. Aquestes cadenes tenen les bases nitrogenades cap a l'interior i les pentoses i els grups fosfat a l'exterior perquè es poden ionitzar. Les dues cadenes són complementaries perquè les bases nitrogenades d'adenina i timina es complementen com ho fan les de guanina i citosina. Es diu que són plectonímiques perquè cal desenrotllar-les per separar-les. A més a més l'ADN és dextrogirat perquè gira cap a la dreta a mesura que avança.



Estructura de l'ADN. FONT: ww.slideshare.net

Abans de formar una doble hèlix l'ADN té una estructura primària on només hi ha la seqüència de nucleòtids, més endavant forma l'estructura de doble hèlix, però habitualment es troba a la cèl·lula en forma de cromosoma (ADN molt condensat).

Cal recordar que no tot l'ADN és bicatenari, l'ADN d'alguns éssers vius és monocatenari i per tant només tenen una cadena.

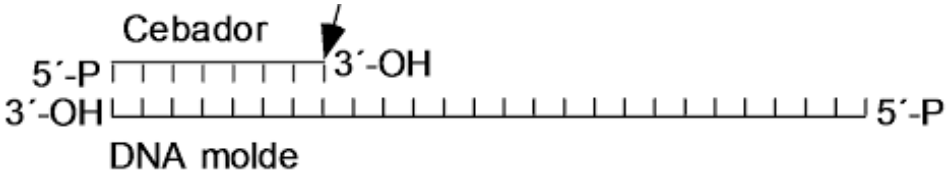
L'ADN es pot desnaturalitzar, és a dir, perdre la seva estructura secundària (desenrotllar-se) a l'assolir els 100ºC aproximadament perquè es trenquen els ponts d'hidrogen que formen les bases nitrogenades entre si per mantenir la forma de doble hèlix, també es pot desnaturalitzar per altres factors com el pH.

Però es pot renaturalitzar si la temperatura baixa a 65ºC i llavors els ponts d'hidrogen es tornen a formar i es recupera l'estructura habitual.

3.3 Els oligonucleòtids

Els oligonucleòtids són seqüències molt petites d'ADN o d'ARN, de menys de cinquanta parells de bases. Tenen diversos usos com la detecció d'un gen, el que es fa és afegir l'oligonucleòtid a un ADN desnaturalitzat, si hi ha el gen que complementa l'oligonucleòtid aquest s'adherirà a l'ADN.

L'ús més comú és fer-los servir com a encebadors (*primers*) per duplicar cadenes, on es fa servir l'oligonucleòtid per marcar des d'on cal duplicar l'ADN, degut a que les ADN polimerases que es fan servir necessiten un fragment de cadena des d'on afegir-hi els nucleòtids.

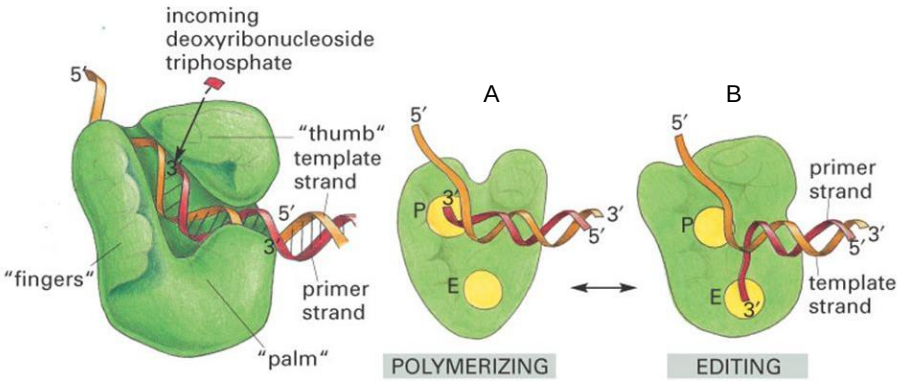


Oligonucleòtid fent d'encebador. FONT: www.umh1163.es

3.4 L'ADN polimerasa

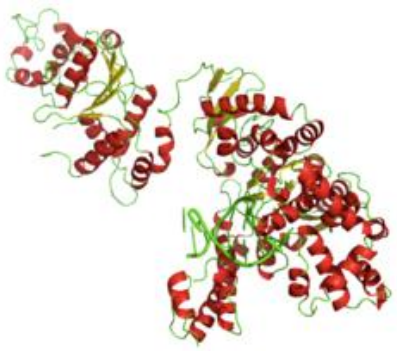
L'ADN polimerasa (ADN pol) és un enzim que catalitza la síntesi de la nova cadena d'ADN durant la replicació de l'ADN. La seva principal funció és emparellar nucleòtids per l'extrem 3' a la cadena motlle per crear-ne una de complementària, a part, també ajuda a la reparació d'ADN.

Hi ha molts tipus d'ADN polimerasa segons el tipus de cèl·lula de la que s'extreu i això determina si participarà en la replicació o en la reparació. Per exemple les ADN polimerases extretes de cèl·lules procariotes es classifiquen en ADN pol I, ADN pol II i ADN pol III; la pol II només intervé en la replicació, en canvi, les altres participen en ambdós processos.



ADN polimerasa replicant (A) i reparant (B). FONT: slideplayer.es

La primera ADN polimerasa que es va conèixer va ser l'ADN *pol I* de *Escherichia coli* la qual es va fer servir molt en processos com la PCR (reacció en cadena de la polimerasa) per duplicar fragments d'ADN, però al necessitar altes temperatures per poder desnaturalitzar les cadenes per duplicar el fragment, la polimerasa deixava de funcionar i se n'havia d'introduir de nova cada cicle. Per sort més endavant es van descobrir noves polimerases com la *Taq polimerasa* la qual s'extreu de *Thermus aquaticus* i que sí que resisteix a les altes temperatures utilitzades en la tècnica de la PCR. N'hi ha d'altres com la *Puf polimerasa* la qual s'extreu del *Pyrococcus furiosus* i, a part de resistir les altes temperatures, és capaç de corregir el nucleòtids que ha col·locat malament perquè té activitat exonucleasa 3' a 5'.

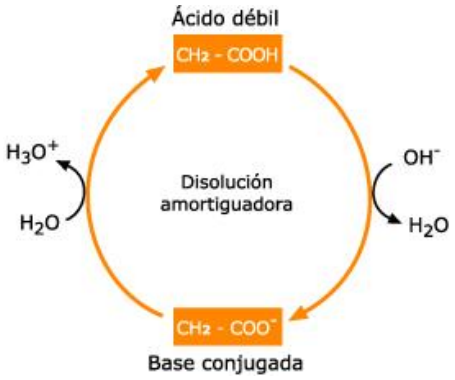


Estructura Taq polimerasa. FONT: www.viquipèdia.org

3.5 La dissolució tampó

La dissolució tampó o amortidora és una dissolució amb una variació pràcticament nul·la del pH (quantitat de basicitat o acidesa d'una dissolució, ve determinada per la quantitat de protons) ja que està composta per un àcid o base feble i la sal corresponent els quals fan de donants i receptors dels protons.

Les dissolucions tampó són molt importants perquè en alguns processos bioquímics un canvi en el pH pot alterar l'activitat habitual d'algun component i fer que doni un resultat erroni, per exemple pot provocar alteracions en algunes polimerases com la *Taq polimerasa* i això fa que deixi de funcionar.



Esquema dissolució tampó. FONT: www.educa.madrid.org

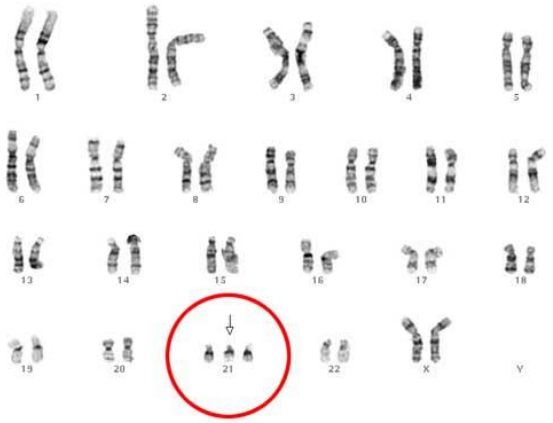
4. Els laboratoris de genètica

4.1 Què són?

Un laboratori de genètica és un espai equipat amb els aparells i utensilis necessaris per poder realitzar anàlisis i experiments amb material genètic o proteïnes entre altres.

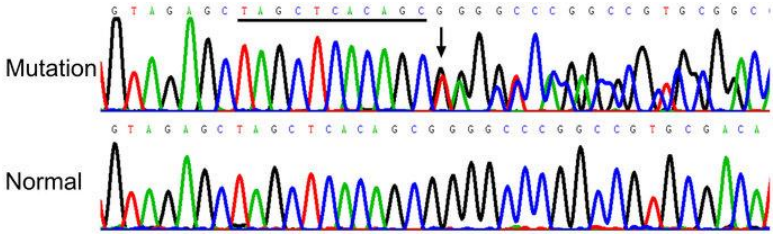
Existeixen principalment dos tipus de laboratoris de genètica: els de citogenètica i els de genètica molecular.

En els laboratoris de citogenètica el que s'estudia principalment són els cromosomes. Es mira el nombre de cromosomes, la seva estructura i així es pot saber si hi ha un excés o una falta de material genètic. Aquestes anàlisis són lentes degut a que s'han de cultivar i tenyir les cèl·lules i cal mirar cada cromosoma de manera individual per observar les seves característiques.



Cariotip amb síndrome de Down (excés cromosomes). FONT: www.ciencia.ara.cat

Els laboratoris de genètica molecular es centren més en estudiar els gens, en mirar si hi ha alteracions en les bases nitrogenades que afectin la informació del gen. El genetista ha de mirar la seqüència de les bases nitrogenades i mirar quines alteracions hi ha i quin efecte tenen. El problema és que l'ADN no es pot veure amb un microscopi com els cromosomes, per això el genetista ha d'extreure l'ADN de la cèl·lula i, després d'un seguit de reaccions químiques, pot llegir el fragment de gen d'interès.



Comparació de dues seqüenciacions genètiques. FONT: www.rarecommons.org

Els exemples de proves més típiques de genètica són les proves de maternitat i paternitat, el diagnòstic prenatal o les anàlisis forenses.

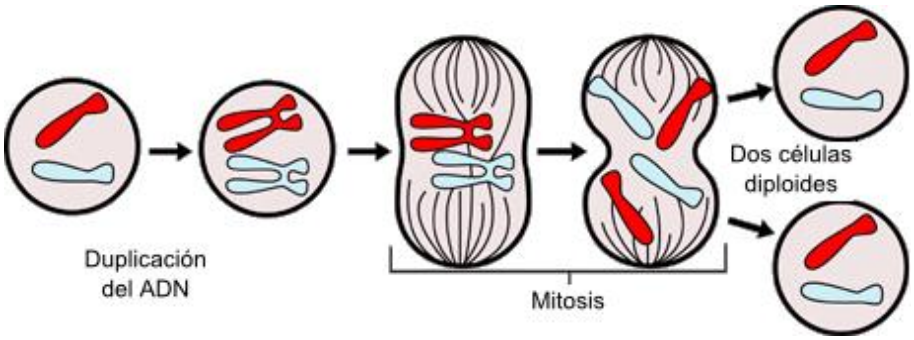
4.2 Procediments

En genètica, com en totes les disciplines científiques, es segueixen uns procediments per tal de poder fer les extraccions de material genètic i multiplicar-lo per tal de poder analitzar-lo amb més facilitat.

4.2.1 PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reacction*, PCR), descoberta pel bioquímic Kary Banks Mullis el 1983, és un procés d'amplificació d'ADN que, a diferència de la clonació, es pot fer a partir d'una mostra molt reduïda d'ADN. Tot i això la PCR no substitueix el procés de clonació sinó que són processos complementaris.

La base del procés de la PCR és molt senzill, la idea és recrear *in vitro* (fora de l'organisme) el procés de duplicació d'ADN que fan les cèl·lules. Per fer això cal posar els fragments d'ADN que es volen copiar en un medi idoni amb els reactius necessaris i fer variar la temperatura d'aquest medi perquè l'ADN canviï la seva estructura. Per poder fer els canvis de temperatura automàticament es va crear el termociclador, un aparell que varia la temperatura per tal de fer la PCR més pràctica.



Esquema duplicació cel·lular. FONT: www.viquipèdia.org

Per crear aquest medi idoni per l'amplificació d'ADN són necessaris els següents elements:

-ADN motlle: l'ADN que es vol amplificar durant la PCR, pot ser monocatenari o bicatenari, lineal o circular (aquest té alguna dificultat afegida).

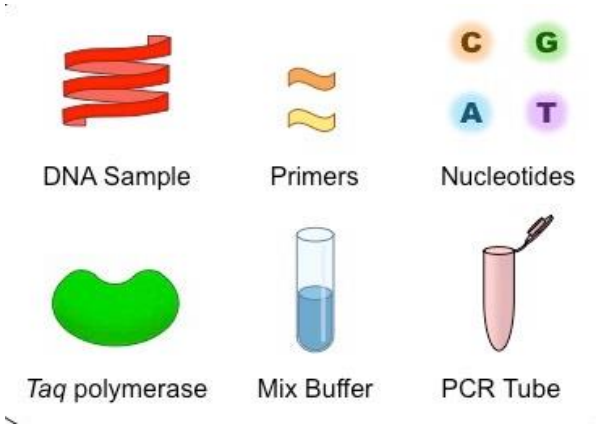
-Els encebadors o *primers*: són oligonucleòtids que complementen una regió especifica de l'ADN motlle des d'on es començarà la duplicació.

-ADN polimerasa: l'enzim que emparella els nucleòtids complementaris als de l'ADN motlle a la nova cadena. Habitualment s'utilitza la *Taq pol*.

-Desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs): cal introduir una barreja amb els quatre tipus dATP (adenina), dGTP (guanina), dCTP (citocina), dTTP (timina) que són els substrats que necessita l'ADN polimerasa per l'extensió les cadenes d'ADN.

-Solució amortidora: una solució tampó que permet mantenir el pH òptim durant tot el procés. Normalment contenen Tris-HCl (àcid clorhídric amb trometamol) que fan la funció amortidora.

-Clorur de magnesi ($MgCl_2$): el magnesi és molt important en aquest medi perquè permet accelerar la productivitat de l'ADN polimerasa. Però és molt important tenir-ne la quantitat justa, perquè un excés farà que l'ADN polimerasa no col·loqui els dNTPs que corresponen i molt poc magnesi fa que l'ADN polimerasa no actuï i la cadena no es dupliqui.



Alguns dels reactius necessaris per la PCR. FONT: www.bioninja.com

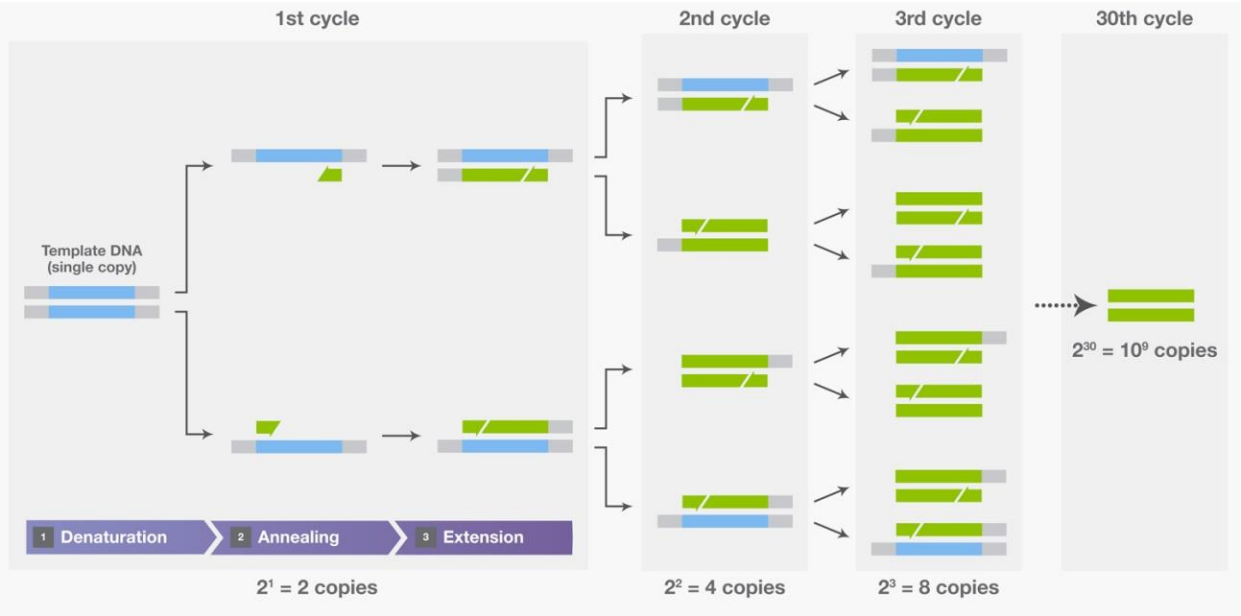
Per poder dur a terme la reacció cal fer un seguit de cicles de temperatura perquè els ADN es naturalitzi i renaturalitzi. Per amplificar l'ADN s'acostumen a fer uns 35 d'aquests cicles, perquè s'amplifica de forma 2^n (sent n el nombre de cadenes d'ADN), té un creixement exponencial.

Cada cicle està format per tres fases i a cada fase li correspon una temperatura diferent:

-Desnaturalització: la temperatura s'eleva a uns 95ºC així l'ADN es desnaturalitza per l'elevada temperatura i se separen les dues cadenes.

-Alineament: la temperatura baixa a 45-65ºC, això permet que els encebadors s'uneixin mitjançant ponts d'hidrogen a les regions complementàries de l'ADN motlle formant petites regions amb ADN bicatenari. Com que hi ha un excés d'encebadors a la dissolució no hi ha risc que la cadena original es renaturalitzi.

-Extensió: la temperatura augmenta fins als 72ºC (temperatura òptima pel màxim funcionament de la *Taq pol*), l'ADN polimerasa s'uneix als fragments bicatenaris, formats per l'ADN motlle i l'encebador, i catalitza l'extensió de les cadenes des de l'extrem 5' on es troba l'encebador fins l'extrem 3' on s'acaba l'ADN motlle.



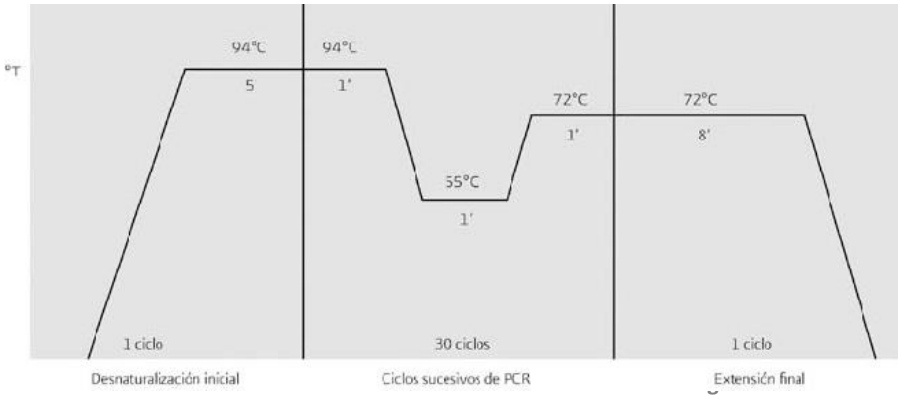
Esquema PCR; desnaturalització (1), elongació (2), extensió (3). FONT: www.thermofisher.com

A part d'aquestes tres fases que es repeteixen al llarg dels 35 cicles n'hi ha algunes que només es fan una vegada:

-Inicialització (*Hot Start*): s'utilitza en el cas de fer servir una ADN polimerasa *Hot Start*, és una polimerasa modificada de tal forma que només s'activa a l'arribar a elevades temperatures com els 95ºC, així no tenen lloc amplificacions no desitjades que fa la polimerasa abans d'arribar als 95ºC durant la primera desnaturalització. Per fer això només cal afegir una fase abans de la primera desnaturalització que consisteix en apujar la temperatura a 95ºC i mantenir-la 10 minuts, llavors aquesta polimerasa modificada s'activa i ja pot fer la resta de cicles amb normalitat sense haver causat problemes durant l'inici.

-Elongació final: és una fase que es fa al final de l'últim cicle que consisteix en mantindre la temperatura entre 70-74ºC durant uns 5-15 minuts per assegurar-se que tots els fragments d'ADN han estat del tot amplificats.

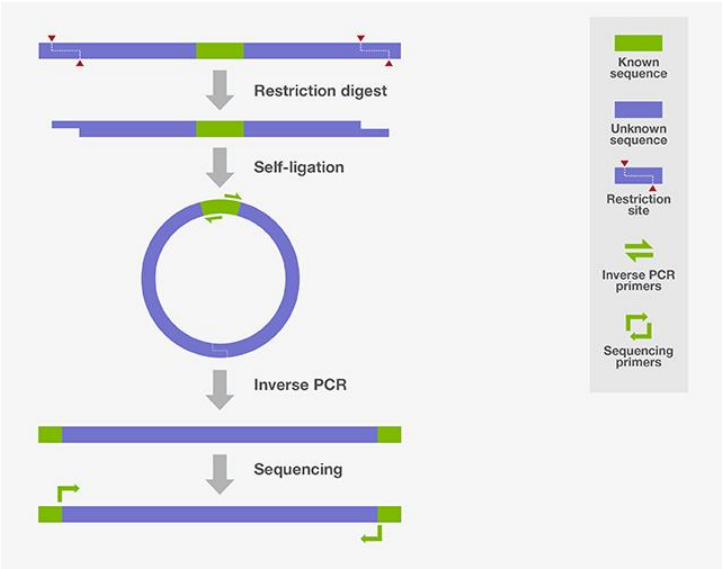
-Conservació: és una fase de temps il·limitat que consisteix en abaixar la temperatura entre 4-15ºC per tal de conservar les mostres un curt període de temps.



Esquema de les temperatures de la PCR. FONT: www.researchgate.net

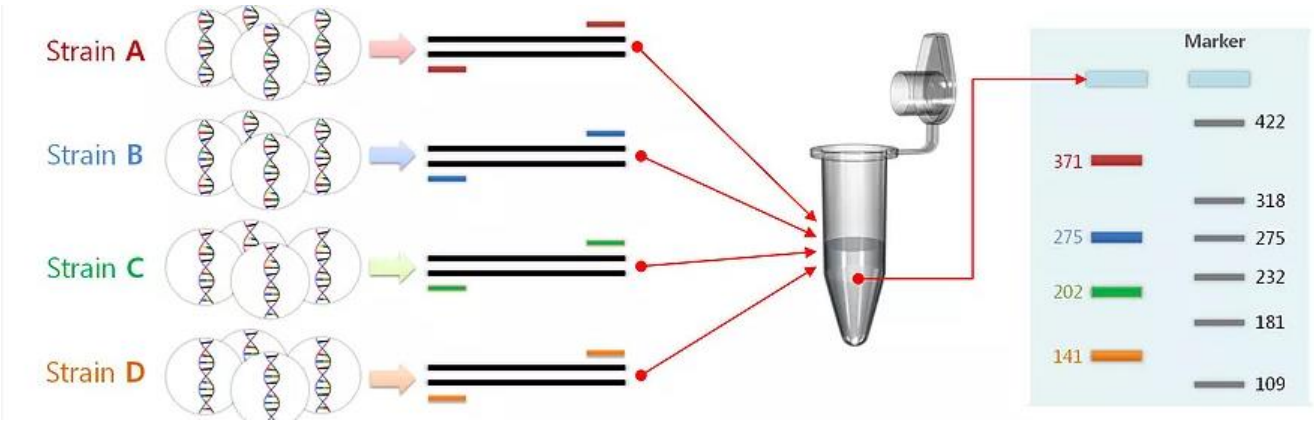
Com que la PCR és una tècnica cada vegada més utilitzada s'han fet diverses versions, derivades de l'original, que ens permeten duplicar altres regions d'ADN:

-PCR inversa: és una PCR utilitzada per amplificar regions desconegudes a partir d'una coneguda, per això es posen encebadors complementaris a la regió coneguda, però que actuen de 3' a 5'.



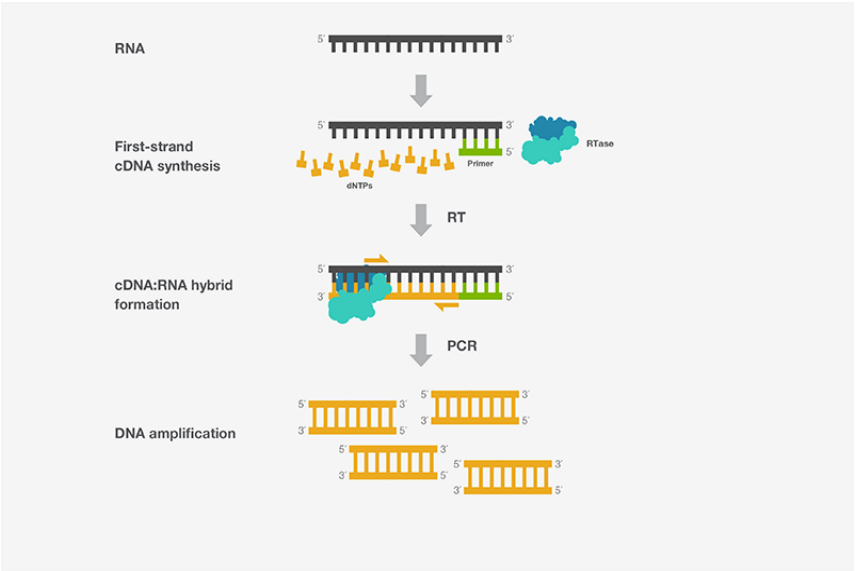
Esquema PCR inversa. FONT: www.thermoficher.com

-PCR múltiple: s'utilitza per amplificar simultàniament més d'una cadena en una sola reacció. Per fer-la cal tenir en compte que s'han de fer les parelles de encebadors per a cada fragment de forma que no s'assemblin gaire per evitar errors i que tinguin, més o menys, la mateixa temperatura d'hibridació per tindre la mateixa eficàcia.



Esquema PCR múltiple. FONT: www.mgmed.com

-La RT-PCR: en aquesta PCR es vol amplificar un fragment d'ARN per això és necessari fer un pas previ i utilitzar una transcriptasa inversa (conjunt d'enzims catalitzadors) per convertir l'ARN en cADN (ADN complementari).



Esquema RT-PCR. FONT: www.thermofisher.com

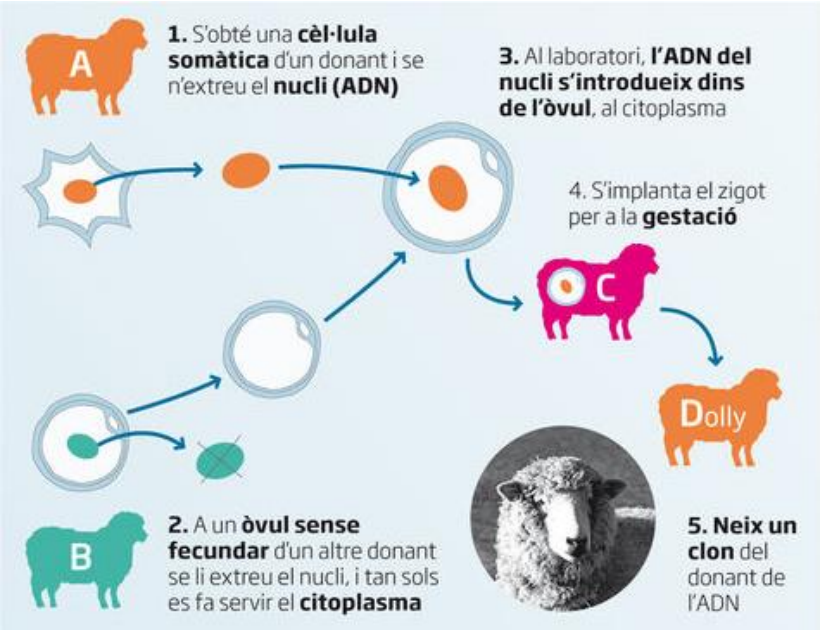
-PCR en temps real o PCR quantitativa (qPCR): aquesta versió de la PCR ens permet quantificar durant la reacció la quantitat d'ADN producte de la reacció. Per això s'introdueixen uns fluorocroms (components que donen fluorescència a les molècules) que desprenen fluorescència cada cop que es fa una copia. Els aparells que fan la qPCR ja incorporen un lector de fluorescència per mesurar en tot moment la quantitat d'ADN que hi ha. Amb aquesta tècnica s'evita fer una electroforesi al final per quantificar l'ADN.

Termociclador especial per qPCR. FONT: uv.es

4.2.2 Clonació

La clonació és la tècnica que s'utilitza per obtindre un clon, és a dir, un organisme, cèl·lula o macromolècula idèntic a l'original. N'existeixen diversos tipus segons que es cloni:

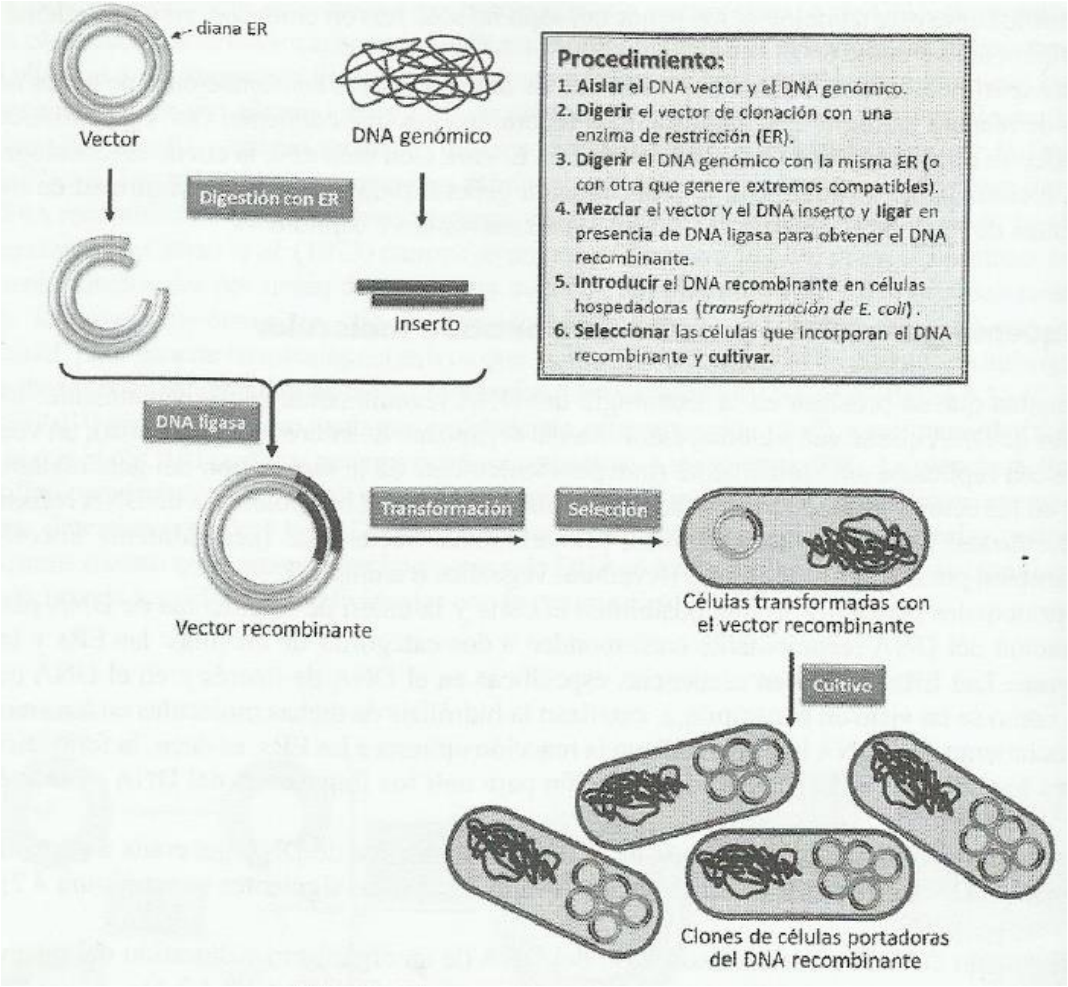
-Clonació d'organismes: el cas més conegut és el de l'ovella Dolly que va consistir en la clonació d'una ovella extraient el nucli d'una cèl·lula somàtica d'una ovella (ovella A) i desdiferènciant-lo (fer "oblidar" quin tipus de cèl·lula era) perquè pugui donar lloc a tots els tipus de cèl·lules. Aquest nucli s'introdueix en un òvul (ovella B) amb el seu nucli prèviament extret, aquest nou òvul s'implanta en una ovella (ovella C) perquè el gesti. I neix un nou organisme clònic a la primera ovella (ovella A). Aquest tipus de clonació genera molts problemes ètics pel fet de crear organismes iguals.



Esquema clonació de l'ovella Dolly. FONT: www.racocatala.cat

-Clonació cel·lular: la idea d'aquet tipus és generar un grup de cèl·lules a partir d'una sola cèl·lula. Això és senzill si es fa amb organismes unicel·lulars ja que simplement cal posar la cèl·lula en un medi adequat perquè es multipliqui. Quan es tracta de cèl·lules d'organismes pluricel·lulars ja costa més perquè requereixen un medi molt més específic amb unes condicions més exigents.

-Clonació molecular: s'utilitza per obtenir múltiples còpies d'un fragment d'ADN, per fer-ho s'utilitza un procés bastant complex. Primer de tot s'extreu el fragment d'ADN que es vol clonar de l'organisme (AND de interès). Per altra banda s'utilitza un plasmidi (fragment circular d'ADN) que fa de vector (transporta l'ADN que es vol clonar), per això cal digerir un fragment del plasmidi amb un enzim de restricció i digerir els extrems de l'ADN d'interès amb el mateix enzim per tal que encaixin. Un cop digerits es lliguen el vector i l'ADN de interès per donar lloc a l'ADN recombinant, el qual s'introdueix dins de cèl·lules que es cultiven perquè es multipliquin i se seleccionen les cèl·lules que porten l'ADN recombinant per extreure'l.



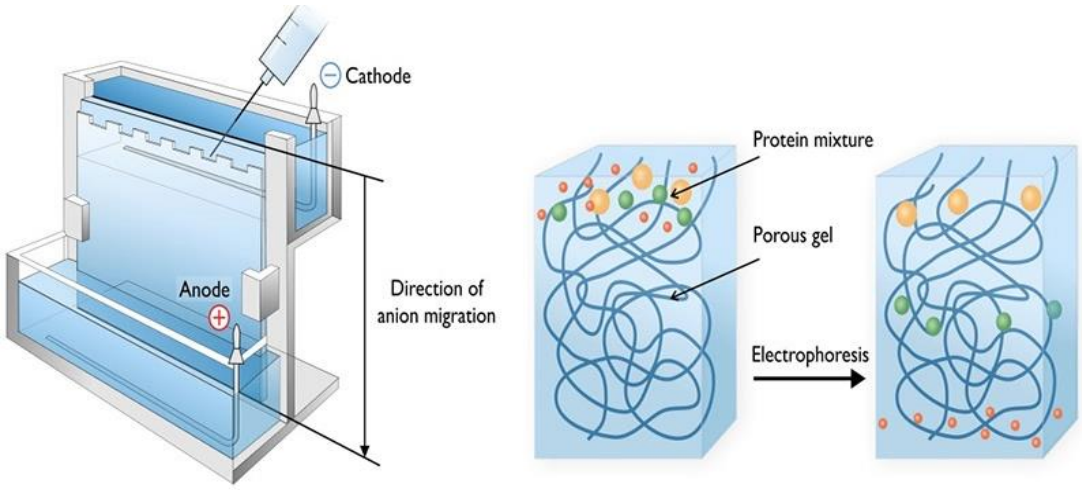
Esquema clonació d'ADN. FONT: Técnicas de ingeniería genética

4.2.3 Electroforesi

L'electroforesi és un procediment que consisteix en la separació de molècules de diferents característiques (mida, càrrega...) basant-se en el diferent grau de retenció que exerceix un medi fix sobre elles quan són sota l'acció d'un camp elèctric.

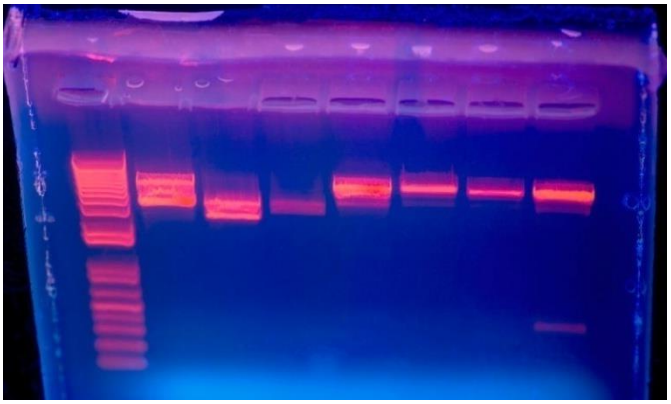
El medi fix acostuma a ser un gel, ja sigui acrilamida per separar proteïnes i àcids nucleics amb pocs parells de bases o s'utilitzi agarosa per separar àcids nucleics amb molts parells de bases. El gel forma un sòlid porós que permetrà el pas de les molècules.

En l'electroforesi la força electromotriu empeny les molècules a través del gel perquè, en aplicar una corrent a través del gel, les molècules es desplacen pel gel per arribar a l'elèctrode contrari (van de l'ànode al càtode o del càtode a l'ànode) i a l'anar per un medi porós les més petites són les que arribaran més lluny. Com que l'ADN i l'ARN estan carregats negativament sempre van del càtode (negatiu) a l'ànode (posititu).



Esquema funcionament de l'electroforesi. FONT: www.microbenotes.com

A l'acabar l'electroforesi les molècules més petites ja es troben més a prop de l'elèctrode contrari, però no són visibles a l'ull humà, és per això que es tenyeixen utilitzant bromur d'etidi el qual es fa visible a l'exposar el gel a llum ultraviolada, també es pot tenyir fent servir plata o blau de Coomassie.

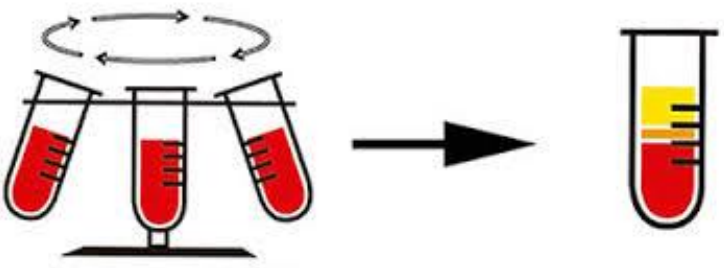


Resultat d'una electroforesi vist amb llum ultraviolada. FONT: www.pixels.com

4.2.4 Centrifugació

La centrifugació és una tècnica molt utilitzada en els laboratoris que consisteix en la separació de líquids i sòlids mitjançant el moviment rotatiu de les partícules impulsades per la força centrífuga (força que separa la partícula de l'eix de rotació) i a l'estar, les partícules, sotmeses a molta acceleració precipiten.

La força centrífuga ens permet accelerar aquesta separació, si només s'apliqués la força de gravetat es tardaria molt més en separar el sòlid, perquè l'acceleració que es pot fer amb la força centrífuga és molt major als 9,8 m/s^2 de la gravetat.



Esquema centrifugació. FONT: www.gocoqr.com

Hi ha dos tipus de centrifugació, la preparativa i l'analítica. En la preparativa es volen obtenir grans quantitats del material que es vol estudiar i en l'analítica es fa un anàlisi de les macromolècules fent una ultracentrifugació (centrifugació a

velocitats molt altes, 500.000 vegades més que la gravetat, que es fa al buit per evitar la fricció).

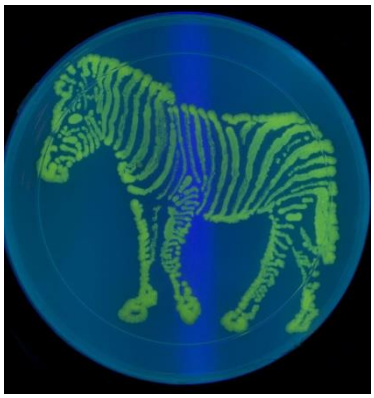
5. El *Biohacking*

5.1 Què és?

El *biohacking*, *biopunk*, biologia DIY o biologia de garatge és la pràctica resultant de la curiositat científica dels *biohackers*. Un *biohacker* és aquella persona que desenvolupa projectes de biotecnologia, bioquímica o genètica sense que necessàriament hagi de formar part d'una universitat, centre de recerca o de la indústria de les biociències.

L'objectiu del *biohaking* és fer la biologia accessible per a tothom i treure-la dels laboratoris convencionals, per fer això els *biohackers* tornen a dissenyar els aparells de laboratori per tal de poder-los fer a casa amb un cost molt menor.

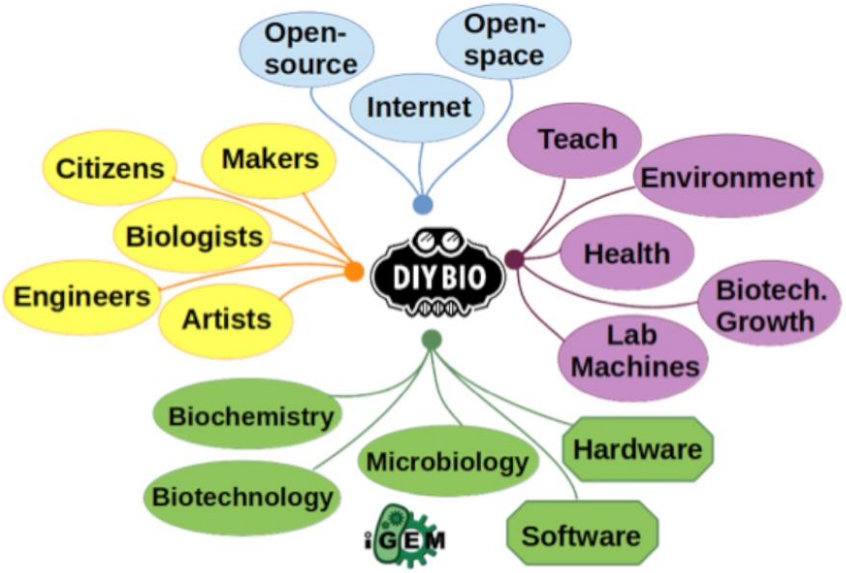
Partint d'aquesta base neix una comunitat mundial de *biohackers* formada per tot tipus de persones, els anomenats *makers* (persones que els agrada construir aparells), biòlegs, bioquímics, enginyers o gent que no tenen estudis científics però que tenen el *biohacking* com una afició. Fins i tot en formen part les persones que fan *bioart*, gent que fa art mitjançant tècniques de biotecnologia, per exemple utilitzant bacteris fluorescents per fer dibuixos.



Dibuix fet amb bacteris fluorescents, bioart. FONT: www.hangar.com

Una de les claus perquè la biologia DIY funcioni i arribi a tothom és la idea de l'*Open Source* (codi obert) que defensa que tot el que un *biohaker* dissenyi cal penjar-ho a Internet perquè la resta de la comunitat ho pugui utilitzar, revisar i,

si fos possible, millorar. Això permet que la comunitat avanci molt més ràpid i es puguin fer nous descobriments que ajudin a tothom.



Que forma la comunitat DIY BIO. FONT: Cómo convertirse en un biohacker (Youtube)

Amb l'augment de la comunitat neixen els laboratoris comunitaris arreu del món on es poden realitzar experiments en grups i també sorgeix la institució *DIY BIO*, que vetlla perquè la comunitat creixi i sigui èticament correcta. Alguns d'aquests laboratoris comunitaris son:

-*Counter Culture Labs*, Estats Units: modifiquen un microorganisme per tal de fer insulina a casa i no haver-la de comprar degut al seu elevat cost.

-*BIO Curious*, Estats Units: fan formatge vegà extraient el gen de la lactosa de la vaca i multiplicant-lo en bacteris.

-*La Paillasse*, França: dissenyen nous colorants per microorganismes.

-*Gaudi Labs*, Suïssa: creen aparells de laboratori per vendre'ls a bon preu i pengen com construir-los a Internet.

-*DIYbio Barcelona*, Espanya: era un grup de biohackers de Barcelona els quals tenien un petit laboratori comunitari on impartien classes de *biohacking* i feien experiments. Actualment ja no estan junts.

-*DIYbio Madrid,* Espanya: són un conjunt de laboratoris comunitaris especialitzats en diversos àmbits localitzats a Madrid on també imparteixen cursos de diversos àmbits del *biohacking*.

-*Hackteria*: és un web de *bioart* que va crear un *wiki* (web col·laboratiu que pot ser modificat pels usuaris) on els *biohackers* poden publicar els seus projectes, veure els dels altres i accedir a les seves plantilles, programes...

DIY BIO vetlla per una comunitat èticament correcta, és per això que hi ha escrits uns codis ètics europeus i uns de nord-americans per saber quins són els límits ètics al fer els experiments [Veure Annex 1], es pot accedir a aquests codis entrant a la pagina web de *DIY BIO*. Però en cas de llegir els codis i seguir tenint dubtes sobre si es pot o no es pot fer un experiment es van crear unes pàgines web per resoldre dubtes de bioètica on es pot preguntar abans de fer l'experiment per saber si és èticament correcte.

Logotip DIY BIO, les ulleres són símbols de seguretat. FONT: www.diybio.org

5.2 Orígens

El *biohacking* té el seus orígens a la primera dècada del segle XXI i s'origina a partir de la influència d'altres moviments com el *Do it yourself* (DIY) que promou la reconstrucció, reutilització i millora de productes fets a casa per tal de lluitar contra la producció industrial massiva. El moviment de la ciència ciutadana diu que tots els ciutadans poden col·laborar en totes les etapes del procés de recerca científica ja sigui plantejant problemes, en la captació de dades o en la seva interpretació i també s'influencia del moviment *hacker* que consisteix en compartir les idees per tal d'avançar més ràpid.

Degut a la influència d'aquest últim moviment es diu que el *biohackig* va néixer en els *hackerspaces*. A partir del 2005 és quan es van fer els primer experiments de biotecnologia fora dels laboratoris als Estats Units. Però no va ser fins el 2008 que es va convertir en un moviment internacional i actualment hi ha més de 21 països amb laboratoris de biologia DIY.

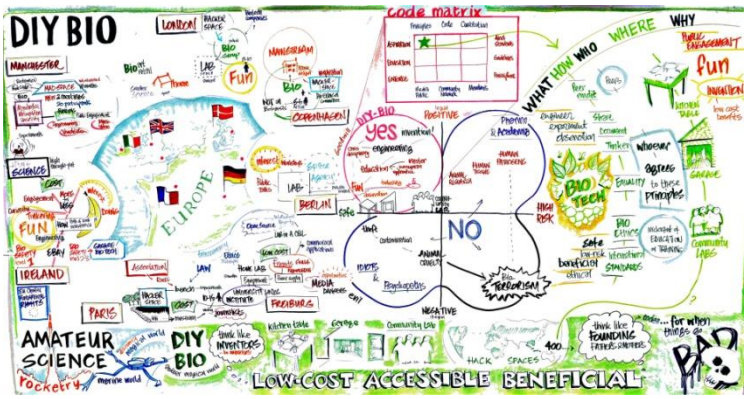
Hackerspace situat a Tokyo. FONT: www.fastcompany.com

A part d'aquests inicis de grups de persones també cal recordar que hi ha persones que van començar en el món del *biohacking* per necessitat. Un dels exemples seria el de Kay Aull, el pare de la qual tenia una malaltia a la sang degut a un problema al metabolisme amb el ferro que li provocava problemes amb els glòbuls vermells, el tractament per a la malaltia als Estats Units era molt car per aquest motiu ella va construir un petit laboratori a l'armari de casa seva i així va poder fabricar ella mateixa la cura pel pare. Altres persones a Estats Units van començar als garatges de casa seva. D'aquí prové el nom de biologia de garatge.

Kay Aull amb el seu laboratori a l'armari. FONT: www.biotechfacts.com

En la comunitat *biohacker* és molt important Mederith Patterson una lingüista i periodista de professió que es va involucrar molt en el moviment *biohacker*. Ella va modificar genèticament uns bacteris perquè brillessin amb la presència de melamina, una substància tòxica pels humans si s'ingeria, i va poder salvar moltes vides detectant on es trobava aquesta substància. A més ella va escriure el manifest *biopunk* on defensa el moviment i explica la seva importància per a la societat [Veure Annex 2].

Però amb l'expansió del moviment la gent es va començar a preocupar pels possibles experiments perillosos que els *biohackers* farien a casa per la falta de control de les autoritats, la gent temia que els *biohackers* fessin bioterrorisme. Davant d'aquesta situació els països es van reunir i el 2011 van fer un congrés per elaborar un codi ètic de la biologia *DIY* a Londres, un per Europa i un altre per Amèrica del Nord.



Mural fet després del congrés de Londres. FONT: www.diybio.org

Més endavant, els Estats Units i la ONU van afirmar que tots els beneficis que ens pot aportar el *biohacking* són molt més importants que el risc de no controlar a tothom i que el més important és informar dels límits ètics als *biohackers*.

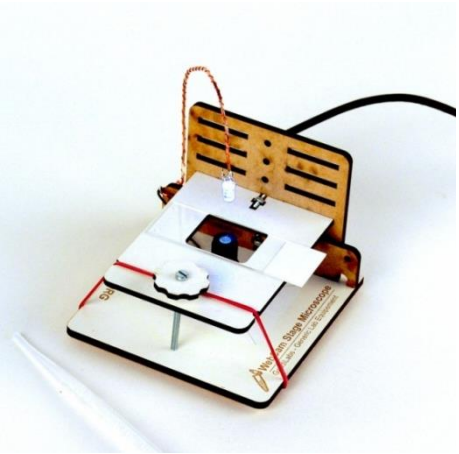
5.3 Aparells

Quan es parla de *biohacking* un dels dubtes que apareix és saber com es fa biologia a casa i d'on es treuen aquests aparells que habitualment costen tants diners?

Per resoldre aquest dubte cal recordar que la comunitat *biohacker* és *Open Source* i que en forma part gent amb tot tipus d'oficis i coneixements. Hi ha uns tipus de *biohackers*, anomenats *makers*, que pels seus coneixements dissenyen els aparells, per tal de fer-los amb materials més accessibles, i ho pengen a la *wiki* de *Hackteria*.

Per exemple, aquests són els aparells d'un laboratori de genètica molecular DIY segons *Gaudi Labs*:

-Microscopi: la finalitat del microscopi és poder veure mostres que amb l'ull humà no es poden veure, per fer això el microscopi compta amb un joc de lents que augmenten la imatge. Per fer això de forma DIY només és necessari girar la lent d'una *webcam*, perquè augmenti la imatge, fer una font de llum blanca amb un led per tindre més nitidesa i un cop es connecta la *webcam* a l'ordinador ja es pot veure la mostra augmentada.



Microscopi DIY. FONT: www.gaudi.ch

-Centrifugadora: l'objectiu d'aquest aparell és girar a molta velocitat per tal de separar les molècules per pes. La seva versió DIY té 2 variants, la primera consisteix en imprimir una peça ja dissenyada en una impressora 3D, col·locar-la en un trepant i fer-la girar. La segona idea consisteix en aprofitar la gran velocitat a la que gira un disc dur, posant la peça impresa amb la impressora 3D al mig del disc i fer-lo girar.

Centrifugadora DIY. FONT: wwww.gaudi.ch

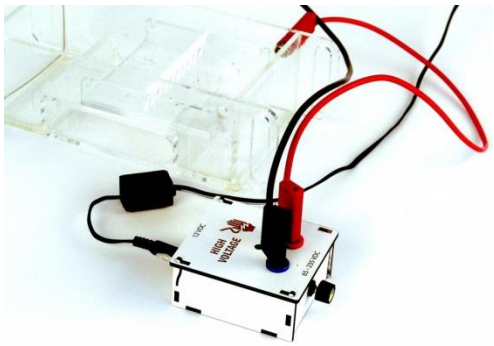
-Incubadora: és un lloc d'emmagatzematge aïllat que s'utilitza per cultivar bacteris, la incubadora manté la temperatura òptima pels bacteris. Per fer-la a casa és necessari una capsa de poliestirè expandit ja que no condueix la calor i farà d'aïllant i un sistema per escalfar i refredar fet amb un element calefactor (una bombeta) i un ventilador.

Incubadora DIY. FONT: www.askix.com

-Termociclador: com he mencionat anteriorment, és l'aparell permet realitzar la PCR fent canvis de temperatura automàtics. Per fer-lo cal un sistema per fer el canvi de temperatura (calefactor i un ventilador), unes plaques d'alumini per transmetre la calor i un sistema electrònic perquè es realitzin els canvis de temperatura.

Termociclador DIY. FONT: www.hackteria.org

-Aparell d'electroforesi: en l'electroforesi cal passar corrent elèctric per un gel porós d'agarosa per tal de separar per mida les molècules. Per fer l'aparell a casa cal fer una petita capsa on es posa el gel d'agarosa i fer passar un cable per dins la capsa que portarà el corrent elèctric.

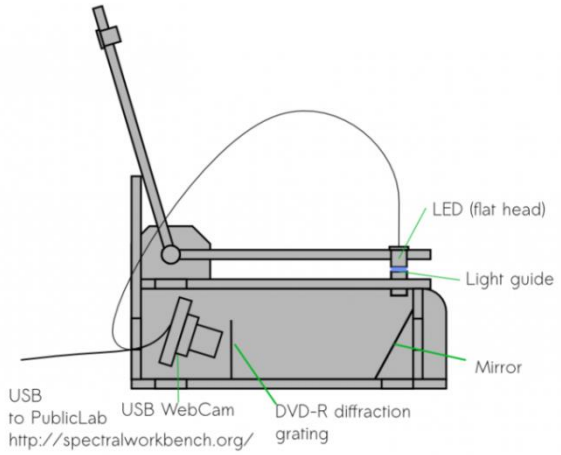


Aparell d'electroforesi DIY. FONT: www.gaudi.ch

-Transil·luminador blau: s'utilitza per poder veure les bandes d'ADN en el gel d'agarosa després d'una electroforesi. La seva forma DIY consisteix en utilitzar una bombeta de llum ultraviolada i posar-li al damunt una peça de plàstic transparent de color taronja on s'hi posarà el gel d'agarosa.

Transiluminador DIY. FONT: www.gaudi.ch

-NanoDrop: aquest aparell és capaç de mesurar la puresa o la quantitat de ADN que hi ha en una gota de 0.5µl. Per fer aquest aparell més complex cal una *webcam*, un fragment de DVD, un mirall i un led, que disposats de la forma adequada i amb un programa permeten mesurar la puresa.



Esquema NanoDrop DIY. FONT: www.hackteria.org

6. El termociclador

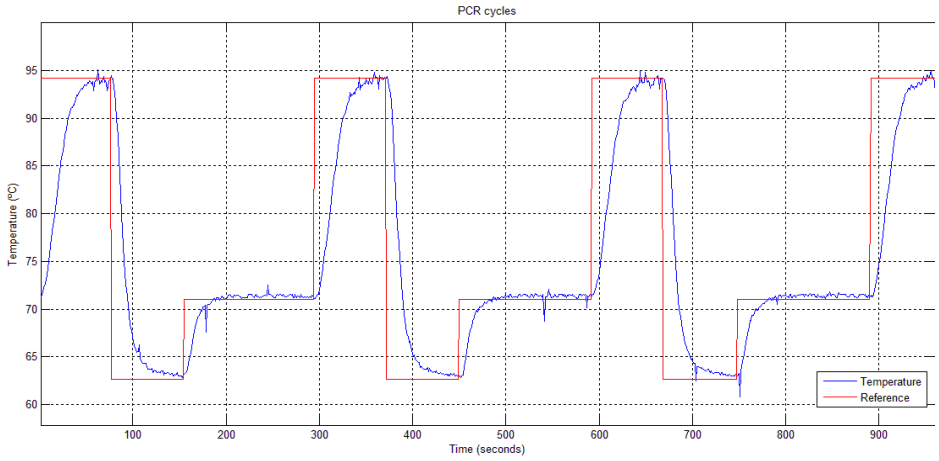
D'entre tants aparells que es podrien fer vaig escollir el termociclador perquè havia començat a estudiar el seu funcionament a les classes de biologia a l'estudiar la PCR i em va cridar l'atenció. A més és un aparell que ja té una dificultat més elevada i em permetia aprendre d'altres disciplines com la informàtica.

6.1 Utilitat

Un termociclador és un aparell utilitzat en laboratoris de genètica molecular que permet realitzar de forma automatitzada la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per amplificar l'ADN. Malgrat que la seva principal funció és realitzar la PCR també pot realitzar altres procediments com la seqüenciació d'ADN pel mètode Sanger, en aquest mètode la PCR no varia, però s'utilitzen unes bases nitrogenades diferents.

Com ja s'ha mencionat, per realitzar una PCR cal anar variant la temperatura perquè l'ADN es desnaturalitzi i la resta de reactius actuïn. Antigament aquest procés es feia amb unes olles, cadascuna a la temperatura necessària, i s'anava canviant la mostra d'olla. Com que aquest procediment amb olles requeria estar pendent molta estona de l'experiment, es va inventar el termociclador per tal d'automatitzar-lo,

Com indica el seu nom, el termociclador és un aparell que fa cicles d'un temps determinat a una temperatura determinada de forma automàtica. De manera que s'aconseguiria un gràfic amb les 3 temperatures que s'haurien d'assolir en cada cicle, encara que hi hagués una petita variació.

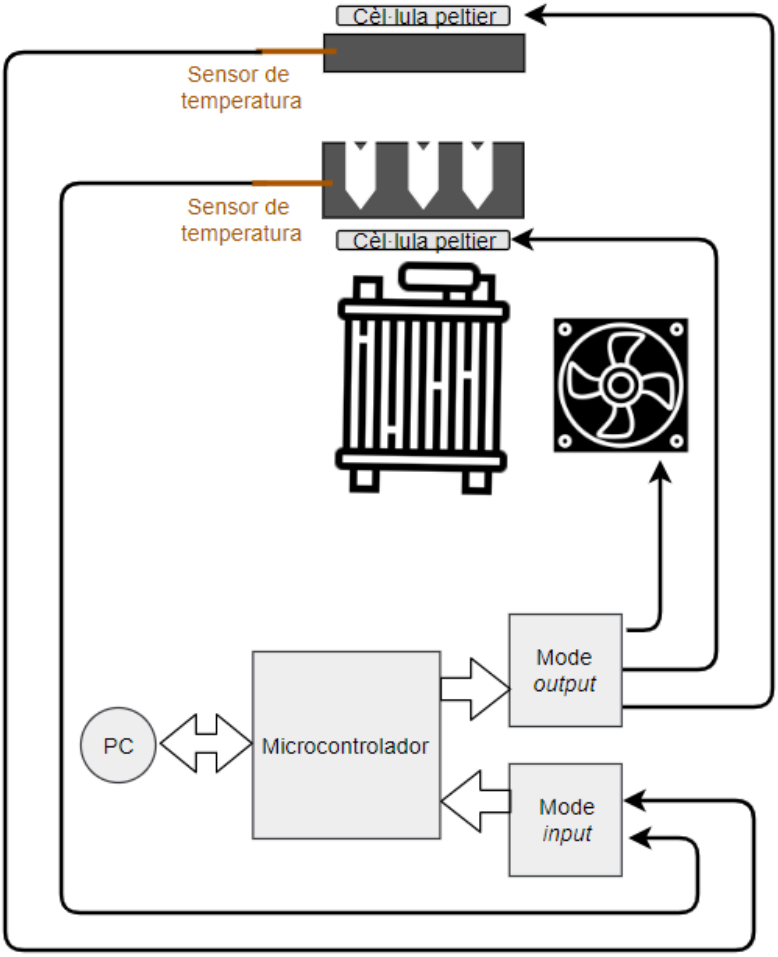


Gràfic temperatures del termociclador. FONT: www.igem.com

Un termociclador és capaç de realitzar tots els tipus de PCR perquè l'únic que canvia són els reactius, menys la PCR en temps real (qPCR) per la qual es necessita un termociclador especial que permet detectar la fluorescència que es desprèn en aquest tipus de PCR al formar-se l'ADN.

Tot i haver-hi dos tipus de termociclador tots tenen en comú el disseny i les parts bàsiques per fer els cicles de temperatura.

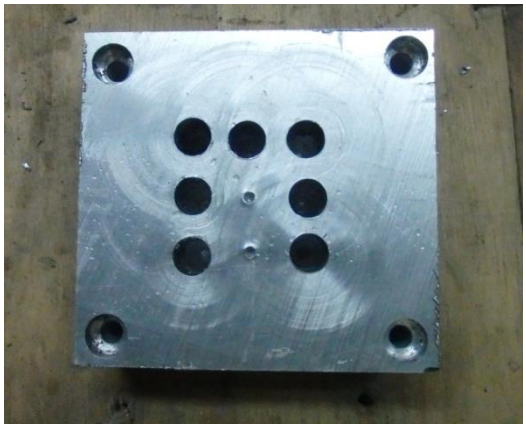
6.2 Parts



-Cèl·lula *peltier*: és una bomba de calor en estat sòlid que transfereix la calor d'una punta a l'altra del dispositiu gràcies al consum d'energia elèctrica.

Cèl·lula *peltier*. FONT: www.luisllamas.es

-Plaques d'alumini: són els suports que escalfen els *eppendorfs* (recipients on es posa la mostra), les plaques s'escalfen perquè estan en contacte amb les cèl·lules *peltier*.



Placa d'alumini perforada per poder posar 7 *eppendorfs*.

-Ventilador: l'objectiu d'aquesta peça és renovar l'aire que està en contacte amb el dissipador, aporta aire fred i s'emporta l'aire escalfat.

Ventilador. FONT: www.dhgate.com

-Dissipador tèrmic: és una peça metàl·lica sense parts mòbils que ajuda a baixar la temperatura. El que fa és transmetre la calor de la cèl·lula *peltier* a l'aire que fa el ventilador. Per augmentar l'eficàcia a l'hora de refredar necessita una superfície d'intercanvi de calor molt gran amb l'aire per això té aquesta forma.

Dissipador tèrmic.

-Sensor de temperatura: llegeix la temperatura de la placa d'alumini perquè el microcontrolador activi o desactivi la cèl·lula *peltier*. En el meu cas es un termoaparell.

Sensor de temperatura, termoaparell. FONT: www.bigkuonline.com

-Sistema de control, format per:

- Placa de control: microcontrolador amb memòria Arduino, és on s'emmagatzema i s'executa el programa. A més és on es converteixen els senyals elèctrics (tensió i intensitat del corrent) d'entrada i sortida perquè els pugui llegir el microcontrolador.

Microcontrolador Arduino. FONT: www.nicepng.com

- Placa de sortides: formada per relés, que són el interruptors magnètics que engegaran o apagaran la cèl·lula *peltier* i el ventilador.

Relés. FONT: www.amazon.com

- Placa d'entrada: formada per un amplificador diferencial, és l'encarregat d'adaptar el senyal del sensor de temperatura perquè el pugui llegir el microcontrolador.

-Pantalla informativa: on es pot llegir que s'està fent en la reacció, el temps, la temperatura....

Pantalla compatible amb un microcontrolador. FONT: www.mercadolibre.com

-Font d'alimentació: adapta el corrent elèctric a les necessitats dels circuits electrònics (sistema de control), passa de 220V de corrent altern a 12V i 5V de corrent continu.

Font d'alimentació sense la carcassa.

6.3 Construcció

La construcció del termociclador es divideix en dues parts l'electrònica i l'estructural.

La part estructural és aquella on es construeix la carcassa del termociclador, es forada la placa d'alumini per fer-la funcional, es col·loca el dissipador tèrmic i el ventilador perquè refrigerin ràpid i es dissenya el lloc on aniran els components de la part electrònica.

Per altra banda, la part electrònica consisteix en programar el microcontrolador i crear un circuit que connecti totes les parts perquè la informació del microcontrolador arribi a tot arreu.

[Veure Annex 3: fotografies complementàries]

6.3.1 Part estructural

El primer que es fa quan es construeix el termociclador és la carcassa sobre la qual s'aniran afegint la resta d'elements. En aquest cas es va fer a partir d'una caixa de vins i alguna fusta reutilitzada per tal de reutilitzar material i reduir el cost.

Fusta utilitzada per la carcassa

De la capsa cal treure cinc peces diferents: la base a la qual s'acaba afegint unes potes, una tapa en diagonal que conté els forats per la pantalla i pel botó, una tapa superior amb el forat per la placa d'alumini, una fusta pel darrera a la qual se li fan els forats pel ventilador i la font d'alimentació; i una tapa mòbil que

conté la placa superior d'alumini. En aquesta última tapa se li afegeix un sistema per poder-la tancar.

Les peces de fusta tallades

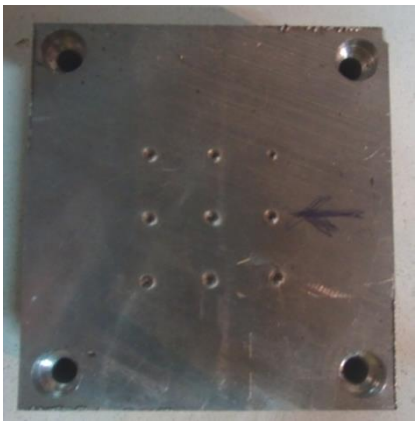
Un cop les peces encaixen s'aplica una capa de pintura per arreglar imperfeccions en la fusta i una segona capa per obtenir el color desitjat. Els laterals de l'aparell es poden fer de metacrilat per poder veure'n l'interior. Aquest es marca, es talla i s'enganxa a la fusta amb silicona.

Peces de fusta amb les 2 capes de pintura

Són peces claus en el termociclador les dues plaques d'alumini que transmeten l'escalfor a la mostra. Per fer-les cal partir d'una peça d'alumini circular i es talla formant dues plaques quadrades més petites (60x60mm), que amb ajuda d'un torn es deixen planes i llises.

Les dues plaques d'alumini tallades

Per fer la placa inferior el primer que cal és distribuir la situació dels forats on posteriorment s'introduiran els *eppendorfs*, per fer-ho es té en compte que la cèl·lula *peltier* només mesura 40x40mm per tant només és eficaç al centre de la placa d'alumini. Es recomana prescindir de fer 2 forats per tal de poder-hi posar el sensor de temperatura i que arribi al centre de la placa.

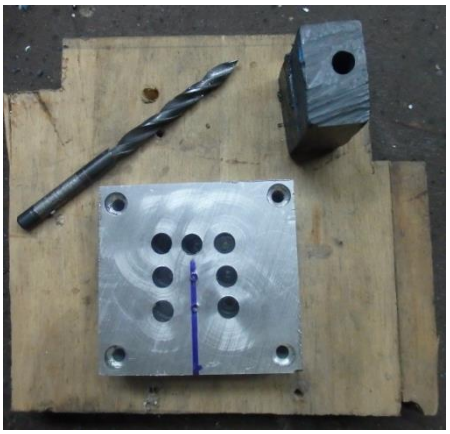


Forats marcats a la placa d'alumini

Un cop decidit on van els *eppendorfs* es marquen fent un petit forat. Però abans de fer el forat és molt important que aquests tinguin la mateixa mida i forma que un *eppendorf,* perquè s'escalfin millor, es per això que es fa amb una broca especial. Per fer-la simplement es modifica una mica la punta d'una broca convencional tallant-la a la mida i forma desitjada.

La broca modificada i la forma del forat que realitza

L'altre problema és que la broca només ha de perforar fins a una certa profunditat de la placa, no l'ha de travessar, per això es pot posar un fragment de fusta o PVC a la part superior de la broca, perquè a l'arribar a la profunditat desitjada el fragment toqui la placa i no li permeti baixar més. Un cop fets els forats pels *eppendorfs* és necessari fer un forat al lateral de la placa per poder introduir el sensor de temperatura fins a la meitat.



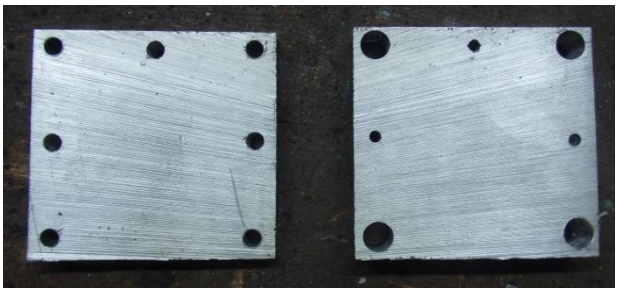
La placa foradada, la broca modificada i el fragment de PVC

Per fer la placa d'alumini superior cal dividir-la en dues més primes, una de les quals serà més gruixuda que l'altra, per tal de poder fer un sistema que exerceixi pressió sobre la placa inferior. A la placa gruixuda cal fer-li un forat lateral per poder introduir-li el sensor de temperatura.

Fent marques a les 2 plaques tallades

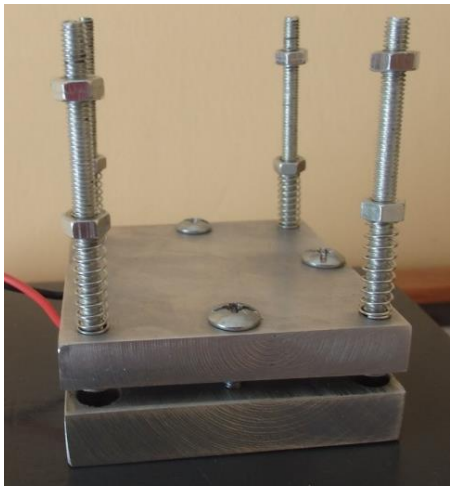
Primer cal posar la cèl·lula *peltier* al mig de les dues plaques ja tallades amb una mica de pasta tèrmica per conduir millor la calor. Un cop posada la cèl·lula es cargolen les plaques primes sense pressionar gaire per no trencar la cèl·lula *peltier* que es troba al mig.

Per fer el sistema de pressió cal foradar la placa més prima amb una broca que permet el pas del cargol, però no el del seu cap i la placa gruixuda ha de permetre el pas del cargol i el cap. Amb la mateixa mida que s'ha foradat la placa prima es forada la tapa de fusta.



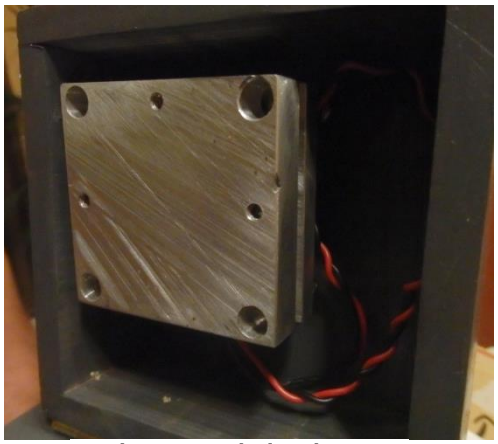
Plaques foradades

Llavors es passa un cargol llarg per la placa gruixuda, fent que la travessi, i un per la prima, on es quedarà el cap, un cop passat el cargol se li posa una molla que comprimeix una mica amb una femella. Aquest procés es repeteix amb els 4 forats de les paques.



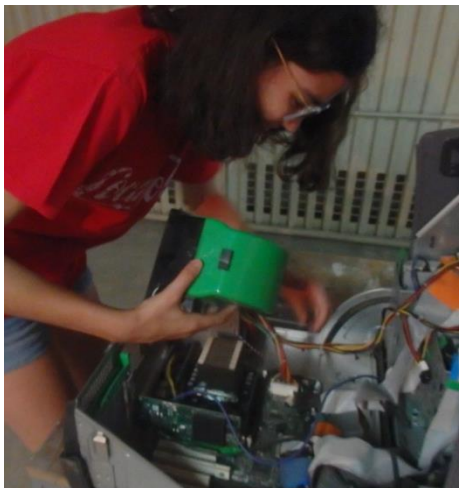
Placa muntada amb els cargols

Un cop preparada aquesta estructura s'ajunta amb la tapa passant els cargols pels forats i es posa una femella per evitar que es moguin.



La placa cargolada a la tapa

També és essencial fer el sistema que permet escalfar i refredar les plaques d'alumini. Per això són necessaris el ventilador i el dissipador tèrmic, els quals es poden extreure d'un ordinador.

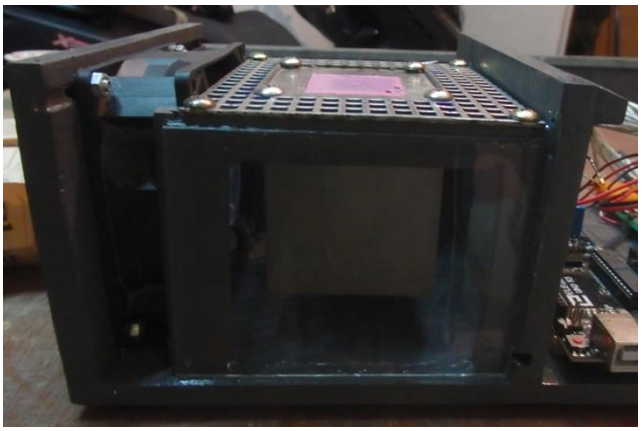


Extraient el ventilador i el dissipador de l'ordinador

El primer que cal fer és col·locar el ventilador de manera que encaixi amb el forat que s'ha fet a la peça de fusta de darrera.

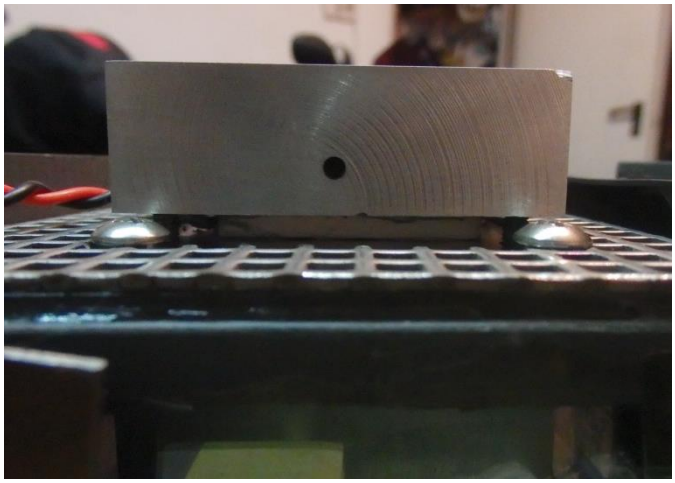
Ventilador col·locat a la fusta del darrera

Al col·locar el dissipador, aquest no funcionaria del tot bé si estigués en contacte amb la base de l'aparell per això es fa una petita estructura de fusta que, juntament amb una reixa metàl·lica, permet cargolar el dissipador i elevar-lo de la base. Per treure més profit de l'estructura que aguanta el dissipador s'enganxen dues petites peces de metacrilat als laterals per tal d'evitar que la calor del dissipador arribi a la part electrònica i l'espatlli.



Dissipador tèrmic cargolat a l'estructura elevadora

Per acabar la part estructural es cargola el dissipador la placa d'alumini inferior posant-hi al mig la cèl·lula *peltier* coberta de pasta tèrmica perquè s'adhereixi millor i no perdi eficiència transmetent calor.

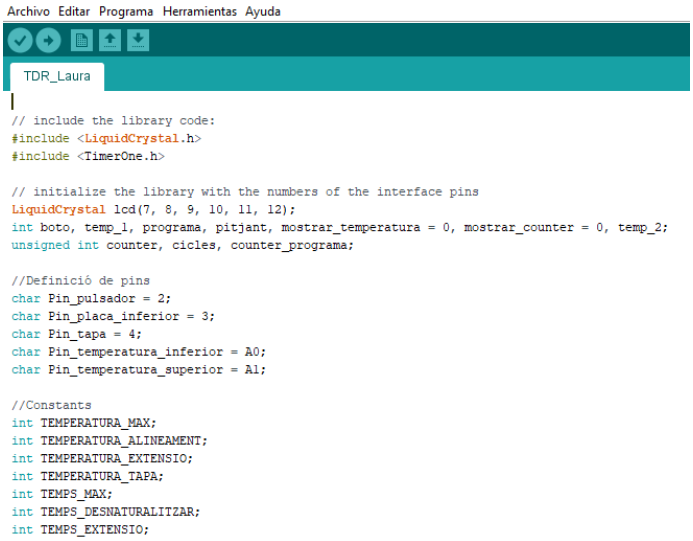


Cèl·lula de *peltier* entre la placa i el dissipador

6.3.2 Part electrònica

La part electrònica gira al voltant d'aconseguir que el microcontrolador funcioni seguint el programa marcat i que els circuits no tinguin errors.

Per això el primer que cal fer és programar el microcontrolador. A l'utilitzar un microcontrolador Arduino, s'utilitza per programar el programa que ofereix la marca Arduino [Veure Annex 4].

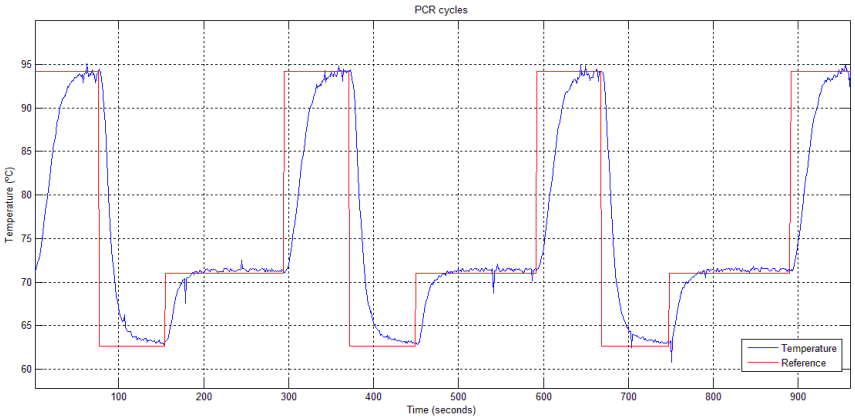


Fragment inicial del programa

Bàsicament el programa fa 35 bucles en que puja i baixa a les 3 temperatures necessàries en la PCR durant un temps marcat, en aquest procés la pantalla indica la temperatura, el temps i la fase està el procés. Es pot incloure que el programa realitzi un *Hot Start* a l'inici i l'elongació final a l'acabar els cicles.

Per poder mantenir la temperatura, el sensor de temperatura mesura la temperatura de la placa d'alumini i, prenent de referència la temperatura establerta, fa que el microcontrolador encengui o apagui la cèl·lula *peltier*.

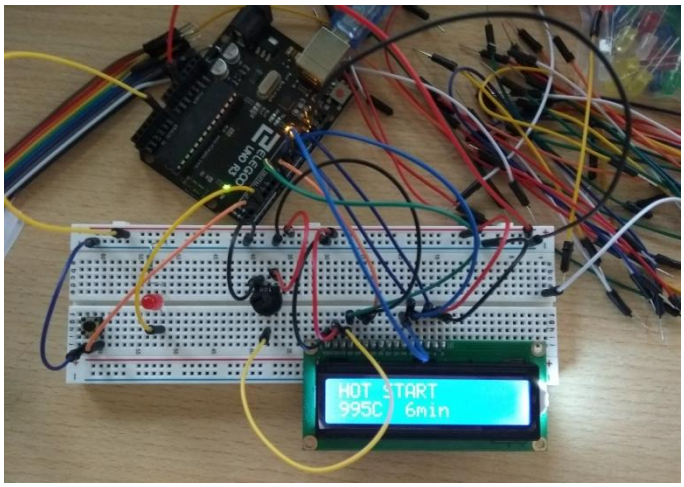
Tot i mantenir la temperatura desitjada hi ha una histèresi ja que el microcontrolador està programat perquè encengui o apagui la cèl·lula *peltier* quan la placa es trobi uns graus per sobre o per sota de la temperatura establerta. Perquè si no hi hagués histèresi la placa es podria espatllar ja que s'estaria encenent i apagant constantment.



Gràfic on s'aprecia les petites variacions de temperatura quan ha de ser constant (blau)

Es poden programar 2 o més processos de PCR diferents que contenen unes temperatures i temps diferents. Cada procés correspon a una pràctica de PCR diferent, les dades que es van fer servir es van extreure de dos protocols pràctics d'una empresa anomenada Bioted dedicada a la divulgació científica.

Durant el procés de programar cal fer proves sobre el funcionament del que s'ha programat es per això que cal utilitzar un *protoboard* (taulell amb orificis connectats elèctricament entre ells) on se simulen els circuits als quals el microcontrolador dona informació o dels quals en rep. Per fer proves s'uneixen el microcontrolador, la pantalla informativa i els relés amb cables connectats als orificis del *protoboard*, en cas que no funcioni bé cal revisar on es troba l'error per canviar la programació.



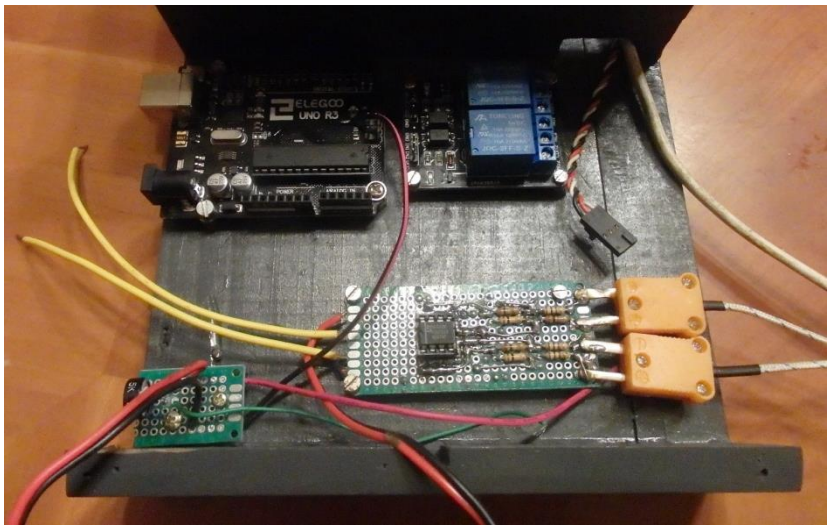
***Protoboard* on es simula el funcionament de la pantalla**

Un cop programat correctament el microcontrolador cal començar a soldar la placa d'entrada per fer un amplificador diferencial que permet adaptar el senyal per la correcta lectura del microcontrolador.

Per fer-lo cal soldar amb estany el circuit que consisteix en unir una resistència de 100Ω i una altra de 100kΩ a un amplificador operacional. Cal fer-ho dos cops degut a la presència de dos sensors de temperatura que requereixen circuits independents per adaptar el senyal.

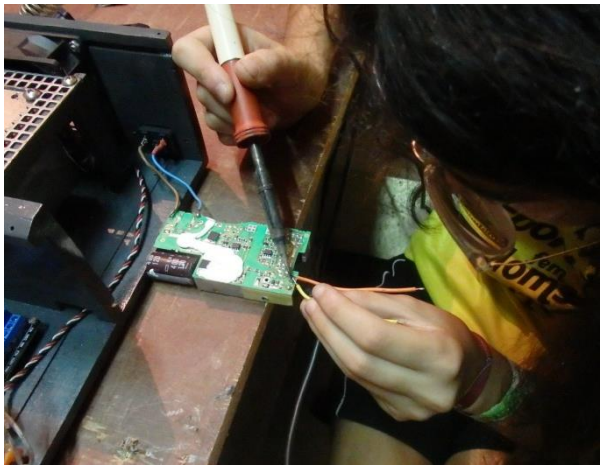
Resistència de 100Ω. FONT: www.ecobadajoz.com

Quan totes les plaques estan preparades i funcionen correctament cal col·locar-les al lloc assignat anteriorment, és molt important col·locar-les de forma que les entrades que cal connectar estiguin el més a prop possible per un acabat més ordenat.



Plaques col·locades en la seva posició

Al col·locar les plaques també es col·loca la pantalla i la font d'alimentació, cal encaixar l'endoll amb el forat predestinat a la fusta del darrere. Un cop tot està col·locat es connecten les entrades de les plaques mitjançant cables i estany per poder completar el circuit elèctric.



Soldant la font d'alimentació

Un cop acabada la construcció cal fer proves sense cap mostra per poder observar que els cicles funcionen correctament i es mantenen a la temperatura indicada el temps necessari.

6.4 Pressupost

Un cop vist com es construeix un termociclador de forma casolana es pot apreciar que el cost dels materials és molt més baix que un termociclador convencional. I tenint en compte que la majoria de materials són reciclats es redueix considerablement el cost i s'evita generar més residus.

Cal destacar que el pressupost s'ha pogut rebaixar molt al tenir molts dels materials necessaris a la meva disposició. I recalcar que he tingut la sort de poder accedir amb facilitat a eines poc comunes que m'han ajudat simplificar el procés de construcció, com un torn o un trepant. Tot i això es pot accedir a moltes d'aquetses màquines anant a un *FabLab*, un espai on pagant un mòdic preu et permeten tindre accés a aquestes màquines poc usuals i, si convé, t'ajuden a fer-les servir.

Material	Cost
Fustes de la carcassa	Reutilitzat
Pintura gris	4€
Metacrilat	Reutilitzat
Placa d'alumini	Reutilitzat
Cèl·lula *peltier*	8,68€
Ventilador	Reutilitzat
Dissipador tèrmic	Reutilitzat
Pasta tèrmica	5,22€
Microcontrolador	10€
Sensor de temperatura	4,76€
Pantalla	5€
Relés	6,99€
Font d'alimentació	Reutilitzat
Amplificador operacional	Reutilitzat
2 resistències de 100 Ω	20 ct.
2 resistències de 100 kΩ	20 ct.
Cargols, femelles, molles...	5€
TOTAL	49,85€

6.5 Comprovació

Abans de poder comprovar el correcte funcionament del termociclador comparant-lo amb un de convencional, cal fer altres proves per comprovar que l'aparell fa el que diu el programa del microcontrolador.

6.5.1 Els errors

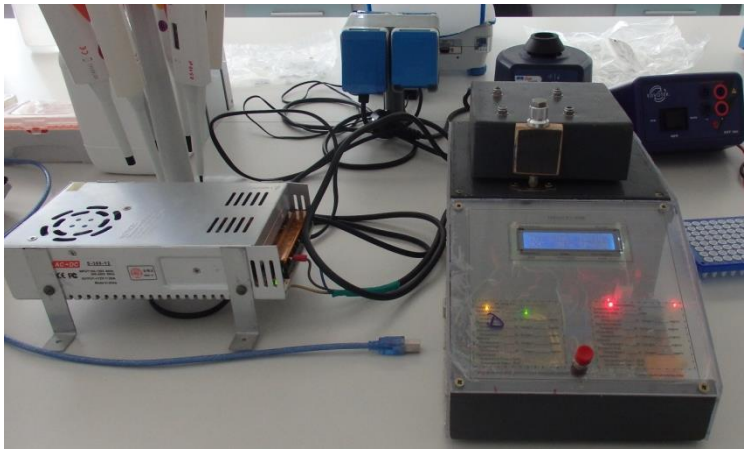
Problema de la font d'alimentació

A l'inici de provar el termociclador es va veure que les cèl·lules de *peltier* no arribaven a la temperatura necessària malgrat tenir la capacitat de fer-ho. Es va veure que el problema radicava en el fet que no arribava prou corrent a les cèl·lules de *peltier* per culpa de la font d'alimentació, que no tenia prou potència.

Les cèl·lules *peltier* converteixen l'energia elèctrica en calorífica, per tant si se li dona poca corrent les cèl·lules produeixen poca calor. Però amb massa energia elèctrica la cèl·lula es podria fondre.

La font d'alimentació que es va fer servir tenia un límit màxim de corrent i al demanar-ne més, baixava la tensió a 12 volts. Això provocava que no arribés prou corrent a la cèl·lula i aquesta, al treballar a temperatures molt altes, no arribava a la temperatura desitjada.

Per tal de solucionar el problema, es va decidir treure la font d'alimentació i posar-n'hi una d'externa amb més potència. I, a l'espai que ocupava l'antiga font, posar-hi un convertidor per alimentar el ventilador i el microcontrolador.



Termociclador almb la font d'alimentació externa

<u>Prova del ventilador</u>

Serveix per veure si la temperatura augmenta i redueix més ràpid amb el ventilador encès o apagat.

Per fer-ho cal fer pujar la temperatura una vegada amb ventilador encès i l'altra amb el ventilador apagat i repetir el procediment amb la baixada de temperatura. Amb l'ajuda del sensor de temperatura es mesura la temperatura inicial i final i es calcula l'increment de temperatura durant un minut. Es compara l'increment amb ventilador i sense, i el que tingui major increment (canviï més ràpid la temperatura) és l'adequat.

Per fer-ho de forma ordenada es poden apuntar els resultat es una taula com la següent:

	Ventilador encès			Ventilador apagat		
	t Inicial	t Final	Increment	t inicial	t final	Increment
Refredar	62,2ºC	36,5ºC	26,7ºC	71,8ºC	45,6ºC	26,2ºC
Escalfar	36,8ºC	77,5ºC	40,7ºC	46,1ºC	91,4ºC	45,3ºC

Com es pot veure, l'increment de temperatura quan es refreda no varia molt, tot i això, dona un resultat millor si s'utilitza el ventilador. En canvi, quan s'escalfa, el ventilador fa que l'increment sigui més reduït i es perdi eficàcia.

Després de fer aquesta prova cal variar el programa del microcontrolador, programant que el ventilador s'engegui al refredar i s'apagui a l'escalfar.

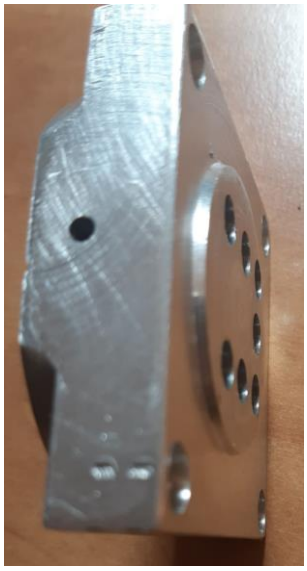
Prova de la inèrcia

Una de les majors dificultats a assolir en el temociclador és la precisió, el termociclador és un aparell que ha de variar la temperatura en pocs segons. Es per això que la inèrcia tèrmica és un problema quan construeixes l'aparell.

La cèl·lula *peltier* escalfa una peça d'alumini fins arribar a la temperatura desitjada. Per abaixar-la, la cèl·lula es para i no emet calor però la placa d'alumini no reacciona igual, pateix inèrcia tèrmica, és a dir, que un cop deix de rebre calor encara puja uns quants graus més i llavors comença a refredar-se. Aparentment uns pocs graus no semblen cap problema però, al parlar d'un aparell tan precís, això provoca que durant un temps la temperatura no sigui la adequada i això pot afectar la mostra.

Per saber quina és la inèrcia que té la placa només cal llegir amb el sensor de temperatura la temperatura que té la placa quan la cèl·lula es pari per refredar. Si la inèrcia és poca i triga pocs segons a tronar a la temperatura adient no cal fer res, però si dura massa cal buscar una solució.

La primera solució és reduir la quantitat de metall de la placa perquè, a l'haver-hi menys material, és més fàcil és que canviï de temperatura. Però encara hi ha massa inèrcia per un correcte funcionament.



Placa d'alumini després de ser reduïda

Una altra possible solució és canviar la polaritat de la cèl·lula *peltier*. La cèl·lula *peltier* emet calor per una cara i fred per l'altra, si es fa entrar corrent negativa per l'entrada positiva i corrent positiva per la entrada negativa s'aconsegueix canviar la polaritat i fer que refredi per la cara que abans escalfava.

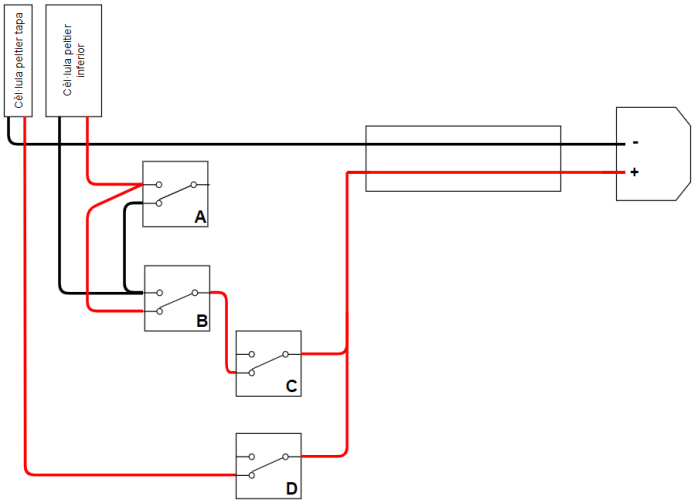
Per aconseguir-ho són necessaris 2 relés més. De tal forma que hi ha 4 relés en l'aparell, els qual anomenarem A, B, C i D per fer més fàcil l'explicació.

Els relés C i D reben el corrent positiu directament de la font d'alimentació. El relé D controla la cèl·lula *peltier* de la tapa, la qual encén i apaga per mantindre-la a temperatura constant.

Per altra banda el relé C fa d'interruptor dels relès A i B. El relé C, quan està connectat, dona corrent positiva a A i B permetent que funcionin, però quan s'apaga C, A i B ja no funcionen per la falta de corrent positiva. El relé C s'utilitza per mantindre la temperatura en els cicles, perquè si ho fessin A i B seria un canvi molt brusc que produiria una histèresi molt gran i perdriem precisió.

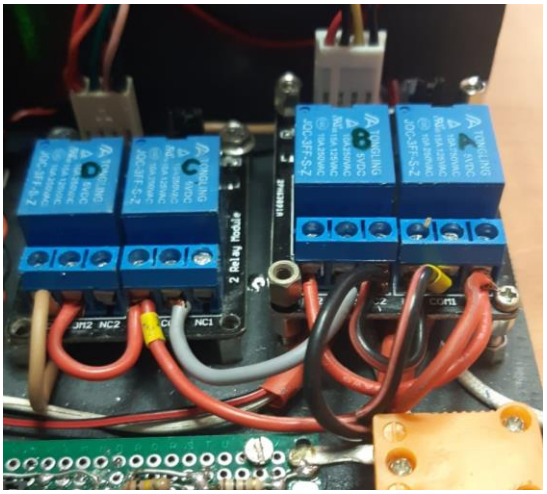
Els relés A i B s'encarreguen d'augmentar i disminuir la temperatura de forma ràpida. Per fer-ho A està connectat a l'entrada positiva de la cèl·lula i B a l'entrada negativa. Depenent de la posició de A i B la cèl·lula escalfa o refreda, sempre que C estigui encès. Hi han dos possibles combinacions:

- A transporta el corrent positiu i B el negatiu: en aquest cas la polaritat és la normal i la placa escalfa, perquè el corrent positiu entra per l'entrada positiva i el negatiu també entra per la seva entrada.
- A transporta el corrent negatiu i B el positiu: en aquest cas s'ha invertit la polaritat de la cèl·lula, perquè el corrent positiu entra per l'entrada negativa i el corrent negatiu per l'entrada positiva. Això fa que la placa refredi per on abans escalfava i permeti refredar a gran velocitat.



Esquema dels relés

Aquest canvi de polaritat permet eliminar la inèrcia tèrmica perquè la cèl·lula refreda i permet eliminar la calor molt abans del que permet el contacte amb l'aire.

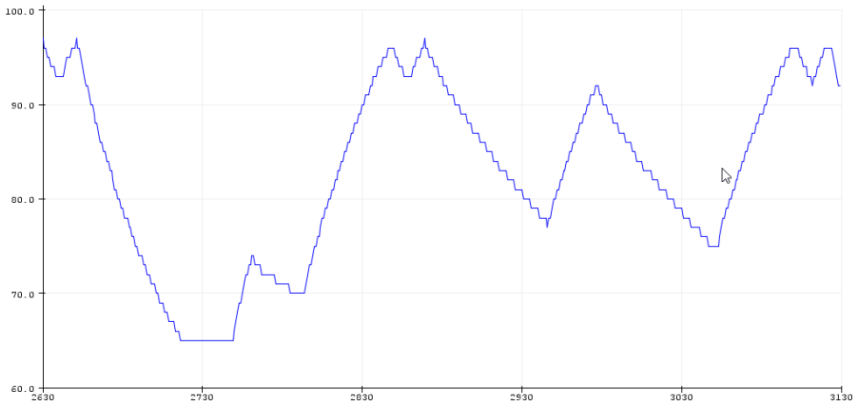


Relés (A, B, C, D)

Problemes amb el microcontrolador

Quan semblava que tot funcionava, va aparèixer un error en el programa, el qual es saltava alguns passos i no permetia que la temperatura fos l'adequada. El principal problema radica en que aquest error és causat per atzar, no segueix cap patró al saltar-se algun pas, no depèn ni del cicle ni del pas. La gràfica variava sola sense seguir cap lògica.

Llavors detectar quin era l'origen del error no era senzill però es va veure que el problema radicava en el microcontrolador, el qual, per un motiu desconegut, va començar a fallar i a saltar-se passos del programa.



Gràfica de la temperatura amb un error al alineament

Un cop detectat el problema la solució és senzilla, canviar el microcontrolador per un de nou que no causés errors. Després de retocar el microcontrolador i

retocar una mica el programa per millorar-lo, l'error es va deixar de produir i els cicles tornaven a funcionar correctament.

6.5.2 L'experiment

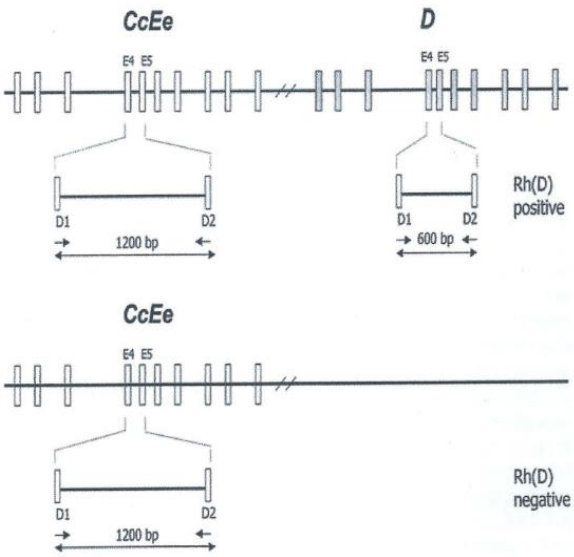
Després de solucionar tots els errors, cal comparar els resultats del termociclador construït amb els resultats d'un termociclador convencional. Per assegurar-se que, a més de fer els cicles de temperatura, l'aparell sigui prou precís per crear les condicions necessàries per fer la PCR.

El termociclador utilitzat per fer la comparació va ser un Techne TC-412 (valorat en uns 4000€) que ens va deixar provar l'empresa *Bioted* a les seves instal·lacions. A més, aquesta empresa ens va proporcionar el material necessari per realitzar l'experiment i la PCR.

Termociclador Techne TC-412

L'experiment realitzat va ser la detecció del gen Rh (l'antigen Rhesus) que està format per dos gens estructurals el D i el CcEe. Una persona es considerada Rh+ quan conté l'antigen D a la membrana dels glòbuls vermells sinó, es considera Rh- perquè només conté el gen CcEe. La base de l'experiment és l'amplificació d'un fragment del gen D, si s'amplifica indica que la persona és Rh+. A més es duplica el gen CcEe per assegurar-se que hi ha amplificació del ADN en els Rh-.

Ja que els gens D i CcEe són semblants i es pot fer un encebador que encaixi en les dues regions, així totes les mostres d'ADN fan de motlle per l'amplificació. I en l'electroforesi que es fa posteriorment, els individus amb Rh+ produeixen dues bandes de mides diferents (1200pb i 600pb) perquè han amplificat el gen D i el CcEe i els individus Rh- només produeixen la banda de 1200pb corresponent al CcEe.



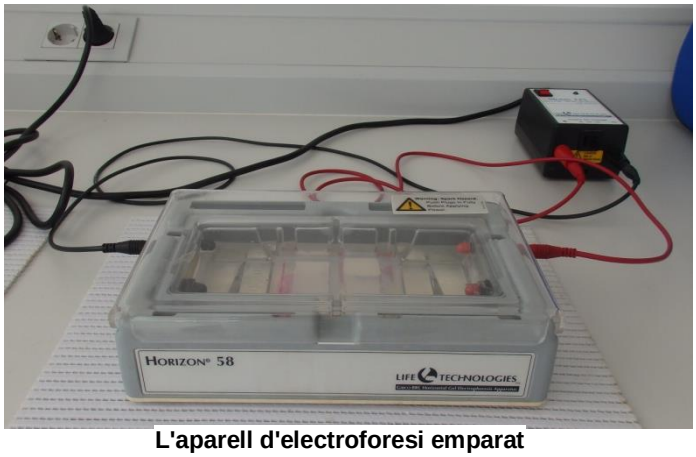
Esquema gens CcEe i D

El primer que s'ha de fer es fer una extracció d'ADN de saliva, en aquest cas es va fer servir ADN que havia estat anteriorment congelat, i ja es sabia que una de les persones era Rh+ i l'altre Rh-.

Un cop es tenen els ADNs que cal analitzar, es barregen 2,5µl d'ADN amb 22,5µl de PCR mix (un producte de l'empresa *Bioted* que ja inclou tots els reactius necessaris per fer la PCR). Aquest pas es va fer 2 cops amb cada mostra d'ADN i dos cops fent un control que contenia aigua.

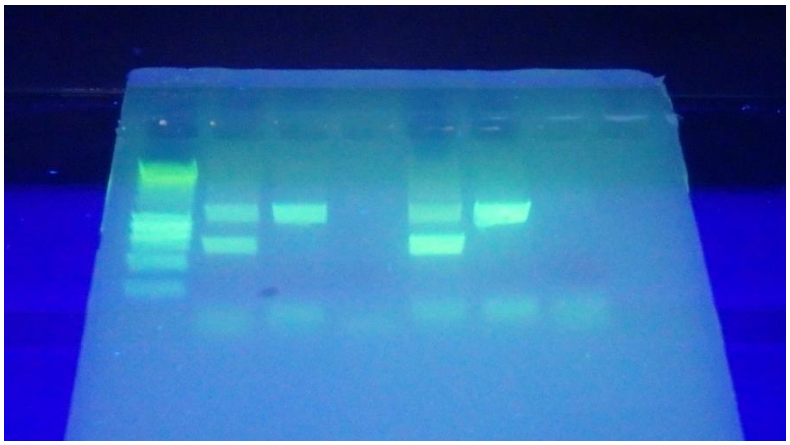
De tal forma que es va posar, en el termociclador TC-412, tres mostres (una mostra de Rh+, una de Rh- i el control) i en el termocilador casolà, es van posar les altres tres mostres que s'havien preparat dels mateixos ADNs.

Es van fer els 35 cicles a cada termociclador i, un cop acabada la PCR, es van treure els *eppendorfs* amb les mostres i es va fer una electroforesi en gel d'agrosa.



L'aparell d'electroforesi emparat

En l'electroforesi es va posar en el primer carril un marcador el qual, al donar corrent al gel, es separaria en bandes d'una mida coneguda per tindre una referència per analitzar els altres fragments. Als següents tres carrils hi ha les mostres dels *eppendorfs* del termociclador TC-412, el primer és el Rh+ (dues bandes), després el Rh- (una banda) i per últim el control (cap banda). I els tres últims carrils corresponen a les mostres dels *eppendorfs* del termociclador casolà, col·locades en el mateix ordre que les tres mostres anteriors.



Resultat de l'electroforesi

Es va deixar córrer el corrent elèctric i, com es pot observar en la imatge, els resultats dels dos termocicladors són iguals, és a dir, que tenen el nombre de bandes que li corresponen a cada mostra.

Per tant, el termociclador casolà funciona igual de bé que un de convencional i dona els resultats amb la mateixa precisió.

6.5.3 Millores

Com ja s'ha dit anteriorment, el termociclador casolà funciona amb la mateixa precisió que el convencional. Però un dels motius que creen la diferencia de preus entre termocicladors, és la velocitat amb la que fan els cicles.

En aquest cas, el termociclador TC-412 va tardar 1 hora i 45 minuts, en canvi, el casolà va tardar 2 hores i 30 minuts, Com es pot veure, la diferència de temps entre els dos termocicladors és molt gran i és un aspecte que es podria millorar fent uns canvis en el material emparat.

Comparació del termociclador casolà i el TC-412

Una forma d'augmentar la velocitat en cada cicle seria subministrar més potència a les cèl·lules *peltier*, perquè com més potència més capacitat calorífica té i més ràpid fa els canvis de temperatura. Per aconseguir l'augment de potència caldria posar una font d'alimentació més potent que la que s'utilitza actualment.

Una altra opció, complementària a l'anterior, seria canviar el ventilador per un més gran i més potent que ajudés a refredar més ràpid, ja que en la refrigeració és quan es perd més temps.

Per últim es podria millorar el programa del microcontrolador per reduir la histèresi a la mínima possible perquè la temperatura sigui més estable. I que fos el microcontrolador qui controlés el ventilador, que l'encengui quan es

vulgui un canvi gran de temperatura i que l'apagui quan es vulgui mantindre la temperatura.

7. Conclusions

Un cop acabat el treball, es pot dir que s'han assolit els objectius d'aquest. Entre ells el més important, poder demostrar que es poden fer aparells de genètica molecular a casa, en aquest cas, un termociclador.

En primer lloc, s'ha fet divulgació sobre la genètica de forma senzilla, des de l'estructura del ADN, fins a que és un laboratori de genètica i que s'hi fa. Fent que es perdi la idea que la ciència només l'entenen els científics.

En segon lloc, s'ha pogut donar a conèixer que és el moviment del *biohacking*, tant els seus orígens, com els seus objectius, problemes i beneficis. Aquest punt m'ha permès aprendre molt sobre com buscar informació més enllà de les webs convencionals, degut a la poca informació que es pot trobar del tema a Internet i la necessitat de consultar llibres o assistir a xerrades sobre el tema.

Per últim, i per poder demostrar aquestes idees del *biohacking*, s'ha construït un termociclador que ha assolit la mateixa precisió que un de convencional. I s'ha demostrat que, amb uns coneixements de tecnologia i biologia, es pot construir l'equipament necessari per fer experiments de genètica fora del laboratori.

I que, per tant, aquest aparell es pot portar a l'àmbit educatiu, a un preu molt més reduït i podria permetre fer experiments més actuals als alumnes dels instituts. O permetre començar una investigació de baix cost, sempre que respecti el codi ètic del *biohacking*.

A més de tots aquests nous coneixements, també he crescut com a persona. He vist que no tot et pot sortir a la primera i que de vegades cal fer moltes proves i milers de programes perquè acabi sortint el resultat esperat i que, si aquest resultat no surt, no passa res perquè durant el procés segur que has après molt. També he après que no és fàcil trobar contactes i gent disposada a ajudar-te a tirar endavant els teus projectes, que moltes vegades no et contesten, i per això cal estar molt agraït a qui et vol ajudar.

Per últim, vull citar una frase del Manifest *biopunck* de Meredith Patterson: *Un nen de tretze anys al sud del centre de Los Angeles té tant dret a investigar el món com una professora d'universitat. Si els termocicladors són massa cars per donar-ne un a totes les persones interessades, en dissenyarem uns més barats i ensenyarem a les persones com construir-los.* Aquesta frase és el clar reflex del que s'ha volgut demostrar en aquet treball, al final tothom té el dret de ser educat en allò que més li agrada, i sigui el que sigui no ha de perdre l'oportunitat per la falta de diners.

Perquè quan perdem la idea del laboratori tradicional, és quan es comencen a fer les millors investigacions. Aquelles que pot fer algú com tu o com jo.

8. Bibliografia i webgrafia

Webs:

- Sarah Romero: *La revolución del biohacking* (consultat: 30 de juny). Disponible a:

https://www.muyinteresante.es/tecnologia/articulo/la-revolucion-del-biohacking-931461160386

- Grup de recursos per la didàctica química, UPC: *Tècniques bàsiques de laboratori: la centrifugació* (consultat: 23 de juny). Disponible a:

https://tv.upc.edu/continguts/la-centrifugacio

- Sigma-Aldrich: *What is Hot Start PCR?* (consultat: 17 de juliol). Disponible a:

https://www.youtube.com/watch?v=zoRx3dUjqys

- Rare Commons: ¿Qué sucede en un laboratório de genética? (consultat: 17 de juliol). Disponible a:

https://www.rarecommons.org/es/actualidad/sucede-laboratorio-genetica

- Team Valencia: *Hardware* (consultat: 22 de juliol). Disponible en:

http://2016.igem.org/Team:Valencia_UPV/Hardware

- Compumedmx: *Calibración y Clasificación de PCR's* (consultat: 25 de juliol). Disponible en:

https://compumed.wordpress.com/2015/12/02/calibracion-y-calificacion-de-pcrs/

- National Human Genome Research Institute: *Ácido desoxiribonucleico (ADN)* (consultat: 28 de juliol). Disponible a:

https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/acido-desoxirribonucleico

- Mariana Gelambi: *ADN polimerasa: tipos, función y estructura* (consultat: 15 d'agost). Disponible a:

https://www.lifeder.com/adn-polimerasa/

- Viquipedia: *Electroforesi en gel d'agarosa* (consultat: 21 d'agost). Disponible a:

https://ca.wikipedia.org/wiki/Electroforesi_en_gel_d%27agarosa

Llibres:

Real García, María Dolores; Rausell Segarra, Carolina; Latorre Castillo Amparo: *Técnicas de ingeniería genética.* 3ra edició, Madrid: Editorial Sítesi S.A.

9. Agraïments

Aquest treball no hauria estat possible sense l'ajuda que m'han ofert totes les persones que anomenaré a continuació.

Primer de tot vull agrair la col·laboració del meu pare, Joan Mª Salvadó Vilafranca, i del meu germà, Adrià Salvadó Bautista, que són les persones que han fet possible que aquesta idea hagi pres forma. Sense la seva ajuda, coneixements i consells no hagués estat possible realitzar el treball.

Després agrair a la meva tutora del treball, Glòria Fusté, pels seus consells, respondre les meves preguntes i resoldre els meus dubtes. I sobretot per la seva disposició i les hores, dins i fora de l'horari lectiu, que ha dedicat al meu treball.

A l'empresa *BioTed*, especialment al David Navarro Pérez, que em va permetre anar a les seves instal·lacions per poder comparar el meu termociclador. I també per tots els consells que m'ha ofert durant el treball.

A la meva mare, Carmen Bautista Theis, pel suport i ànims que m'ha donat. I als meus millors amics pel suport constant i per animar-me, especialment, al Marçal Ollé Bono per haver-me fet el disseny de la portada del treball.

També a la meva cosina germana, Elena Prats Salvadó, per corregir-me les faltes del treball.

Mencionar també al grup Hangar, els quals van ser els primers en posar-me en contacte amb *biohackers*. I al grup de DIYbio Barcelona per proporcionar-me alguns links d'altres termociclador casolans.

I sobretot al lector d'aquest treball que espero que hagi après alguna cosa nova després de llegir-ho, com ho he fet jo al llarg del treball. I espero que vegi els laboratoris poden estar en qualsevol lloc.

10. Annexos

Annex 1: codis ètics

Congrés europeu:

Projecte de codi ètic DIYbio del Congrés Europeu

-Transparència: subratlla la transparència i l'intercanvi d'idees, coneixements, dades i resultats.

-Seguretat: adoptar pràctiques segures.

-Accés Obert: promoure la ciència ciutadana i l'accés descentralitzat a la biotecnologia.

-Educació: ajudar a educar el públic sobre la biotecnologia, els seus beneficis i implicacions.

-Modèstia: recordeu que no ho sabeu tot.

-Comunitat: escolteu detingudament les preocupacions i preguntes i respongueu amb honestedat.

-Finalitats pacífiques: la biotecnologia només s'ha d'utilitzar amb finalitats pacífiques.

-Respecte: respecteu els humans i tots els sistemes vius.

-Responsabilitat: reconeixeu la complexitat i la dinàmica dels sistemes de vida i la nostra responsabilitat envers ells. Sigueu responsables de les vostres accions i de la confirmació d'aquest codi.

Projecte de codi ètic europeu, *DIY BIO*

Congrés d'Amèrica el Nord:

-Accés obert: promoure la ciència ciutadana i l'accés descentralitzat a la biotecnologia.

-Transparència: destaca la transparència, l'intercanvi d'idees, coneixements i dades.

-Educació: implica el públic sobre biologia, biotecnologia i les seves possibilitats.

-Seguretat: adoptar pràctiques segures.

-Medi ambient: respecteu l'entorn.

-Finalitats principals: la biotecnologia només s'ha d'utilitzar amb finalitats pacífiques.

-Provar: la connexió amb la biologia condueix a la comprensió; la perspicàcia condueix a la innovació.

Projecte de codi ètic de Nord Amèrica, *DIY BIO*

Annex 2: Manifest *biopunk* de Meredith Patterson

L'alfabetització científica és necessària per a una societat en funcionament a l'edat moderna. L'alfabetització científica no és educació científica. Una

persona educada en ciències pot entendre la ciència; una persona alfabetitzada científicament pot fer ciències. L'alfabetització científica capacita a tots els que la posseeixen perquè contribueixin activament a la seva pròpia salut, la qualitat del seu menjar, aigua i l'aire, les seves interaccions amb els seus propis cossos i el complex món que els envolta.

La societat ha fet progressos dramàtics en els darrers cent anys cap a la promoció de l'educació, però alhora la prevalença de la ciència ciutadana ha caigut. Qui són els equivalents del segle XX de Benjamin Franklin, Edward Jenner, Marie Curie o Thomas Edison? Potser Steve Wozniak, Bill Hewlett, Dave Packard o Linus Torvalds, però l'abast de la seva obra és molt més estreta que la dels filòsofs naturals que els van precedir. La ciència ciutadana ha patit a una problemàtica disminució de la diversitat i és aquesta diversitat la que procura reivindicar els biohackers. Rebutgem la percepció popular que la ciència només es fa en laboratoris universitaris, governamentals o corporatius de milions de dòlars; afirmem que el dret de llibertat d'investigació, fer recerca i perseguir la comprensió sota la pròpia direcció és un dret tan fonamental com el de la lliure expressió o llibertat de religió. No tenim baralles amb Big Science; només recordem que la ciència petita sempre ha estat igual de crítica al desenvolupament del cos del coneixement humà, i ens neguem a veure'l extingit.

La investigació requereix eines i la consulta gratuïta requereix que tingueu accés a les eines. Com a enginyers, estem desenvolupant equips de laboratori de baix cost i protocols fora de la plataforma que són accessibles al ciutadà mitjà. Com a actors polítics, nosaltres donem suport a revistes obertes, col·laboració oberta i accés gratuït a la investigació amb fons públics, i ens oposem a les lleis que criminalitzen la tinença de material d'investigació o la investigació privada.

Potser sembla estrany que científics i enginyers intentessin implicar-se en el món polític, però els biohackers, per necessitat, s'han compromès a fer-ho. Els legisladors que vulguin reduir la llibertat individual la investigació ho fan per ignorància i la seva malvada bessona, la por, la presa natural i el depredador natural de la investigació científica, respectivament. Si podem prevaler contra

els primers, dissiparem els segons. Com a biohackers, és responsabilitat nostra actuar com a emissaris de ciències, creant nous científics entre tots els que trobem. No només hem de comunicar el valor de la nostra investigació, sinó el valor de la nostra metodologia i motivació, si no volem retrobar la ignorància i la por de nou a la foscor i per a tots.

Nosaltres els biopunks ens dediquem a posar les eines d'investigació científica a les mans de qui ho desitgi. Nosaltres estem construint una infraestructura de metodologia, de comunicació, d'automatització i de coneixement públic.

L'experiment dels biopunks. Tenim preguntes i no veiem el sentit d'esperar que algú altre les respongui. Armats amb la curiositat i el mètode científic, formulem i testem hipòtesis per trobar respostes a les preguntes que ens desperten de nit. Publiquem els nostres protocols i dissenys d'equips i compartim la nostra experiència de banc, de manera que de la nostra experiència els altres companys biopunks en puguin aprendre i ampliar els nostres mètodes, a més de reproduir els experiments que es confirmen validesa. Parafrasejant Eric Hughes, "El nostre treball és gratuït per a tots els usuaris a tot el món. No ens importa gaire si no aproveu els nostres temes de recerca." Ens estem basant en la feina dels Cypherpunks que van venir davant nostre per assegurar-nos que es dispersin àmpliament; la comunitat investigadora no es pot tancar.

Els biopunks lamentem les restriccions a la investigació independent, pel dret a arribar de manera independent a una comprensió del món al voltant d'un mateix és un dret humà fonamental. La curiositat no coneix límits ètnics, de gènere, edat ni socioeconòmics, sinó que l'oportunitat de satisfer aquesta curiositat massa sovint converteix en una oportunitat econòmica i volem trencar aquesta barrera. Un nen de tretze anys al sud del centre de Los Angeles té tant dret a investigar el món com una professora d'universitat. Si els termocicladors són massa cars per donar-ne un a totes les persones interessades, en dissenyarem uns més barats i ensenyarem a les persones com construir-los.

Els biopunks es fan responsables de la seva investigació. Tenim en compte que les nostres matèries d'interès són organismes vius dignes respecte i bon tracte, i som conscients que les nostres investigacions poden afectar els que ens envolten. Però nosaltres rebutjem de ple els amonestaments del principi de

precaució, que no és més que un intent paternalista de silenciar investigadors inspirant por al desconegut. Quan treballem, és així, tenint en compte la millora de la comunitat, i això inclou la nostra comunitat, la vostra comunitat i les comunitats de persones que mai no podrem conèixer. Us donem la benvinguda preguntes i no desitgem més que empoderar-vos perquè descobriu les respostes vosaltres mateixos.

Els biopunks ens dediquem activament a fer del món un lloc que tothom pugui entendre. Vine, anem a investigar junts.

Meredith Patterson, *Manifest biopunk*

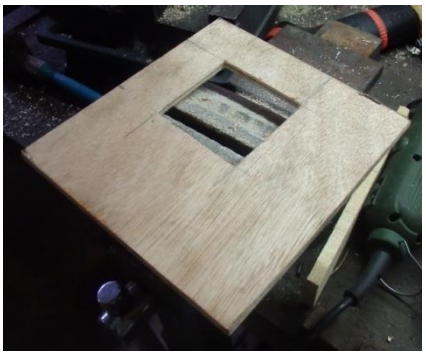
Annex 3: Fotografies

1. Construcció de la carcassa

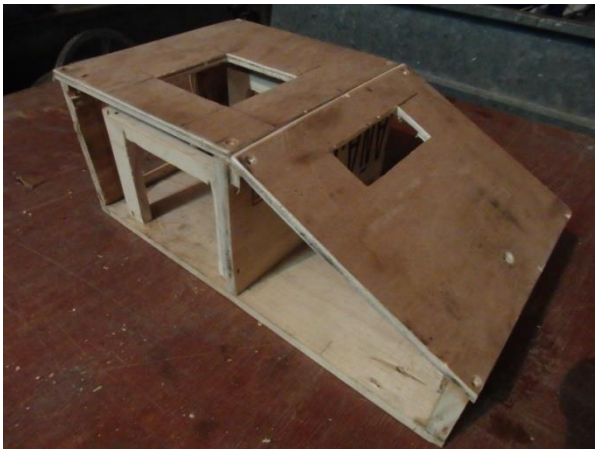
1. Fustes utilitzades en la construcció

2. Marcatge de les peces

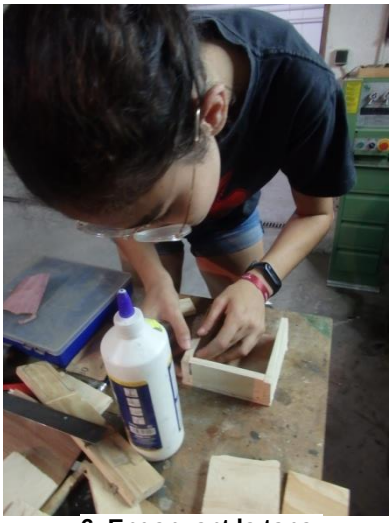
3. Tallant les fustes



4. Peça superior



5. Carcassa complerta



6. Enganxant la tapa

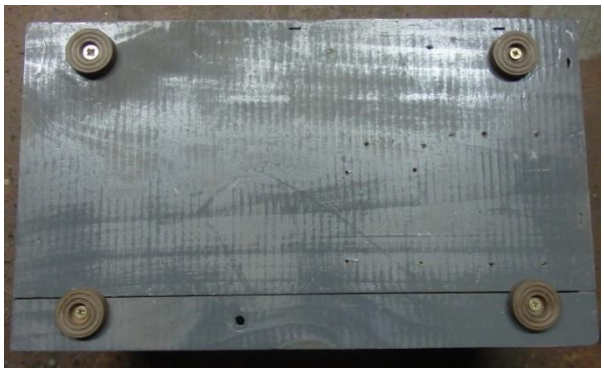
7. Tapa amb serjants per mantenir-se recte

8. Primera capa de pintura

9. Peces recent pintades

10. Metacrilat utilitzat en l'aparell

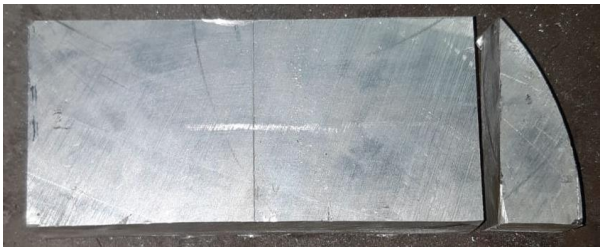
11. Peça inferior marcada amb el lloc de les plaques



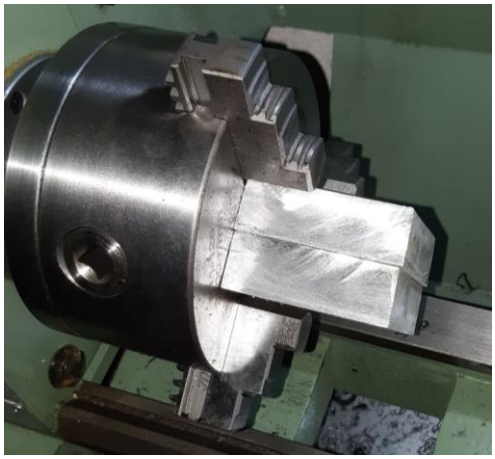
12. Base amb les potes

2. Construcció de la placa d'alumini inferior

13. Placa circular d'alumini

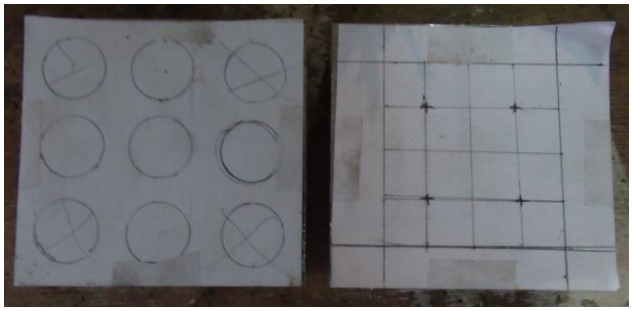


14. Placa tallada en forma rectangular

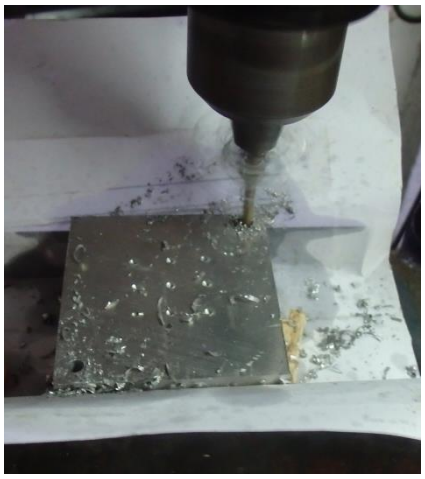


15. Plaques col·locades el torn

16. Tornejant les plaques

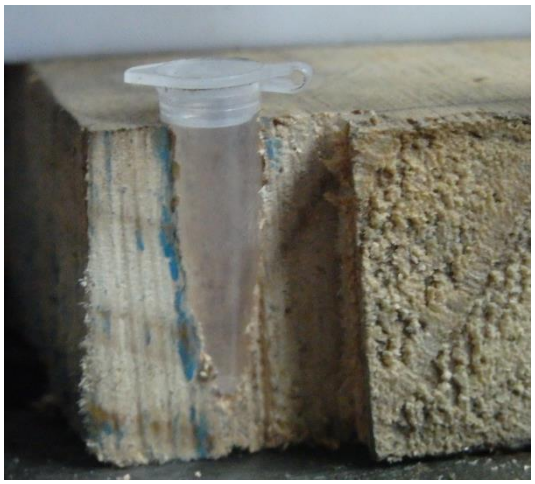


17. Dissenys de la col·locació dels *eppendorfs*



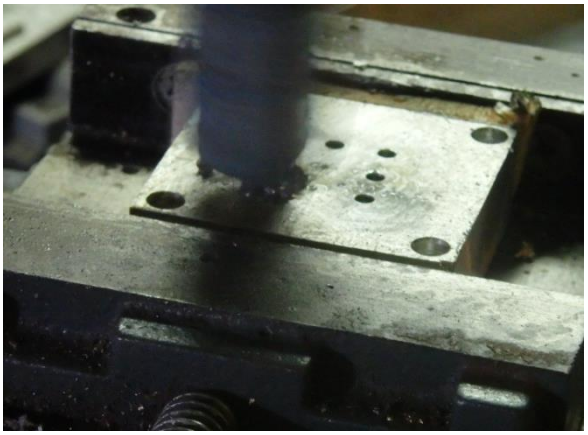
18. Fent els forats per cargolar la placa

19. La broca modificada

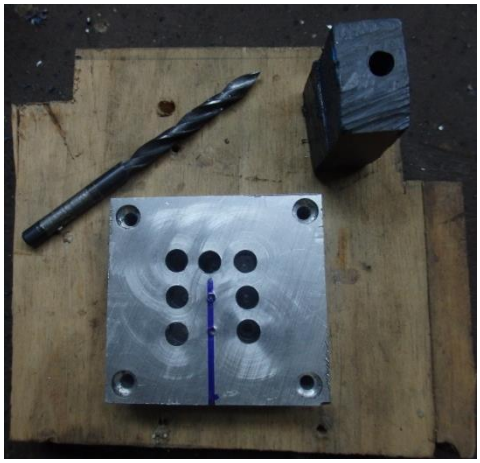


20. *Eppendorf* col·locat al forat fet per la broca

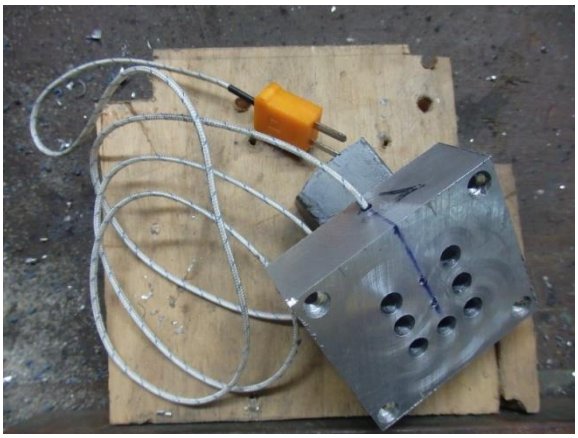
21. Peça de PVC travessant la broca



22. Broca foradant la placa



23. Broca, placa i peça de PVC utilitzades pel forat

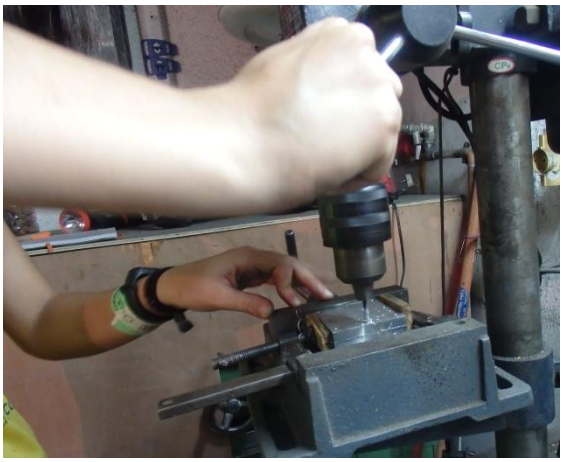


24.Placa d'alumini amb el sensor de temperatura

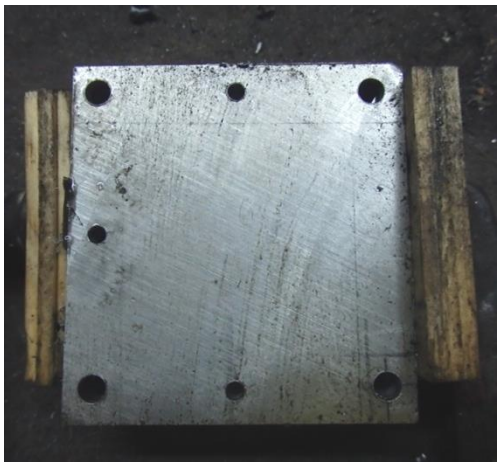
3. Construcció de la placa inferior

25. Marcant les plaques superiors

26. Marcant els forats de les plaques



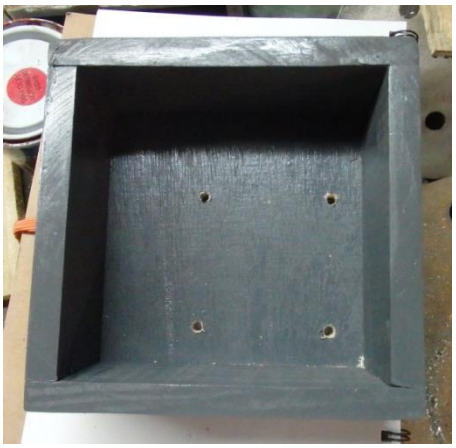
27. Foradant la placa per poder cargolar-la



28. Plaques foradades juntes

29. Placa gruixuda foradada en forma cònica

30. Placa gruixuda després de ser foradada



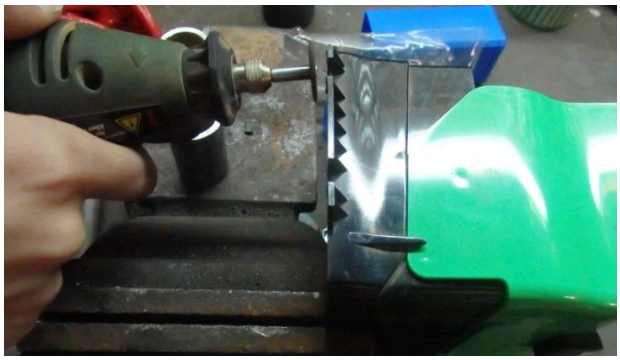
31. Tapa foradada per cargolar les plaques

32. Plaques superiors cargolades a la tapa

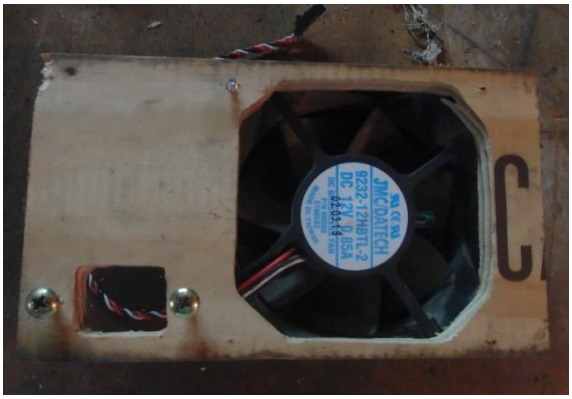
4. Sistema d'escalfament i refrigeració

33. Ordinador obert

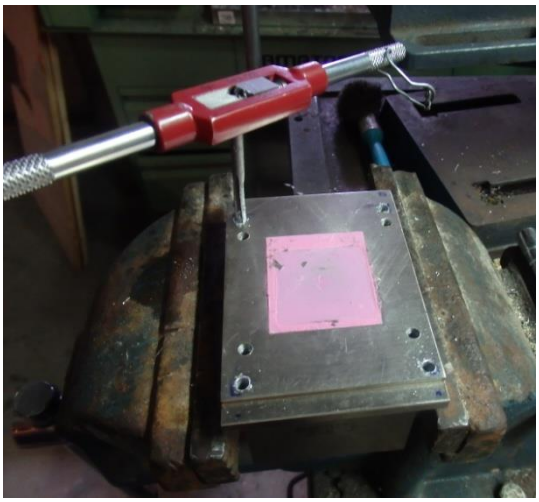
34. Dissipador i ventilador extrets de l'ordinador



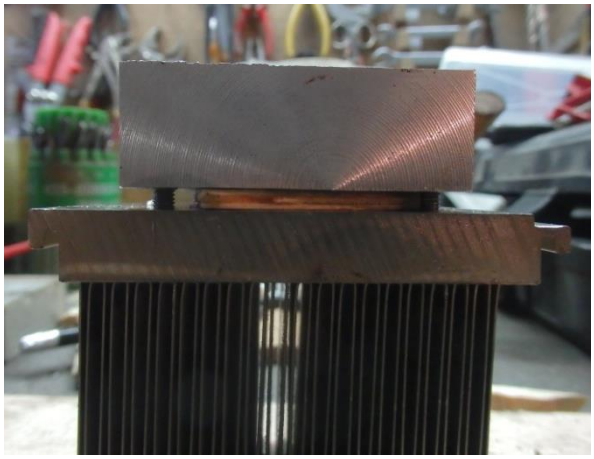
35. Extraient el ventilador de la carcassa



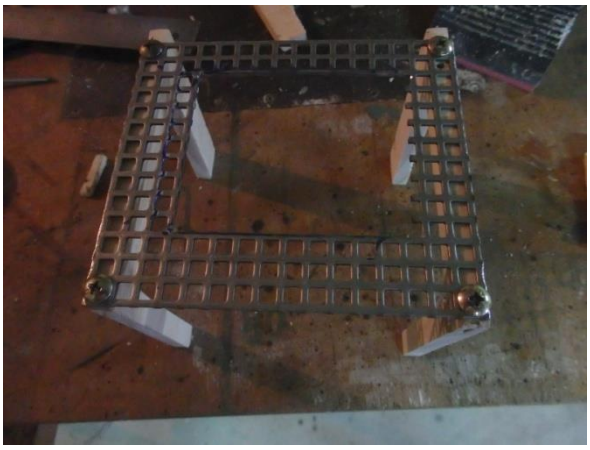
36. Ventilador col·locat a la peça del darrera



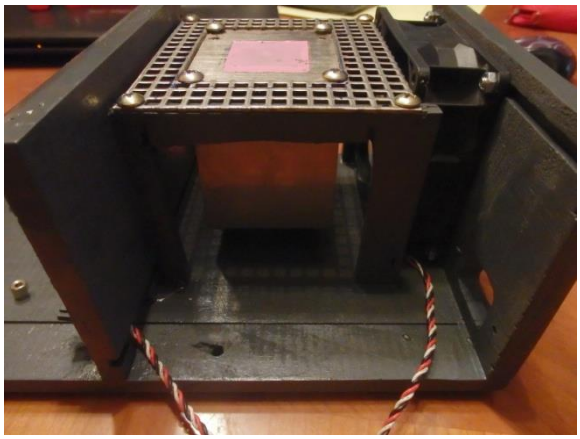
37. Fent la forma del cargol en el forat de dissipador



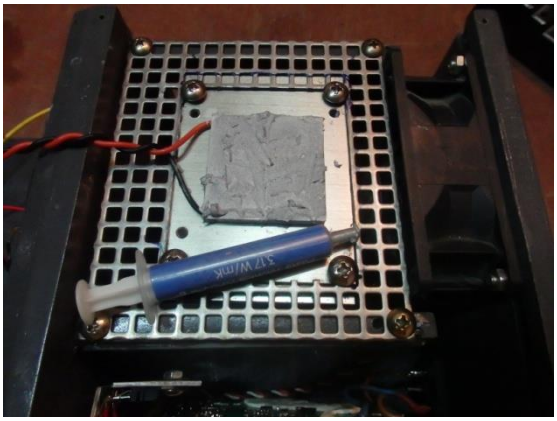
38. Placa inferior cargolada al dissipador



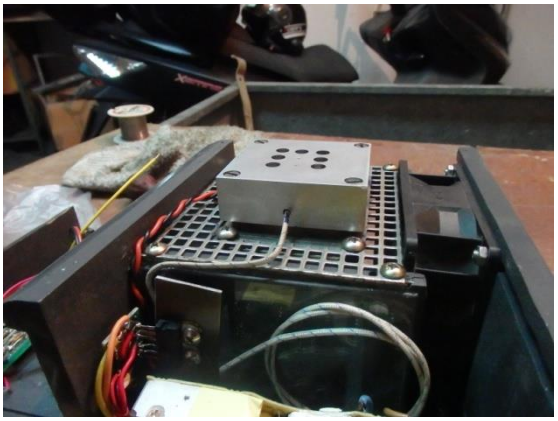
39. Estructura que aguanta el dissipador



40. Estructura i dissipador col·locats dins l'aparell

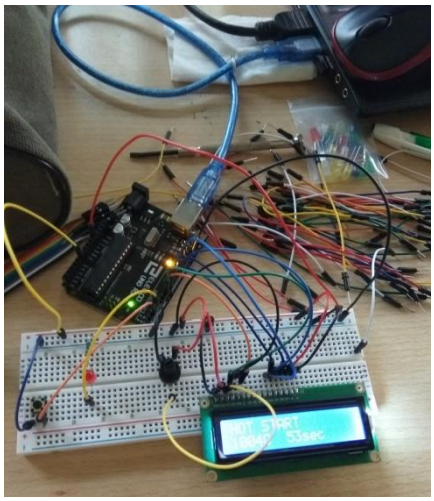


41. Cèl·lula de *peltier* coberta amb pasta tèrmica

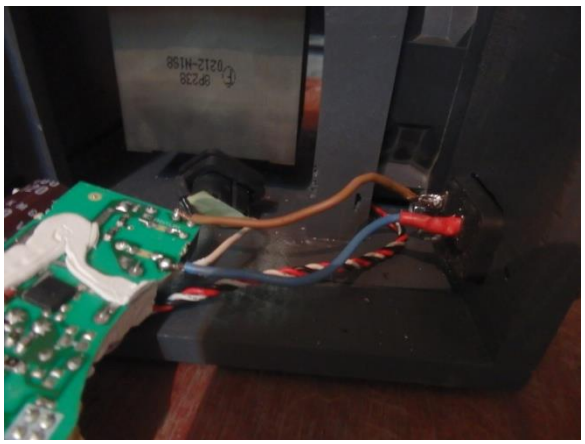


42. Sistema de refrigeració i escalfament col·locat

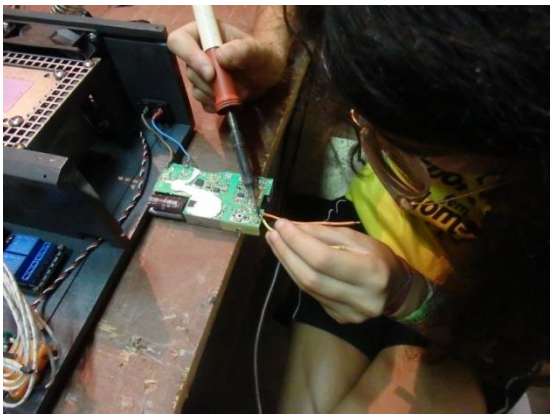
5. Part electrònica



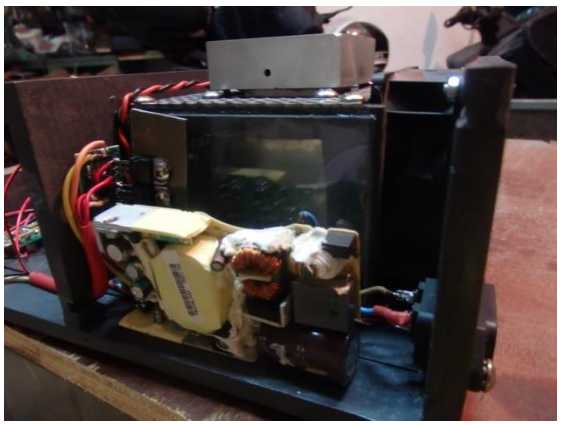
43. *Protoboard* amb el circuit de la pantalla



44. Font d'alimentació soldada a l'endoll



45. Soldant la font d'alimentació a la resta del circuit



46. Font d'alimentació col·locada i connectada

ANNEX 4: Programa del microcontrloador

```
// include the library code:  rev.7.ADRI.Cicles

// Llibreries necessaries pel funcionament intern del Arduino

#include <LiquidCrystal.h>          // controla la pantalla LCD

#include <TimerOne.h>               // controla el cronometre intern

#include <string.h>

// initialize the library with the numbers of the interface pins

LiquidCrystal lcd(7, 8, 9, 10, 11, 12);

volatile int boto, pitjant, pas_segon;

int temp_1, programa, temp_2,temp_max, temp_c;

double temp, temp_aux;

volatile unsigned int counter, cicles, counter_programa; // a de ser volatile per que treballara amb interrupcions

/*FI VARIABLES RESET PANTALLA*/

//Definició de pins de sortides

volatile char Pin_pulsador = 2;             // cable prim color verd -> pulsador vermell

char Pin_control_tapa = 3;          // cable verd -> control rele D, placa tapa

char Pin_control_placa = 4;         // cable rosa -> control rele C, control temperatura ependorf

char Pin_placa_negre = 5;           // cable negre -> control rele B, Normalment obert-> escalfa

char Pin_placa_vermell = 6;         // cable groc -> conrol rele A. normalment obert -> escalfa

// Definicio dels pins d'entrada

char Pin_temperatura_placa = A0;      // cable groc -> temperatura placa ependorfs

char Pin_temperatura_tapa = A1;       // cable groc -> temperatura tapa superior

//Definicio de les Constants que farem servir

int N_CICLES = 0;

int TEMPERATURA_MAX = 0;

int TEMPERATURA_ALINEAMENT = 0;

int TEMPERATURA_EXTENSIO = 0;

int TEMPERATURA_TAPA = 0 ;

int TEMPS_MAX = 0;
```

```
int TEMPS_DESNATURALITZAR = 0;

int TEMPS_EXTENSIO = 0;

int TEMPS_ALINEAMENT = 0;

int MAX_BITS = 1024;

int TEMPS_SP = 0;

// Inicialitzacio de la pantalla LCD, del temporitzador i pins de la placa Arduino

void setup() {

  Serial.begin(9600);                //estableix la velocitat de sortida del port serie a 9600 bits /segon

  Timer1.initialize(1000000);        // Dispara la alarma cada 1 segon

  Timer1.attachInterrupt(ISR_Timer); // Activa la interrupcion y la asocia a ISR_Timer. ISR_Timer es la nostra alarma

  boto = 1;

  lcd.begin(16, 2);              // configura la pantalla amb 2 columnes de 16 caracters

  //definicio d'entrades i sortides de la placa Arduino

  pinMode(Pin_pulsador, INPUT_PULLUP);        // entrada con a puls

  pinMode(Pin_temperatura_placa, INPUT);      // entrada

  pinMode(Pin_temperatura_tapa, INPUT);       // entrada

  pinMode(Pin_control_tapa, OUTPUT);          // sortida a rele D

  pinMode(Pin_control_placa, OUTPUT);         // sortida a rele C

  pinMode(Pin_placa_negre, OUTPUT);           // sortida a rele B

  pinMode(Pin_placa_vermell, OUTPUT);         // sortida a rele A

  //inicialitzem variables. Reles desactivats

  temp_max = 128;                        //ajust span a 105C

  temp = (double) temp_max / MAX_BITS;

  digitalWrite(Pin_control_placa,   HIGH);                    //   escalfament   placa   parada            LOW=activat(NO)(Led)
HIGH=Desactivat(NC)

  digitalWrite(Pin_placa_negre, HIGH);        // placa en posicio Arregredar  HIGH=Desactivar(NC)=Arrefredar

  digitalWrite(Pin_placa_vermell, HIGH);      // placa en posicio Arrefredar  HIGH=Desactivar(NC)=Arrefredar

  digitalWrite(Pin_control_tapa,   HIGH);                     //   escalfament   tapa   parada            LOW=activat(NO)(Led)
HIGH=Desactivat(NC) }

// Rutina de atenció a la alarma de temps "ISR_Timer()", accedeix en aquestes lÃ-nies de codi cada segon
```

```
void ISR_Timer()
{ counter = counter + 1;                    // suma 1 a counter
  boto = digitalRead(Pin_pulsador);         // llegeix el Pin del pulsador
  if (boto == 0)                            // si esta pulsat -> suma 1 a counter_programa i posa pitjat =1
  { counter_programa = counter_programa + 1;
    pitjant = 1; }
  else {                                    // si no, deixa counter_programa i pitjat com estaven
    counter_programa = 0;
    pitjant = 0; }
  pas_segon = 1; }
// loop(). Programa principal ciclic, va executanse donant tombs tota l'estona
void loop() {
  programa = 0;                             //
  lcd.clear();
  lcd.print("PCR-LauraSalvado");            // mostra texte inicial
  lcd.setCursor(0, 1);
  lcd.print("Selecciona Prog.");
  pitjant = 0;                              // borra pulsador
  counter_programa = 0;                     // borra contador programa
  // Bucle de seleccio del programa que es vol executar
  while (counter_programa < 5) {            // bucle de seleccio de programa
    boto = digitalRead(Pin_pulsador);
    if ((counter_programa >= 1) && (boto == 1) && (counter_programa <= 3) && (pitjant == 1))
    { if (programa == 0)
      { programa = 1;
        lcd.clear();
        lcd.print("Pr0:PCR_Test");
        lcd.setCursor(0, 1);
        lcd.print("Canvi 1s-Sel 5s");
```

```
    } else if (programa == 1)
    { programa = 2;
      lcd.clear();
      lcd.print("Pr1:PCR_Blat");
      lcd.setCursor(0, 1);
      lcd.print("Canvi 1s-Sel 5s");
    } else
    { programa = 0;
      lcd.clear();
      lcd.print("Pr2:PCR_Saliva");
      lcd.setCursor(0, 1);
      lcd.print("Canvi 1s-Sel 5s"); }
    pitjant = 0; } }
  // Definicio Parametres de control segons el programa selecconat
  // Programa PCR-Prog_0-Test
  if (programa == 1) {          //PCR_Test
    N_CICLES = 20;                  // 0 = 1 CICLE
    TEMPERATURA_TAPA = 0;
    TEMPERATURA_MAX = 95;
    TEMPS_MAX = 50;
    TEMPS_DESNATURALITZAR = 30;
    TEMPERATURA_ALINEAMENT = 66;
    TEMPS_ALINEAMENT = 45;
    TEMPERATURA_EXTENSIO = 72;
    TEMPS_EXTENSIO = 30;
  } else if (programa == 2) {    //PCR_Blat
    N_CICLES = 35;
    TEMPERATURA_TAPA = 00;
    TEMPERATURA_MAX = 95;
```

```
  TEMPS_MAX = 600;

  TEMPS_DESNATURALITZAR = 30;

  TEMPERATURA_ALINEAMENT = 66;

  TEMPS_ALINEAMENT = 45;

  TEMPERATURA_EXTENSIO = 72;

  TEMPS_EXTENSIO = 30;

} else if (programa == 0) {   //Prog 2:PCR_Saliva

  N_CICLES = 35;

  TEMPERATURA_TAPA = 100;//100

  TEMPERATURA_MAX = 95;

  TEMPS_MAX = 600;

  TEMPS_DESNATURALITZAR = 30;

  TEMPERATURA_ALINEAMENT = 64;

  TEMPS_ALINEAMENT = 30;   //45

  TEMPERATURA_EXTENSIO = 72;

  TEMPS_EXTENSIO = 45; }

// Inicia la execucio del programa seleccionat

// PAS 1 : HOT START

lcd.clear();

lcd.print("HOT START");

// Activa reles -> inicia escalfament

digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH);          // rele C a NC -> placa desconectada

digitalWrite(Pin_placa_negre, LOW);             // rele B a posicio escalfament

digitalWrite(Pin_placa_vermell, LOW);           // rele A a posicio escalfament

digitalWrite(Pin_control_placa, LOW);           // rele C a NO -> placa escalfant --> !ESCALFAR!

digitalWrite(Pin_control_tapa, LOW);            // rele D a NO -> tapa escalfant

TEMPS_SP = TEMPS_MAX;                           // valor SP temps per pantalla

counter = 0;                                    // comenca a contar el temps

while (counter < TEMPS_MAX) {
```

```
if (pas_segon == 1) {
  temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);      // llegim temperatura placa
  temp_aux = (double) temp_1;
  temp_c = (int)(temp_aux * temp);
  if (temp_c < TEMPERATURA_MAX ) {
    digitalWrite(Pin_control_placa, LOW); }        // si temperatura placa es baixa ->segueix escalfant placa
  if (temp_c > TEMPERATURA_MAX ) {
    digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH); }        // si temperatura placa es alta -> parar escalfament placa
  temp_2 = analogRead(Pin_temperatura_tapa);        // lleguim temperatura tapa
  temp_aux = (double) temp_2;
  temp_2 = (int)(temp_aux * temp);
  if (temp_2 < TEMPERATURA_TAPA - 1) {            // histeresis de 2 graus
    digitalWrite(Pin_control_tapa, LOW); }        //si temperatura tapa es baixa -> segueix escalfant tapa
  if (temp_2 > TEMPERATURA_TAPA + 1) {            //histeresis de 1 grau
    digitalWrite(Pin_control_tapa, HIGH); }         //si temperatura tapa es alta -> para escalfament tapa
  lcd.clear();
  lcd.print("HOT START");
  lcd.setCursor(10, 0);
  lcd.print("Tp=");                        // visualitza temperatura tapa
  lcd.print(temp_2);
  lcd.setCursor(0, 1);
  lcd.print(temp_c);                        //visualitza temperatura PLACA
  lcd.print("C");
  lcd.setCursor(5, 1);
  lcd.print(counter);
  lcd.print("s");
  lcd.setCursor(10, 1);
  lcd.print("SP=");
  lcd.print(TEMPS_SP);
```

```
    pas_segon = 0;
    Serial.print(cicles*3);
    Serial.print("\t");
    Serial.println ( temp_c); } }
// PAS 2: DESNATURALITZACIO
cicles = 1;
// iniciem el comptatje de cicles
while (cicles <= N_CICLES) {
  lcd.clear();
  lcd.print("DESNATURAL. c=");
  lcd.print(cicles);
  while (temp_c < TEMPERATURA_MAX) {  // esperem a que la placa arribi a la temperatura per comptar
    if (pas_segon == 1) {
      TEMPS_SP = 00;                // valor SP temps per pantalla, ralla per que depenem de la temperatura
      temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);      // lleguim temperatura placa
      temp_aux = (double) temp_1;
      temp_c = (int)(temp_aux * temp);
      digitalWrite(Pin_control_placa, LOW);          // seguim escalfant placa
      lcd.clear();
      lcd.print("DESNATURAL. c=");
      lcd.print(cicles);
      lcd.setCursor(0, 1);
      lcd.print(temp_c);                      //visualitza temperatura PLACA
      lcd.print("C");
      lcd.setCursor(10, 1);
      lcd.print("SP=");
      lcd.print(TEMPERATURA_MAX);
      lcd.print("C");
      pas_segon = 0;
```

```
    Serial.print(cicles*3);

    Serial.print("\t");

    Serial.println ( temp_c); } }

TEMPS_SP = TEMPS_DESNATURALITZAR;              // valor SP temps per pantalla

counter = 0;                                   // comen}em a comptar el temps

while (counter < TEMPS_DESNATURALITZAR) {

  if (pas_segon == 1) {

    temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);   // lleguim temperatura placa

    temp_aux = (double) temp_1;

    temp_c = (int)(temp_aux * temp);

    if (temp_c < TEMPERATURA_MAX ) {          // si temperatura es baixa

      digitalWrite(Pin_control_placa, LOW); }      // seguim escalfant placa

    if (temp_c > TEMPERATURA_MAX ) {          // si temperatura es alta

      digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH); }      // parar escalfament

    temp_2 = analogRead(Pin_temperatura_tapa);    // lleguim temperatura tapa

    temp_aux = (double) temp_2;

    temp_2 = (int)(temp_aux * temp);

    if (temp_2 < TEMPERATURA_TAPA - 1) {         // si temperatura es baixa

      digitalWrite(Pin_control_tapa, LOW); }             // seguim escalfant tapa

    if (temp_2 > TEMPERATURA_TAPA + 1) {         // si temperatura es alta

      digitalWrite(Pin_control_tapa, HIGH); }             // para escalfament

    lcd.clear();

    lcd.print("DESNATURAL. c=");

    lcd.print(cicles);

    lcd.setCursor(0, 1);

    lcd.print(temp_c);                      //visualitza temperatura PLACA

    lcd.print("C");

    lcd.setCursor(5, 1);

    lcd.print(counter);
```

```
    lcd.print("s");

    lcd.setCursor(10, 1);

    lcd.print("SP=");

    lcd.print(TEMPS_SP);

    pas_segon = 0;

    Serial.print(cicles*3);

  Serial.print("\t");

  Serial.println ( temp_c); } }

// PAS 3 : ALINEAMENT

lcd.clear();

lcd.print("ALINEAMENT  c=");

lcd.print(cicles);

//fem fred a la placa fins arrivar a Temperatura alineament. Despres farem escalfar a la placa

digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH);          // desconectem corrent a la placa

digitalWrite(Pin_placa_negre, HIGH);            // rele B posicio arrefredar

digitalWrite(Pin_placa_vermell, HIGH);          // rele A posicio arrefredar

digitalWrite(Pin_control_placa, LOW);          // activem corrent a la placa -->!ARREFREDA !

digitalWrite(Pin_control_tapa, LOW);           // activem escalfament tapa

while (temp_c > TEMPERATURA_ALINEAMENT) {        //si temperatura es la de alineament

  if (pas_segon == 1) {

    TEMPS_SP = 00;                              // valor SP temps per pantalla, ralla per que depenem de la temperatura

    temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);   //lleguim temperatura placa

    temp_aux = (double) temp_1;

    temp_c = (int)(temp_aux * temp);

    lcd.clear();

    lcd.print("ALINEAMENT  c=");

    lcd.print(cicles);

    lcd.setCursor(0, 1);

    lcd.print(temp_c);                    //visualitza temperatura PLACA
```

```
    lcd.print("C");
    lcd.setCursor(10, 1);
    lcd.print("SP=");
    lcd.print(TEMPERATURA_ALINEAMENT);
    lcd.print("C");
    pas_segon = 0;
    Serial.print(cicles*3);
  Serial.print("\t");
  Serial.println ( temp_c); } }
digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH);          // desconectem corrent a la placa
digitalWrite(Pin_placa_negre, LOW);             // rele B posicio escalfar
digitalWrite(Pin_placa_vermell, LOW);           // rele A posicio escalfar
digitalWrite(Pin_control_placa, LOW);           // activem corrent a la placa -->!ESCALFAR!
TEMPS_SP = TEMPS_ALINEAMENT;                    // valor SP temps per pantalla
counter = 0;
while (counter < TEMPS_ALINEAMENT) {
  if (pas_segon == 1) {
    temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);   //lleguim temperatura placa
    temp_aux = (double) temp_1;
    temp_c = (int)(temp_aux * temp);
    if (temp_c < TEMPERATURA_ALINEAMENT ) {   //si temperatura es baixa
      digitalWrite(Pin_control_placa, LOW); }     // seguim escalfant placa
    if (temp_c > TEMPERATURA_ALINEAMENT ) {   // si temperatura es alta
      digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH); }    // parar escalfament placa
    temp_2 = analogRead(Pin_temperatura_tapa);    // llegim temperatura tapa
    temp_aux = (double) temp_2;
    temp_2 = (int)(temp_aux * temp);
    if (temp_2 <= TEMPERATURA_TAPA - 1) {         // si es baixa
      digitalWrite(Pin_control_tapa, LOW); }       // seguim excalfant
```

```
    if (temp_2 >= TEMPERATURA_TAPA + 1) {        // si es alta
      digitalWrite(Pin_control_tapa, HIGH); }      // parar escalfament
        lcd.clear();
  lcd.print("ALINEAMENT  c=");
  lcd.print(cicles);
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print(temp_c);                    //visualitza temperatura PLACA
    lcd.print("C");
    lcd.setCursor(5, 1);
    lcd.print(counter);
    lcd.print("s");
    lcd.setCursor(10, 1);
    lcd.print("SP=");
    lcd.print(TEMPS_SP);
    pas_segon = 0;
    Serial.print(cicles*3);
  Serial.print("\t");
  Serial.println ( temp_c); } }
  // PAS 4: EXTENSIO
  lcd.clear();
  lcd.print("EXTENSIO    c=");
  lcd.print(cicles);
  TEMPS_SP = TEMPS_EXTENSIO;                    // valor SP temps per pantalla
  digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH);          // desconectem corrent a la placa
  digitalWrite(Pin_placa_negre, LOW);            // rele B posicio escalfar
  digitalWrite(Pin_placa_vermell, LOW);          // rele A posicio escalfar
  digitalWrite(Pin_control_placa, LOW);          // activem corrent a la placa -->!ESCALFAR!
  while (temp_c < TEMPERATURA_EXTENSIO) {                    //si temperatura es la de alineament
*********
    if (pas_segon == 1) {             // valor SP temps per pantalla, ralla per que depenem de la temperatura
```

```
    temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);   //lleguim temperatura placa

    temp_aux = (double) temp_1;

    temp_c = (int)(temp_aux * temp);

    lcd.clear();

    lcd.print("EXTENSIO    c=");

    lcd.print(cicles);

    lcd.setCursor(0, 1);

    lcd.print(temp_c);                    //visualitza temperatura PLACA

    lcd.print("C");

    lcd.setCursor(10, 1);

    lcd.print("SP=");

    lcd.print(TEMPERATURA_EXTENSIO);

    lcd.print("C");

    pas_segon = 0;

    Serial.print(cicles*3);

  Serial.print("\t");

  Serial.println ( temp_c); } }

counter = 0;

while (counter < TEMPS_EXTENSIO) {

  if (pas_segon == 1) {

    temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);    // llegim temperatura placa

    temp_aux = (double) temp_1;

    temp_c = (int)(temp_aux * temp);

    if (temp_c < TEMPERATURA_EXTENSIO ) {      //si temperatura baixa

      digitalWrite(Pin_control_placa, LOW); }     // segueix escalfant

    if (temp_c > TEMPERATURA_EXTENSIO ) {      //si temperatura alta

      digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH); }       // parar escalfament

    temp_2 = analogRead(Pin_temperatura_tapa);     // leguim temperatura tapa

    temp_aux = (double) temp_2;
```

```
    temp_2 = (int)(temp_aux * temp);
    if (temp_2 <= TEMPERATURA_TAPA - 1) {          //si temperatura baixa
      digitalWrite(Pin_control_tapa, LOW); }              //segueix escalfant tapa
    if (temp_2 >= TEMPERATURA_TAPA + 1) {          // si temperatura alta
      digitalWrite(Pin_control_tapa, HIGH); }             //parar escalfament tapa
    lcd.clear();
    lcd.print("EXTENSIO    c=");
    lcd.print(cicles);
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print(temp_c);                    //visualitza temperatura PLACA
    lcd.print("C");
    lcd.setCursor(5, 1);
    lcd.print(counter);
    lcd.print("s");
    lcd.setCursor(10, 1);
    lcd.print("SP=");
    lcd.print(TEMPS_SP);
    pas_segon = 0;
    Serial.print(cicles*3);
   Serial.print("\t");
   Serial.println ( temp_c); } }
  cicles = cicles + 1; }             // repetira aquest bucle fins a acabar el numero de cicles programat
// PAS 5: ELONGACIO FINAL. Mante la temperatura de Elongacio un temps mes
lcd.clear();
lcd.print("ELONGACIO FINAL");
TEMPS_SP = TEMPS_MAX;                          // valor SP temps per pantalla
counter = 0;
while (counter <  TEMPS_MAX) {
  if (pas_segon == 1) {
```

```
temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);     // lleguim temperatura placa

temp_aux = (double) temp_1;

temp_c = (int)(temp_aux * temp);

if (temp_c < TEMPERATURA_EXTENSIO ) {       // si es baixa

  digitalWrite(Pin_control_placa, LOW); }       // seguim escalfant la placa

if (temp_c > TEMPERATURA_EXTENSIO ) {       //si es alta

  digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH); }        //parar escalfament placa

temp_2 = analogRead(Pin_temperatura_tapa);      // lleguim temperatura tapa

temp_aux = (double) temp_2;

temp_2 = (int)(temp_aux * temp);

if (temp_2 <= TEMPERATURA_TAPA - 1) {           //si es baixa

  digitalWrite(Pin_control_tapa, LOW); }        // seguim escalfant tapa

if (temp_2 >= TEMPERATURA_TAPA + 1) {           //si es alta

  digitalWrite(Pin_control_tapa, HIGH); }         // parar escalfament tapa

lcd.clear();

lcd.print("ELONGACIO FINAL");

lcd.setCursor(0, 1);

lcd.print(temp_c);                      //visualitza temperatura PLACA

lcd.print("C");

lcd.setCursor(5, 1);

lcd.print(counter);

lcd.print("s");

lcd.setCursor(10, 1);

lcd.print("SP=");

lcd.print(TEMPS_SP);

pas_segon = 0;

Serial.print(cicles*3);

Serial.print("\t");

Serial.println ( temp_c); } }
```

```
// PAS 6: CONSERVACIO. Arrefredament FINS 40 graus

digitalWrite(Pin_control_placa, HIGH);          // desconectem corrent a la placa

digitalWrite(Pin_placa_negre, HIGH);            // rele B posicio arrefredar

digitalWrite(Pin_placa_vermell, HIGH);          // rele A posicio arrefredar

digitalWrite(Pin_control_placa, LOW);          // activem corrent a la placa -->!ARREFREDA !

digitalWrite(Pin_control_tapa, HIGH);          // parar escalfament tapa

lcd.clear();

lcd.print("CONSERVACIO");

temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);       //lleguim temperatura placa

temp_aux = (double) temp_1;

temp_c = (int)(temp_aux * temp);

TEMPS_SP = 40;                              // valor SP temps per pantalla

pas_segon = 0;

while (temp_c >= 40) {                          // si la placa esta mes alta que 40 graus

  temp_1 = analogRead(Pin_temperatura_placa);       //segueix lleguint

  temp_aux = (double) temp_1;

  temp_c = (int)(temp_aux * temp);

  if (pas_segon == 1)

  { lcd.clear();

      lcd.print("CONSERVACIO");

    lcd.setCursor(0, 1);

    lcd.print("Placa=");

    lcd.print(temp_c);

    lcd.print("C");

    pas_segon = 0;

    Serial.print(cicles*3);

    Serial.print("\t");

    Serial.println ( temp_c); } }

temp_2 = analogRead(Pin_temperatura_tapa);      // lleguim temperatura tapa
```

```
temp_aux = (double) temp_2;

temp_2 = (int)(temp_aux * temp);

while (temp_2 >= 70) {                    // si es mes alta que 70 graus

  temp_2 = analogRead(Pin_temperatura_tapa);    //segueix lleguint

  temp_aux = (double) temp_2;

  temp_2 = (int)(temp_aux * temp);

  if (pas_segon == 1)

  {         lcd.clear();

      lcd.print("CONSERVACIO");

    lcd.setCursor(0, 1);

    lcd.print("Tapa=");

    lcd.print(temp_2);

    lcd.print("C");

    pas_segon = 0;

    Serial.print(cicles*3);

    Serial.print("\t");

    Serial.println ( temp_c); } }

lcd.clear();

lcd.print("Recull la mostra");

lcd.setCursor(0, 1);

lcd.print("Pitja per tornar");

boto = digitalRead(Pin_pulsador);

while (boto == 1) {

  boto = digitalRead(Pin_pulsador); } }
```