



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0817985-9 A2



(22) Data do Depósito: 13/10/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 22/12/2020

(54) Título: DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR

(51) Int. Cl.: G01N 33/48.

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2007 IN 02313/CHE/2007; 12/10/2007 IN 02312/CHE/2007; 12/10/2007 IN 02314/CHE/2007; 12/10/2007 IN 02311/CHE/2007; 15/10/2007 IN 02328/CHE/2007.

(71) Depositante(es): BIGTEC PRIVATE LIMITED.

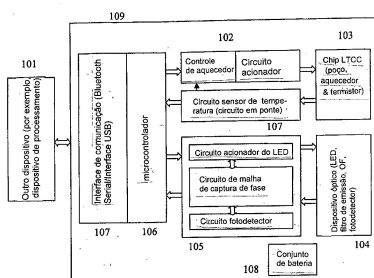
(72) Inventor(es): KUMAR, KISHORE, KRISHNA; JAYARAMAN, RAVIPRAKASH; NARASIMHA, SANKARANAND, KAIPA; RADHAKRISHNAN, RENJITH, MAHILADEVI; VISWANATHAN, SATHYADEEP; NAIR, CHANDRASEKHAR, BRASKARAN; SUBBARAO, PILLARISETTI, VENKATA; JAGANNATH, MANJULA; CHENNAKRISHNAIAH, SHILPA; MONDAL, SUDIP; VENKATARAMAN, VENKATAKRISHNAN.

(86) Pedido PCT: PCT IN2008000665 de 13/10/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/047804 de 16/04/2009

(85) Data da Fase Nacional: 12/04/2010

(57) Resumo: MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO. Invenção sobre um microdispositivo PCR de mão incluindo um microchip PCR LTCC contendo um aquecedor, uma câmara de reação para carregar uma amostra. Também inclui um controle de aquecedor para regular o aquecedor com base na entrada recebida de um sensor de temperatura. Tem ainda um sistema óptico contendo uma fibra óptica para detectar um sinal de fluorescência da amostra e pelo menos uma interface de comunicação para interagir com os outro(s) dispositivo(s).



MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO

ÁREA DA INVENÇÃO

Esta invenção se relaciona a um sistema PCR portátil em tempo real com microchip PCR descartável de cerâmica co-sinterizada a baixas temperaturas (LTCC). A
5 invenção descreve ainda um método para controlar e monitorar o micro-PCR e o aparelho envolvido para PCR.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Nos últimos cinco anos, a pesquisa e o desenvolvimento para sistemas de diagnóstico clínico com base em tecnologias de microlaboratório ("lab-on-a-chip")
10 cresceram bastante. Tais sistemas são uma grande promessa para diagnósticos clínicos. Eles consomem material de amostra e reagentes somente em volumes muito pequenos. Pequenos chips individuais podem ser baratos e descartáveis. O prazo entre a amostragem e o resultado tende a ser bastante curto. Os projetos mais avançados de chip podem realizar todas as funções analíticas – amostragem, pré-
15 tratamento de amostra; etapas de separação, diluição e mistura; reações químicas; e detecção – em um único circuito microfluídico integrado. Sistemas de microlaboratório permitem aos projetistas criar instrumentos de diagnósticos pequenos, portáteis, robusto, de baixo custo e uso fácil, que oferecem altos níveis de capacidade e versatilidade. Microfluídicos – fluidos que fluem em microcanais
20 possibilitam o projeto de dispositivos analíticos e formatos de ensaio que não funcionariam em mais larga escala.

As tecnologias de microlaboratórios permitem emular os procedimentos de laboratório que seriam realizados em uma amostra dentro de uma estrutura microfabricada. Os dispositivos mais bem sucedidos foram aqueles que funcionam
25 em amostras de fluidos. Um grande número de procedimentos de processamento

químico, purificação e reação foram demonstrados nesses dispositivos. Algum grau de integração monolítica de processos químicos demonstrou produzir dispositivos que realizam um procedimento completo de mensuração química. Esses dispositivos se baseiam em procedimentos laboratoriais aceitos de análise e assim conseguem
5 acomodar matrizes de amostras mais complexas do que sensor químico convencional.

Os recentes avanços em biologia molecular e celular foram produzidos, em grande parte, como resultado do desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas e eficientes. Graças à miniaturização e multiplexação, técnicas como chip genético ou
10 biochip permitem a caracterização de genomas completos em uma única configuração experimental. PCR (reação em cadeia da polimerase) é um método de biologia molecular para amplificação in vivo de moléculas de ácido nuclear. A técnica PCR está substituindo rapidamente outras técnicas demoradas e menos sensíveis para identificação de espécies biológicas e patógenos em amostras forenses,
15 ambientais, clínicas e industriais. Entre as biotécnicas, PCR se tornou a etapa analítica mais importante nos laboratórios de ciências biológicas para um grande número de diagnósticos moleculares e clínicos. Desenvolvimentos importantes feitos na tecnologia PCR, como PCR em tempo real, levaram a processos de reação rápida em comparação com métodos convencionais. Durante vários anos, a
20 tecnologia de microfabricação vem se expandindo para a miniaturização do sistema de análise e reação tal como análise PCR com intenção de reduzir ainda mais o tempo de análise e o consumo de reagentes.

Na maioria dos PCRs hoje disponíveis, não são possíveis mudanças instantâneas de temperatura em razão das capacidades de amostra, recipiente e calor do
25 ciclador, e como resultado têm-se maiores tempos de amplificação de 2 a 6 horas.

Durante os períodos em que a temperatura da amostra está em transição, ocorrem reações estranhas e indesejáveis que consomem reagentes importantes e criam compostos interferentes indesejados.

LTCC é usada na embalagem de dispositivos semicondutores. Este sistema permite a integração da função elétrica e estrutural. A sequência de fabricação camada por camada no processo de fabricação LTCC permite a criação de estruturas tridimensionais com elementos elétricos integrados com facilidade. Além disso, o processamento é mais barato em comparação com o de silício. Um chip é fabricado com substrato de cerâmica como LTCC (Cerâmica Co-sinterizada a Baixas Temperaturas), o que permite a integração de elementos mecânicos e eletrônicos de forma fácil e barata.

O uso de uma plataforma de computação portátil como PDA dá ao sistema poder de computação suficiente para controlar os componentes eletrônicos e fornecer uma interface de usuário versátil, porém simples, para exibir os dados. Isso também torna o sistema todo modular e assim permite fácil upgrade com custo mínimo para o usuário.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

O principal objetivo da invenção é desenvolver um microdispositivo PCR de mão. Outro objetivo da presente invenção é ainda o de desenvolver um método para monitorar o microdispositivo PCR de mão.

DECLARAÇÃO DA INVENÇÃO

Assim, a invenção fornece um microdispositivo PCR de mão incluindo: um microchip PCR de LTCC incluindo um aquecedor, uma câmara de reação para carga de uma amostra, um controle de aquecedor para regular o aquecedor com base na entrada recebida de um sensor de temperatura, um sistema de detecção óptica para detectar

um sinal fluorescente da amostra e pelo menos uma interface de comunicação para interagir com outro(s) dispositivo(s); e também fornece um método para monitorar e controlar o microdispositivo PCR de mão, tal método incluindo os passos: estabelecimento de comunicação entre o microdispositivo PCR de mão e outro dispositivo através de uma interface de comunicação, iniciando um processo de ciclagem térmica com base em valores de perfil térmico recebidos do outro dispositivo para controlar um microchip PCR LTCC e envio de sinal óptico detectado por sistema óptico ao outro dispositivo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS ANEXOS

10 A invenção será descrita agora com referência aos desenhos anexos:

A figura 1 mostra um esquema de configuração do microdispositivo PCR LTCC de acordo com esta invenção.

A figura 2 mostra uma visão ortográfica de uma configuração do microchip PCR LTCC.

15 A figura 3 mostra uma visão de corte transversal de uma configuração do microchip PCR LTCC.

A figura 4 mostra um desenho em camadas de uma configuração do microchip PCR LTCC.

A figura 5 mostra um modelo do desenho fabricado da câmara de reação do chip.

20 A figura 6 mostra um sistema de detecção óptica bifurcado usando fibra óptica bifurcada.

A figura 7 mostra um diagrama de bloco do circuito que controla o aquecedor e o sensor de temperatura.

A figura 8 mostra a fusão do fragmento de DNA de lambda-636 usando o aquecedor/termistor integrado, controlado pela unidade de mão.

25

A Figura 9 mostra a amplificação PCR do fragmento de DNA de lambda-311 no chip, (a) Sinal de fluorescência de tempo real vindo do chip; (b) Imagem do gel confirmando o produto da amplificação.

A figura 10 mostra uma imagem do gel da amplificação do PCR processado de sangue processado e plasma para a unidade ribossômica 16S de Salmonella.

A figura 11 mostra uma imagem do gel da amplificação do PCR direto de sangue para a unidade ribossômica 16S de Salmonella.

A figura 12 mostra uma imagem do gel da amplificação do PCR direto de plasma para a unidade ribossômica 16S de Salmonella.

10 A figura 13 mostra a amplificação PCR do gene da Salmonella usando microchip, (a) Sinal de fluorescência de tempo real do chip; (b) Imagem do gel confirmando o produto da amplificação.

A figura 14 mostra o tempo que se levou para amplificar o DNA Viral da Hepatite B usando o chip LTCC.

15 A Figura 15 mostra uma visão geral da aplicação do Assistente Digital Pessoal (PDA) comunicando-se com a unidade de mão.

A figura 16 mostra uma curva de fusão obtida pelo uso de um chip LTCC para derivada do sinal de fluorescência para a fusão do DNA λ -311.

A figura 17 mostra um fluxograma do programa de ciclagem térmica que roda no PDA.

A figura 18 mostra o sinal de fluorescência em tempo real do DNA HBV amplificado usando microchip.

A figura 19 mostra um sistema de detecção óptica usando divisor de feixe.

A figura 20 mostra um sistema de detecção óptica híbrido.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se relaciona a um microdispositivo PCR de mão incluindo:

a) um microchip PCR LTCC incluindo um aquecedor, uma câmara de reação para carregar uma amostra,

b) um controle de aquecedor para regular o aquecedor com base na entrada
5 recebida de um sensor de temperatura.

c) um sistema de detecção óptica para detectar um sinal de fluorescência da amostra, e

d) pelo menos uma interface de comunicação para interagir com outro(s) dispositivo(s).

10 Em uma configuração da presente invenção, pelo menos uma camada condutora é fornecida entre o aquecedor e a câmara de reação.

Em uma configuração da presente invenção a câmara de reação é cercada por anéis condutores.

Em uma configuração da presente invenção os anéis condutores são conectados à
15 camada condutora por pilares.

Em uma configuração da presente invenção o condutor é feito de um material selecionado de um grupo incluindo ouro, prata, platina e paládio ou ligas destes.

Em uma configuração da presente invenção o sensor de temperatura é colocado fora do chip para medir sua temperatura.

20 Em uma configuração da presente invenção o sensor de temperatura está embutido em pelo menos uma camada do chip.

Em uma configuração da presente invenção, o sensor de temperatura é um termistor.

Em uma configuração da presente invenção, o sensor de temperatura está
25 conectado como um braço de um circuito em ponte.

Em uma configuração da presente invenção, a saída do circuito em ponte é amplificada antes de ser alimentada ao controle de aquecedor para regular o aquecedor.

Em uma configuração da presente invenção o chip inclui uma tampa de vedação
5 transparente para cobrir a câmara de reação.

Em uma configuração da presente invenção o chip é descartável.

Em uma configuração da presente invenção, o sistema de detecção óptica é selecionado de um grupo incluindo um sistema de detecção óptica de divisor de feixe, um sistema de divisão óptica híbrido e um sistema de divisão óptica bifurcado.

10 Em uma configuração da presente invenção, o sistema óptico inclui uma fonte de luz e um fotodetector para detectar um sinal fluorescente da amostra.

Em uma configuração da presente invenção, um amplificador lock-in amplifica o sinal detectado.

Em uma configuração da presente invenção o sistema óptico bifurcado usa uma
15 fibra óptica bifurcada com a fonte da luz colocada em uma extremidade bifurcada (605a) e o fotodetector colocado na outra extremidade bifurcada (605a) da fibra óptica.

Em uma configuração da presente invenção a extremidade comum (605b) da fibra óptica bifurcada aponta para a amostra.

20 Em uma configuração da presente invenção o sistema híbrido de detecção óptica usa fibra óptica para direcionar a luz para a amostra.

Em uma configuração da presente invenção o sistema híbrido de detecção óptica usa lentes para focar o fecho emitido da amostra.

Em uma configuração da presente invenção a interface de comunicação é
25 selecionada de um grupo incluindo serial, USB, Bluetooth ou combinações destes.

Em uma configuração da presente invenção o outro dispositivo coleta a temperatura do chip e o sinal amplificado do dispositivo de mão.

Em uma configuração da presente invenção, o outro dispositivo é selecionado de um grupo incluindo smart phone, PDA e dispositivo programável.

5 A presente invenção também se relaciona a um método para monitorar e controlar o microdispositivo PCR de mão, tal método incluindo os passos:

a) estabelecer uma comunicação entre o microdispositivo PCR de mão e outro dispositivo através de uma interface de comunicação,

b) iniciar um processo de ciclagem térmica com base nos valores de perfil térmico
10 recebidos do outro dispositivo para controlar um microchip PCR LTCC, e

c) enviar um sinal óptico detectado pelo sistema óptico para o outro dispositivo.

Em uma configuração da presente invenção, enviar os valores de perfil térmico para o outro dispositivo por um usuário através da interface de usuário.

Em uma configuração da presente invenção, criar, modificar ou excluir os perfis
15 térmicos através da interface de usuário.

Em uma configuração da presente invenção o outro dispositivo fornece autenticação do usuário.

Em uma configuração da presente invenção o outro dispositivo armazena uma diversidade de perfis térmicos.

20 Em uma configuração da presente invenção o perfil térmico fornece o valor de ponto de ajuste e número de ciclos.

Em uma configuração da presente invenção, manter o chip a uma temperatura e pelo tempo determinado pelo valor de ponto de ajuste.

Em uma configuração da presente invenção, trazer a temperatura do microchip PCR
25 para a temperatura ambiente interrompendo o processo de ciclagem térmica.

Em uma configuração da presente invenção, manter a temperatura do microchip PCR constante quando o ciclo térmico estiver interrompido.

Em uma configuração da presente invenção, comunicar-se com o outro dispositivo, usando a pilha de perfil de porta serial Bluetooth.

- 5 Em uma configuração da presente invenção, representação dos dados térmicos e ópticos em uma unidade de display do outro dispositivo.

Os outros dispositivos (101) são aqueles capazes de interagir com o dispositivo de mão através de qualquer interface de comunicação padrão (107), como por exemplo, com fio (porta serial RS232, USB) ou sem fio (Bluetooth implementando

- 10 um perfil de porta serial), etc.

Microchip PCR LTCC é um chip PCR feito de camadas LTCC. Este chip pode ser facilmente preso ou removido da unidade de mão.

O perfil térmico mostra a temperatura e o tempo que são os valores de ponto de ajuste, bem como a contagem de número de ciclos para concluir um processo de

- 15 ciclo térmico.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica descoberta para sintetizar múltiplas cópias de um fragmento específico de DNA de um modelo. O processo PCR original se baseia na enzima de polimerase de DNA de calor estável de *Thermus aquaticus* (Taq), que pode sintetizar uma fita complementar a uma

20 determinada fita de DNA em uma mistura contendo quatro bases de DNA e dois fragmentos de DNA iniciador ladeando a sequência alvo. A mistura é aquecida para separar as fitas de DNA de dupla hélice contendo a sequência alvo e depois resfriada para permitir aos iniciadores que encontrem e se liguem às sequências complementares nas fitas separadas e que a polimerase Taq estenda os iniciadores

25 em novas fitas complementares. Ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento

multiplicam o DNA alvo exponencialmente, já que cada nova fita dupla se separa para tornar-se dois modelos para síntese subsequente.

Um perfil de temperatura típico para a reação em cadeia da polimerase é como segue:

- 5 1. Desnaturação a 93°C por 15 a 30 segundos
2. Recozimento do iniciador a 55°C para 15 a 30 segundos
3. Extensão dos iniciadores a 72°C por 30 a 60 segundos

Como exemplo, na primeira etapa, a solução é aquecida a 90-95°C de forma que o modelo de dupla fita se funde ("desnatura") para formar duas fitas individuais. No
10 próximo passo, ela é resfriada para 50-55°C de forma que pequenos fragmentos de DNA especialmente sintetizados ("iniciadores") se unem à seção complementar apropriada do modelo ("recozimento"). Finalmente, a solução é aquecida a 72°C quando uma enzima específica ("DNA polimerase") estende os iniciadores unindo bases complementares da solução. Assim, duas fitas duplas idênticas são
15 sintetizadas a partir de uma única fita dupla.

A etapa de extensão do iniciador tem que ser aumentada em aproximadamente 60seg/kbase para gerar produtos mais longos do que algumas centenas de bases. Os tempos acima são típicos para instrumentação; na verdade, as etapas de desnaturação e recozimento acontecem quase instantaneamente, mas os índices de
20 temperatura em instrumentos comerciais são menores do que 1°C/seg quando são usados blocos de metal ou água para equilíbrio térmico e são colocadas amostras nos tubos plásticos de microcentrifugação.

Efetuando-se a microusinagem de câmaras PCR de baixa massa termicamente isoladas, é possível produzir em massa um instrumento PCR mais específico e com
25 uso mais eficiente de energia. Além disso, as rápidas transições de uma temperatura

para outra asseguram que a amostra permaneça um tempo mínimo em temperaturas intermediárias indesejadas, de forma que o DNA amplificado venha a ter fidelidade e pureza ideais.

Cerâmica Co-sinterizada a Baixas Temperaturas (LTCC) é a versão moderna da tecnologia de película espessa que é usada na embalagem de componentes eletrônicos para a indústria automotiva, de defesa, aeroespacial e de telecomunicações. É um material vítreo de cerâmica com base em alumina que é quimicamente inerte, biocompatível, termicamente estável condução térmica ($>600^{\circ}\text{C}$), com baixa condução térmica ($<3\text{W/mK}$), boa força mecânica e proporciona boa hermeticidade. É convencionalmente usada na embalagem de dispositivos eletrônicos em nível de chip onde realizam funções estruturais e elétricas. Os presentes inventores reconheceram a adequação da LTCC para ser usada em aplicações de microchip PCR e, tanto quanto os inventores saibam, a LTCC não foi usada antes para tal objetivo. Os substratos básicos na tecnologia LTCC são, de preferência, camadas não queimadas (verdes) de material vítreo de cerâmica com um aglomerante polimérico. As características estruturais são formadas pelo corte/punção/perfuração dessas camadas e empilhamento de camadas múltiplas. O processo camada por camada possibilita a criação de componentes tridimensionais essenciais para MEMS (Microssistemas Eletromecânicos). Componentes tão pequenos quanto 50 microns podem ser prontamente fabricados em LTCC. Circuitos elétricos são fabricados serigrafando-se uma pasta condutora e resistiva em cada camada. As múltiplas camadas são interconectadas pela punção de vias e preenchimento das mesmas com a pasta condutora. Essas camadas são empilhadas, comprimidas e queimadas. A literatura registra o processamento de pilhas de até 80 camadas. O material queimado é

denso e possui boa força mecânica.

A Figura 1 mostra um esquema de uma configuração do Microdispositivo PCR indicando vários componentes e suas funções. O dispositivo é composto de um microchip PCR LTCC descartável (103), que possui uma câmara de reação para
5 conter a amostra com um aquecedor embutido e um sensor de temperatura embutido para ciclagem térmica. O sensor de temperatura é um termistor. O sensor de temperatura também pode ser colocado fora do chip em vez de embutido do lado de dentro. O sensor de temperatura pode ser qualquer sensor capaz de medir a temperatura. O microchip PCR LTCC (103) faz interface com uma unidade eletrônica
10 de mão (109) incluindo o circuito de controle (102) com um controle de aquecedor e circuito condutor, o qual controla o aquecedor com base no valor do sensor de temperatura. O valor do sensor de temperatura é alimentado no controle de aquecedor através de um circuito de percepção de temperatura (107). O controle de aquecedor ajusta a temperatura do chip e mantém a temperatura por um período
15 fornecido por um microcontrolador (106) como valores de ponto de ajuste. Todos os componentes da unidade de mão (109) são energizados por um conjunto de bateria (108).

O dispositivo de mão (109) também contém um sistema óptico (104) para detecção de sinais de fluorescência do microchip PCR (103). Isso inclui fonte de luz, um
20 circuito para controlar a fonte de luz, detector para perceber a luz emitida da amostra, um circuito para amplificação do sinal (da amostra). O dispositivo de mão (109) fará interface com outro dispositivo de processamento (101) como USB/Bluetooth para um smart phone/PDA ou qualquer dispositivo de processamento para aquisição e controle de dados.

25 As baterias podem ser acessíveis, com uma porta fornecida para se recarregarem a

partir de fontes externas. Por exemplo, as baterias poderiam ser de níquel-cádmio, íon lítio ou polímero que possam fornecer corrente de pico acima de 1A.

O dispositivo de mão também inclui pelo menos uma interface de comunicação (107) para se comunicar com os demais dispositivos (101). A interface de comunicação (107) pode ser com fio (porta serial RS232, USB) ou sem fio (Bluetooth implementando um perfil de porta serial). Tipicamente, o perfil de porta serial é usado para comunicação em razão de sua velocidade e facilidade de implementação. A interface transfere dados e instruções entre o outro dispositivo (101) e o microcontrolador (106).

- 10 Os outros dispositivos (101) aqui são aqueles capazes de controlar e monitorar o dispositivo de mão. Por exemplo, o outro dispositivo poderia ser um PDA, smart phone, computador, microcontrolador ou qualquer dispositivo de processamento capaz de se comunicar com o dispositivo de mão. O outro dispositivo também fornece uma interface de usuário para entrada e visualização de dados pelo usuário.
- 15 O outro dispositivo aqui referido tem capacidade de rodar o software relevante para comunicar-se, controlar e monitorar o dispositivo de mão (109).

Um microcontrolador (106) controla os componentes eletrônicos no dispositivo de mão (109) e se comunica com o outro dispositivo (101) através de uma interface. O microcontrolador possui um conversor analógico-digital, digital-analógico para

20 interagir com o circuito analógico, isto é, o circuito de controle (102), circuito de percepção de temperatura (107) e circuito óptico (105). O microcontrolador (106) coleta os valores de ponto de ajuste do outro dispositivo e fornece-os ao circuito de controle (102). O microcontrolador também fornece a temperatura captada pelo circuito de percepção de temperatura (107) e os dados ópticos fornecidos pelo

25 circuito óptico (105) ao outro dispositivo. Os dados ópticos são o sinal detectado

pelo sistema óptico (105).

A figura 2 mostra uma visão ortográfica de uma configuração do microchip PCR indicando a câmara de reação (201) ou poço. A figura indica a montagem do aquecedor (201) e um termistor sensor de temperatura (203) dentro do microchip PCR LTCC. Também são indicadas as linhas condutoras do aquecedor (205) e as linhas condutoras do termistor (204). Essas linhas condutoras irão ajudar a fornecer conexão ao aquecedor e o termistor embutidos no chip com sistema de circuito externo.

Faz-se referência à Figura 3, que mostra uma visão de corte transversal de uma configuração do microchip PCR LTCC em que (206a & 206b) indicam as almofadas de contato para o aquecedor (202) e (207a & 207b) indicam a almofada de contato para o termistor (203).

Faz-se referência à Figura 4, que mostra um projeto por camadas de uma configuração de microchip PCR LTCC em que o chip é composto de 12 camadas de fitas LTCC. Há duas camadas de base (401), três camadas intermediárias contendo a camada de aquecedor (402), uma camada condutora (403) e uma camada contendo o termistor (404), enquanto (405) forma a camada de interface para a câmara de reação (201). As camadas de câmara de reação (406) consistem de seis camadas, como mostrado. Também é fornecida uma camada condutora (403) entre as camadas de aquecedor e termistor. Também são indicadas as linhas condutoras do aquecedor (205) e as linhas condutoras do termistor (204). A figura mostra que as linhas condutoras (204) são colocadas em ambos os lados da camada de termistor (404). O desenho do aquecedor pode ser de qualquer feitio, como "escada", "serpentina", "linha", "placa", etc., com o tamanho variando de 0,2mm x 3mm a 2mm x 2mm. O tamanho e o feitio do aquecedor podem ser selecionados com base nos

requisitos. Os requisitos podem depender do tamanho da câmara de reação ou da amostra que está sendo testada ou o material sendo usado como camada condutora.

O chip LTCC tem um volume de poço de 1 a 25 μl . O aquecedor se baseia no elemento resistivo de película espessa que é utilizado em pacotes LTCC convencionais. O sistema de termistor com alumina é usado para fabricação de sensores de temperatura embutidos. O TCR medido do chip foi entre 1 e 2 $\Omega/^{\circ}\text{C}$. O chip foi fabricado em sistema verde DuPont 951. A camada de termistor pode ser colocada em qualquer parte no chip ou um sensor de temperatura pode ser colocado fora do chip em vez do termistor dentro do chip.

Após determinar a uniformidade do perfil de temperatura dentro do chip, foram realizadas reações PCR nesses chips. Fragmentos de DNA de Lambda, DNA de Salmonella e DNA de Hepatite B foram amplificado com sucesso usando esses chips. A Figura 5 mostra o microchip em 3 visões dimensionais, mostrando suas diversas conexões com o aquecedor, anéis condutores, termistor e anéis condutores (502). Também mostra pilares (501) que estão conectando os anéis condutores (502) à placa condutora (403).

O aquecedor embutido é feito de pasta resistiva como a série CF da DuPont, compatível com LTCC. Pode ser usado qualquer sistema de fita de cerâmica verde, como DuPont 95, ESL (série 4 IXXX), Ferro (sistema A6) ou Haraeus. O citado sensor de temperatura embutido é um termistor fabricado usando uma pasta de resistência de termistor de PTC (Coeficiente de Temperatura Positivo) (por exemplo: 509X D, ESL 2612 de ESL Electroscience) para substrato de alumina. NTC: Coeficiente de Temperatura negativo de pasta de resistência como NTC 4993 da EMCA Remex também pode ser usado.

A tampa de vedação transparente (comprimento de onda de 300 a 1000nm) é para prevenir a evaporação da amostra da citada câmara de reação e é feita de material polímero.

Sistema de detecção óptica (104, 105)

- 5 O sistema de detecção óptica (fluorescência) inclui uma fonte de iluminação, tipicamente um LED, filtros para seleção de luz de comprimento de onda apropriado, componentes ópticos para levar e coletar luz da amostra e um sensor de luz (fotodiodo, tubo fotomultiplicador, fototransistor, sensor de imagem, etc.). Também inclui um sistema de circuitos (105) para conduzir a fonte de luz, para detectar sinal
- 10 do sensor de luz. Em aplicações portáteis, é preferível usar fotodiodo, fototransistor ou sensor de imagens em razão de seu baixo consumo de energia (<1miliW). A detecção em tempo real dos produtos PCR utiliza técnica de fluorescência, em que um corante fotossensível (fluorocromo como SYBR Verde) presente na mistura PCR absorve luz de um determinado comprimento de onda e emite a um comprimento de
- 15 onda maior (470nm & 520nm para SYBR Verde). Tipicamente, a intensidade da luz do emissor aumenta ou diminui com o progresso bem sucedido do PCR.

A monitoração da mudança na intensidade emitida proporciona a capacidade de detecção em tempo real do dispositivo PCR. O acoplamento e coleta de luz da amostra PCR podem ser obtidos de diversas formas. Os seguintes métodos podem

20 ser utilizados no sistema:

- Sistema de detecção óptica usando fibra óptica bifurcada (605) (plástico multimodo, fibra de sílica ou feixes de fibras) Uma das extremidades bifurcadas (605a) é para incidência de luz do LED (601) na amostra e a outra extremidade para a luz incidente em um fotodetector (602). A extremidade comum (605b) direciona a
- 25 luz na amostra. O método utiliza elementos ópticos para acoplar a luz de e para a

fibra além dos filtros para seletividade de comprimento de onda.

- Um sistema de detecção óptica divisor de feixe usando divisores de feixe, lentes e filtros para focar a luz para a amostra e detecção. Figura 19

- Um sistema híbrido de detecção óptica utilizando fibra óptica para iluminação e
5 detecção direta usando lente de foco, filtro e detector. Figura 20

A figura 6 mostra uma configuração do sistema óptico que é a preferida para um dispositivo PCR de acordo com a presente invenção. A figura mostra a configuração com a fibra óptica bifurcada (605) incluindo uma fonte de excitação de um LED (601) em uma extremidade da extremidade bifurcada (605a) e a fluorescência detectada
10 por um fotodetector (602) em outra extremidade bifurcada (605a). O LED (601) e o fotodetector (602) são acoplados à extremidade bifurcada (605a) da fibra óptica e a extremidade comum (605b) virado para dentro da câmara de reação (201) do chip LTCC (200). A figura também mostra um filtro (604a) acoplado ao LED (601) e um filtro (604b) acoplado ao fotodetector (602) pelos acopladores (603a & 603b)
15 respectivamente.

O sinal de saída do detector (602) é amplificado (in loco no tubo fotomultiplicador, fotodiodo de avalanche) usando um circuito amplificador (701) como na figura 7 antes de ser enviado para o controlador de aquecedor. Um exemplo do circuito amplificador é um circuito de malha de captura de fase (PLL) (amplificador lock-in).
20 Nesse circuito a iluminação é pulsado a uma frequência predefinida (tipicamente na faixa entre 10 Hz a 500 kHz). O circuito de processamento de sinal de saída (sinal de fluorescência) trava na mesma frequência e gera uma corrente direta (DC) proporcional que é amplificada, convertida a uma voltagem, amplificada mais ainda e enviada ao microcontrolador (106). O circuito intensifica a relação sinal/ruído do sinal
25 e elimina o ruído relacionado a frequência do sinal. O circuito lock-in se baseia no

modulador/demodulador balanceado (como AD 630 JN da Analog Devices).

A figura 7 mostra um diagrama de bloco do circuito que controla o aquecedor e o termistor em que o termistor no microchip PCR LTCC (200) age como um dos braços no circuito em ponte (706). Mesmo quando o sensor de temperatura está

5 colocado fora do chip ele pode ser conectado a um dos braços do circuito em ponte. A saída amplificada de ponte vinda do amplificador de ponte (701) é alimentada como entrada no controlador PID (703) onde é digitalizada, e o algoritmo PID fornece uma saída digital controlada. A saída é novamente convertida de voltar para a voltagem analógica e isso conduz o aquecedor usando um transistor de força

10 presente no condutor do aquecedor (704).

O circuito analógico implementado para o controle de aquecedor (703) utiliza P, PI, PD ou PID (Derivada Proporcional Integral) ou pode ser um simples controle liga/desliga com base na saída do termistor. O sensor de temperatura é parte do circuito que detecta a mudança na temperatura. Nesta figura um exemplo de

15 termistor é considerado para o sensor de temperatura em que é feito parte de um circuito em ponte de Wheatstone (706). Uma mudança na resistência do termistor em razão de aquecimento ou resfriamento resulta em voltagem de saída finita do circuito. Essa voltagem se relaciona à temperatura do poço no chip LTCC. A voltagem medida é usada para determinar se o aquecedor deve ser ligado ou

20 desligado. O aquecedor é fornecido com uma energia pré-ajustada determinada pela temperatura máxima a ser atingida no poço (no chip LTCC). Para levar em conta a variação de resistência no a aquecedor e termistor (-20% para chip otimizado), um circuito de autocalibração foi desenvolvido e está sendo implementado na unidade de mão. O circuito compensa as mudanças nas resistências usando um termistor

25 comercial (PT100) exposto ao ambiente.

O circuito de controle do aquecedor é gerenciado por um microcontrolador. O microcontrolador é programado para rodar o perfil térmico desejado através da interface de comunicação. O programa controla o circuito de controle do aquecedor (102) para rodar o perfil desejado do chip LTCC. Foi testada uma interface Bluetooth para controlar o microcontrolador usando software rodando em PDA (iPaq rodando WindowsCE). O desenvolvimento de software para comunicação Bluetooth e desenvolvimento de GUI (Interface Gráfica de Usuário) está sendo implementado no dispositivo de mão (109). O método de controlar o aquecedor e ler o valor do sensor de temperatura mostrado aqui é somente um exemplo. Este não deve ser considerado o único modo de lidar com o controlador ou uma limitação. Outro meio e método de controlar o aquecedor e ler o valor do termistor é aplicável ao caso ora divulgado.

O outro dispositivo permite aos usuários criar perfis térmicos para o PCR através de uma GUI (Interface Gráfica de Usuário). Os perfis térmicos são transferidos ao microcontrolador através da interface de comunicação (107). O perfil térmico inclui valores de ponto de ajuste (temperatura e tempo) e número de ciclos. Os dados de sensor de temperatura e dados de detecção óptica do microcontrolador são enviados ao outro dispositivo e nele exibidos. O computador também irá avaliar os dados e exibir o resultado da reação. O computador portátil roda um sistema operacional como Windows CE/Mobile, Palm OS, Symbian ou Linux. Ainda em outra configuração é possível que somente os valores de ponto de ajuste sejam enviados ao e o número de ciclos são monitorados pelo outro dispositivo. O microcontrolador atinge os valores de ponto de ajuste enviados de um perfil térmico pelo outro dispositivo.

Tipicamente, o produto PCR é analisado usando eletroforese em gel. Nessa técnica,

fragmentos de DNA após PCR são separados em um campo elétrico e observados por tingimento com corante fluorescente. Um esquema mais adequado é usar um corante fluorescente que se ligue especificamente a um DNA de fita dupla para monitorar a reação continuamente (PCR em tempo real). Um exemplo de tal corante

5 é SYBR VERDE que é excitado por luz azul de 490nm e emite luz verde de 520nm quando ligado ao DNA. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA produto de fita dupla formado durante PCR e dessa forma aumenta com o número de ciclos.

Um exemplo abaixo explica diferentes possibilidades que podem ser obtidas usando

10 o dispositivo de mão (109) com o outro dispositivo. O outro dispositivo considerado neste exemplo é um PDA/Smartphone.

A aplicação PDA/Smartphone em questão roda em uma plataforma Windows móvel

5. Ela usa pilha de perfil de porta serial (SPP) móvel Bluetooth para se comunicar com a unidade de mão. A unidade de mão inclui um módulo Bluetooth, o qual faz

15 interface com o microcontrolador através da porta UART (Recepção e transmissão universal assíncrona) para a comunicação de dados. A principal funcionalidade da aplicação é controlar e monitorar o processo de ciclagem térmica da unidade de mão através de vários perfis térmicos armazenados. Ela também tem funcionalidades tais como controle de acesso de dois níveis; exibição de dados, criação de perfis

20 térmicos, etc. A figura 15 ilustra o método de comunicação entre a aplicação e a unidade de mão.

Aplicação PDA

O programa de aplicação PDA aceita os dados de entrada, o que inclui valores de ponto de ajuste (temperatura e tempo) e o número de ciclos. Os valores de ponto de

25 ajuste são transferidos para a unidade de mão através de uma conexão Bluetooth e

aguarda a resposta da unidade de mão. Ao atingir o valor de ponto de ajuste, a unidade de mão comunica-o ao PDA, o qual envia o próximo grupo de instruções (figura 17). O PDA também recebe dados da unidade de mão (temperatura e dados ópticos) e os exibe. Para comunicar e executar as instruções enviadas pelo PDA, a

5 unidade de mão possui um microcontrolador com um programa embutido que permite ao Bluetooth efetuar comunicação e controle dos circuitos analógicos. Além disso, o programa no microcontrolador continuamente envia temperatura e dados ópticos ao PDA. A aplicação PDA possui 4 módulos:

1. Controle de acesso

10 2. GUI

3. Processamento e comunicação de dados

Controle de Acesso:

1. Este módulo permite aos usuários efetuar login na aplicação.

2. Ele possui uma tela de login com Nome de usuário & Senha.

15 3. Existem dois níveis de controle de acesso

a. Administrador

b. Usuário

4. O administrador tem os seguintes poderes:

a. Criar usuários e pastas de usuários

20 b. Criar perfis térmicos

c. Conectar-se a/Mudar dispositivo de mão (109)

5. Uma vez que os usuários tenham entrado no sistema com seus Nomes de Usuário & Senhas, eles têm poderes para executar a aplicação, visualizar e armazenar os dados pertinentes à sua sessão.

25 GUI

1. O módulo GUI (Interface Gráfica de Usuário) fornece telas para:

a. Administradores digitarem diferentes Pontos de Ajuste (Temperatura & Tempo) e criar/excluir/modificar perfis térmicos.

b. Criar/excluir Usuários e pastas de usuários.

5 c. Mudança de dispositivo de mão.

i. A aplicação usa a pilha Bluetooth para detectar dispositivos Bluetooth no âmbito. Após a detecção, ela exibe todos os dispositivos disponíveis no âmbito. O Administrador irá selecionar o dispositivo de mão e a aplicação solicita a pilha Bluetooth que irá se juntar ao dispositivo de mão (109). Após a junção ele irá
10 armazenar a informação do dispositivo juntado para uso futuro.

d. Iniciar, parar, reiniciar e interromper a aplicação.

e. Uma janela de log, que mostra os dados transmitidos e recebidos pela aplicação.

2. O módulo GUI possui uma tela para exibir os dados térmicos e ópticos coletados da unidade de mão.

15 Módulo de Processamento de Dados

O módulo de processamento de dados possui a seguinte funcionalidade:

1. Conversão de dados

2. Algoritmo de comunicação.

Conversão de dados:

20 1. Os dados são coletados de um perfil térmico selecionado pelo usuário.

2. Este é um típico perfil térmico:

Ponto de ajuste inicial

Ponto de Ajuste 1

Ponto de Ajuste 2

25 Ponto de Ajuste 3

[Número de ciclos]

Ponto de ajuste final.

3. Como os valores de Ponto de Ajuste contêm Temperatura e Tempo, os valores de temperatura são então convertidos para valores de voltagem usando a fórmula:

$$5 \quad V = (t - x) / y$$

Onde V é a voltagem, t é a temperatura e x & y são constantes predefinidas.

4. Os valores de voltagem assim obtidos serão convertidos para valores hexadecimais (base 16) de 10 bits usando a fórmula:

$$(V / V_{sup ply}) * 1023 \text{ onde } V \text{ é a voltagem.}$$

10 5. Os valores de tempo (em segundos) são convertidos para valor hexadecimal (hex).

6. Os dados térmicos coletados da unidade de mão serão convertidos de valor hexadecimal para voltagem para exibição usando a fórmula:

$$(Hex / 1023) * V_{sup ply}$$

15 7. A voltagem é novamente convertida para temperatura:

$$t = V * y + x$$

8. Os dados ópticos coletados serão convertidos para voltagem e serão diretamente enviados para exibição.

Comunicação de Dados:

20 O módulo de comunicação de dados conversa com a pilha Bluetooth móvel Windows. Os seguintes protocolos são seguidos durante a comunicação.

Início:

O botão de iniciar fornecido pelo programa de aplicação dá início ao processo de ciclagem térmica. A aplicação solicita que a pilha Bluetooth estabeleça uma conexão

25 de porta serial sem fio com a unidade de mão. Após receber a confirmação, o PDA

começa a se comunicar com a unidade de mão.

O comando Parar/Pausa/Continuar Parar irá parar a ciclagem térmica e indicar à unidade de mão que reduza a temperatura para temperatura ambiente – este processo não pode ser reiniciado. A Pausa irá manter a temperatura do chip à temperatura atual. Isso pode ser revogado pelo comando continuar

O uso de uma plataforma de computação portátil como PDA dá ao sistema poder de computação suficiente para controlar os componentes eletrônicos e fornecer uma interface de usuário versátil, porém simples, para exibir os dados. Isso também torna o sistema todo modular e assim permite fácil upgrade com custo mínimo para o usuário.

A invenção fornece um dispositivo PCR de mão comercializável para aplicação específica de diagnóstico. O programa que roda no outro dispositivo fornece um sistema PCR de mão completo com detecção em tempo real e controle de software.

Reduzindo-se a massa térmica e os índices melhorados de aquecimento/resfriamento usando o dispositivo, o tempo que se leva de 2 a 3 horas para concluir uma reação de 30 a 40 ciclos, mesmo para um volume moderado de amostra de 5-25 μ l, foi reduzido para menos de 30 minutos. A figura 14 mostra o tempo que se levou para amplificar o DNA Viral da Hepatite B usando o chip LTCC da invenção. O PCR foi rodado por 45 ciclos e conseguiu obter amplificação em 45 minutos indicado como (1) na Figura 14. Além disso, a amplificação também foi observada quando o PCR foi rodado por 45 ciclos em 20 minutos (2) e 15 minutos (3). A duração convencional de HBV (45 ciclos) seria de cerca de 2 horas.

A miniaturização permite leituras precisas com menores tamanhos de amostra e consumo de menores volumes dos caros reagentes. As pequenas massas térmicas dos Microsistemas e os pequenos tamanhos de amostra permitem uma ciclagem

térmica de baixa energia, aumentando a velocidade de muitos processos, tal como replicação de DNA através de micro PCR. Além disso, os processos químicos que dependem da química de superfície são bastante melhorados pelas relações superfície/volume aumentadas que são disponíveis na microescala. As vantagens dos microfluídicos levaram à demanda pelo desenvolvimento de microssistemas integrados para análise química.

O microchip traduzido em um dispositivo de mão (109) dessa forma remove a máquina PCR de um sofisticado laboratório, assim aumentando o alcance dessa técnica bastante poderosa, seja para diagnóstico clínico, teste de alimento, testes de sangue em bancos de sangue ou várias outras áreas de aplicação.

Os instrumentos PCR existentes, com múltiplas câmaras de reação, fornecem múltiplos locais de experimento de DNA todos rodando o mesmo protocolo térmico, de forma que não são eficientes em relação ao tempo. Surge a necessidade de reduzir o tempo de reação e volume de tomada de amostra.

O PCR instantâneo, se projetado no futuro, poderia ter uma gama de dispositivos com resposta térmica bastante rápida e alto isolamento dos chips PCR adjacentes para rodar múltiplas reações de forma eficaz e independente com diferentes protocolos térmicos e mínima diafonia.

A análise ou quantificação dos produtos PCR é realizada pela integração prática de um sistema de detecção de fluorescência em tempo real. Este sistema também poderia ser integrado a sistemas de quantificação e sensores para detectar doenças como Hepatite B (Figura 12), AIDS, tuberculose, etc. Outros mercados incluem monitoramento de alimentos, análise de DNA, ciência forense e monitoramento ambiental.

A figura 8 mostra um desenho comparativo da fusão do fragmento de DNA λ -636 no

chip usando o aquecedor e termistor integrados.

A figura 9 mostra o aumento no sinal de fluorescência associado à amplificação do DNA λ -311. O perfil térmico foi controlado pela unidade de mão e a reação foi realizada em um chip (mistura da reação de 3 μ l e óleo de 6 μ l). A fluorescência foi monitorada usando um amplificador lock-in convencional.

A invenção também fornece um sistema diagnóstico. O procedimento adotado para desenvolver o sistema diagnóstico foi o de inicialmente padronizar os protocolos térmicos para alguns problemas e funcionalizá-los no chip. Os iniciadores designados para o DNA ribossômico 16S amplificaram o fragmento de *E. coli* e *Salmonella* em ~ 300 - 400 bp enquanto os iniciadores para o gene *stn* amplificaram o fragmento de *Salmonella typhi* em ~ 200 bp. Os produtos obtidos foram confirmados por detecção de fluorescência verde SYBR bem como eletroforese em gel de agarose. As figuras 9 e 13 mostram a figura gel do DNA λ -311 amplificado e o gene de *Salmonella* usando microchip.

15 Perfil térmico para amplificação de DNA λ -311:

Desnaturação: 94°C (90s)

94°C (30s) - 50°C (30s) - 72°C (45s)

Extensão: 72°C (120s)

Perfil térmico para amplificação do gene da *Salmonella*:

20 Desnaturação: 94°C (90s)

94°C (30s) - 55°C (30s) - 72°C (30s)

Extensão: 72°C (300s)

PCR com sangue e plasma processado

O sangue ou plasma foi tratado com um agente de precipitação que pode precipitar as principais substâncias inibidoras de PCR dessas amostras. O sobrenadante claro

foi usado como modelo. Usando este protocolo, foram obtidas amplificações para fragmentos de ~200 bp de *Salmonella typhi* (figura 10). Na figura 10, a imagem de eletroforese em gel mostra

1. reação de controle,
- 5 2. Produto PCR – sangue sem processamento,
3. Produto PCR – sangue com processamento
4. Produto PCR – plasma processado

Tampão para PCR direto de sangue

Um tampão exclusivo foi formulado para PCR direto com amostras de sangue ou
 10 plasma. Usando este sistema de tampão exclusivo, foi obtida amplificação de PCR direto com sangue e plasma. Com este sistema de tampão, foi obtida amplificação de até 50% para sangue e 40% para plasma (ver Figuras 11 e 12) usando o chip LTCC da invenção. Na figura 11, a imagem de eletroforese em gel mostra

1. Produto de PCR - 20% de sangue,
- 15 2. Produto de PCR - 30% de sangue,
3. Produto de PCR - 40% de sangue,
4. Produto de PCR - 50% de sangue,

e na figura 12, a imagem de eletroforese em gel mostra,

1. Produto PCR - 20% de plasma,
- 20 2. Produto PCR - 30% de plasma,
3. Produto PCR - 40% de plasma,
4. Produto PCR - 50% de plasma,
5. reação de controle

O tampão exclusivo inclui sal de tampão, um cloreto ou sulfato contendo íon
 25 bivalente, um detergente não-iônico, um estabilizador e um álcool de açúcar.

A figura 16 mostra uma curva de fusão do chip LTCC para derivada do sinal de fluorescência para a fusão do DNA λ -311. A figura também fornece uma comparação entre esta invenção (161) e o dispositivo PCR convencional (162). Pico maior: valor do pico/largura (eixo x) @ meio valor de pico = 1,2/43

- 5 Pico menor: valor do pico/largura (eixo x) @ meio valor de pico = 0,7/63

Uma relação maior indica um pico maior. Também no gráfico, o eixo y é a derivada (inclinação da curva de fusão), inclinação maior indica maior fusão.

A Figura 19 mostra a descrição de uma configuração do sistema óptico com divisor de feixe que poderia ser adotada no dispositivo de mão. O sistema de detecção de fluorescência inclui uma fonte de luz LED (193), lente (196) para focar a luz, um filtro de passagem de banda (195) para selecionar um comprimento de onda específico da luz, um divisor de feixe (191), uma lente (198) para focar o fecho incidente e o sinal da amostra carregado no chip (200), um filtro de passagem de banda (194) para selecionar o comprimento de onda específico da luz, lente de foco (197) e um fotodetector (192).

A Figura 20 mostra a descrição de uma configuração do sistema óptico híbrido incorporando fibra óptica e lentes. Este sistema de detecção de fluorescência inclui uma fonte de luz LED não mostrada na figura, com filtro de passagem de banda para selecionar um comprimento de onda de luz específico acoplado a uma fibra óptica (213). A fibra óptica direciona a luz para a amostra. Opcionalmente, uma lente adequada pode ser usada para focalizar a luz que sai da fibra óptica para a amostra. São usadas lentes (212) para caluniar o fecho emitido da amostra carregada no chip (200). Um filtro de passagem de banda (214) é usado para selecionar comprimento de onda específico da luz emitida e lente de foco (212) para focá-la em um fotodetector.

REIVINDICAÇÕES

1. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR, CARACTERIZADO** por incluir:

a) um microchip PCR de LTCC (cerâmica co-sinterizada a baixa temperatura) incluindo um aquecedor, uma câmara de reação para carga de uma amostra,

5 b) um controle de aquecedor para regulá-lo com base na entrada recebida de um sensor de temperatura,

c) um sistema de detecção óptica para detectar um sinal fluorescente da amostra e d) pelo menos uma interface de comunicação para interagir com outro(s) dispositivo(s).

10 2. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por ser fornecida pelo menos uma camada condutora entre o aquecedor e a câmara de reação.

3. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pela câmara de reação ser cercada por anéis condutores.

15 4. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com as reivindicações 2 e 3, **CARACTERIZADO** pelos anéis condutores estarem conectados à camada condutora por pilares.

5. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com as reivindicações 2, 3 e 4, **CARACTERIZADO** pelo condutor ser feito de um material selecionado de um grupo
20 incluindo ouro, prata, platina e paládio ou ligas destes.

6. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo sensor de temperatura ser colocado fora do chip para medir a temperatura do chip.

7. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1,
25 **CARACTERIZADO** pelo sensor de temperatura estar embutido em pelo menos uma

camada do chip.

8. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo sensor de temperatura ser um termistor.

9. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **5** **CARACTERIZADO** pelo sensor de temperatura estar conectado como um braço de um circuito em ponte.

10. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com as reivindicações 1 e 9, **CARACTERIZADO** pela saída do circuito em ponte ser amplificada antes de ser alimentada para o controle do aquecedor para regular o aquecedor.

10 11. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo chip incluir uma tampa para cobrir a câmara de reação.

12. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo chip ser descartável.

13. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **15** **CARACTERIZADO** pelo sistema de detecção óptica ser selecionado de um grupo incluindo um sistema de detecção óptica de divisor de feixe, um sistema de divisão óptica híbrido e um sistema de divisão óptica bifurcado.

14. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo sistema óptico incluir uma fonte de luz e um fotodetector **20** para detectar um sinal fluorescente da amostra.

15. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** por um amplificador lock-in amplifica o sinal detectado.

16. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com as reivindicações 13 e 14, **CARACTERIZADO** pelo sistema óptico bifurcado usar uma fibra óptica bifurcada **25** com a fonte da luz colocada em uma extremidade bifurcada (605a) e o fotodetector

colocado na outra extremidade bifurcada (605a) da fibra óptica.

17. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com as reivindicações 1 e 16, **CARACTERIZADO** pela extremidade comum (605b) da fibra óptica bifurcada apontar para a amostra.

5 18. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com as reivindicações 1 e 13, **CARACTERIZADO** pelo sistema de detecção óptica híbrido usar fibra óptica para dirigir a luz para a amostra.

19. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com as reivindicações 1 e 13, **CARACTERIZADO** pelo sistema de detecção óptica híbrido usar lente para focalizar
10 o feixe emitido da amostra.

20. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pela interface de comunicação ser selecionada de um grupo incluindo serial, USB, Bluetooth ou combinações destes.

21. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com as reivindicações 1 e 15, **CARACTERIZADO** pelo outro dispositivo colher a temperatura do chip e o sinal
15 amplificado do dispositivo de mão.

22. **DISPOSITIVO DE MÃO DE PCR**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo outro dispositivo ser selecionado de um grupo incluindo smart phone, PDA e dispositivo programável.

20 23. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO, 1, CARACTERIZADO** por tal método incluir os passos:

a. estabelecer uma comunicação entre o microdispositivo PCR de mão e outro dispositivo através de uma interface de comunicação,

b. iniciar um processo de ciclo térmico com base nos valores de perfil térmico
25 recebidos do outro dispositivo para controlar um microchip PCR de LTCC, e

c. enviar um sinal óptico detectado pelo sistema óptico para o outro dispositivo.

24. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** por alimentar os valores de perfil térmico no outro dispositivo por um usuário através de uma interface.

25. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com as reivindicações 23 e 24, **CHARACTERIZADO** por criar, modificar ou excluir os perfis térmicos através da interface de usuário.

26. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com as reivindicações 23 e 25, **CHARACTERIZADO** pelo outro dispositivo fornecer autenticação do usuário.

27. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** pelo outro dispositivo armazenar uma diversidade de perfis térmicos.

28. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** pelo perfil térmico fornecer valor de ponto de fixação e número de ciclos.

29. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com as reivindicações 23 e 28, **CHARACTERIZADO** por manter o chip a uma temperatura por um tempo determinado pelo valor do ponto de fixação.

30. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** por trazer a temperatura do microchip PCR à temperatura ambiente interrompendo o processo

de ciclo térmico.

31. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** por manter a temperatura do microchip PCR constante quando o ciclo térmico é interrompido.

5 32. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO**, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** por comunicar com outro dispositivo usando a pilha de perfil de porta serial Bluetooth móvel.

33. **MÉTODO PARA MONITORAR E CONTROLAR O MICRODISPOSITIVO**
10 **PCR DE MÃO**, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** por representar os dados térmicos e ópticos em uma unidade monitora do outro dispositivo.

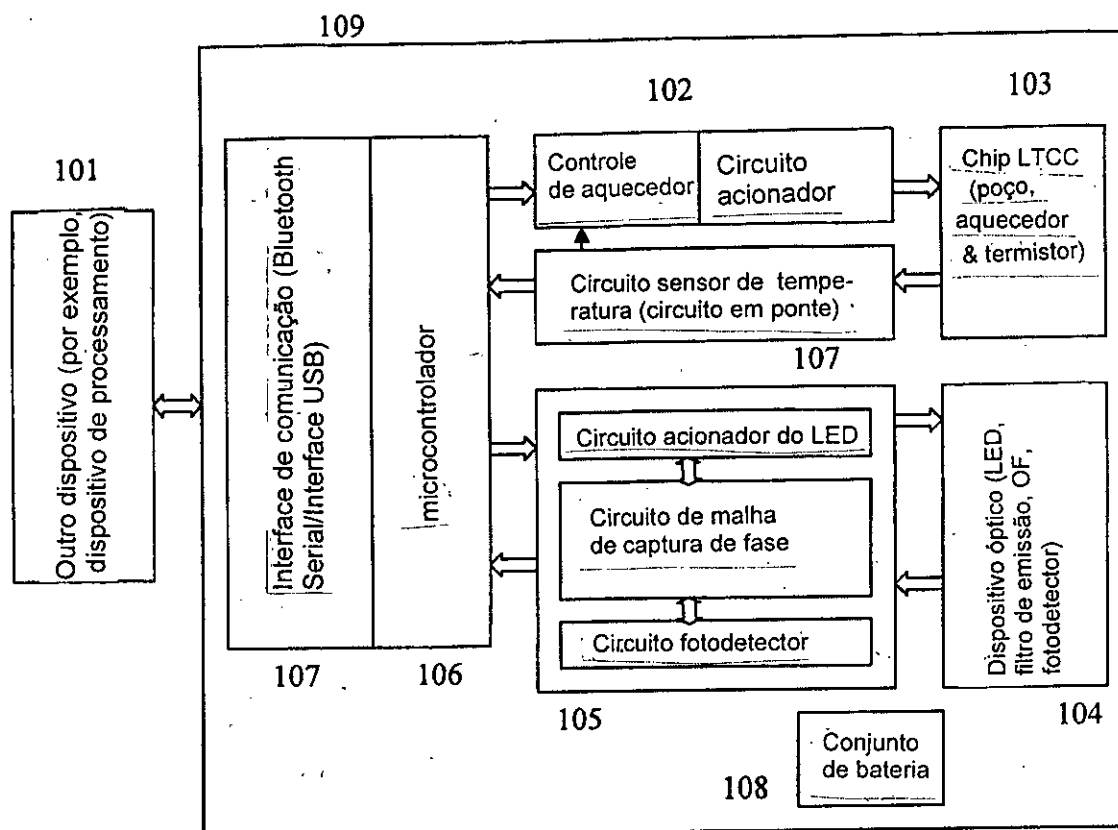


Figura 1

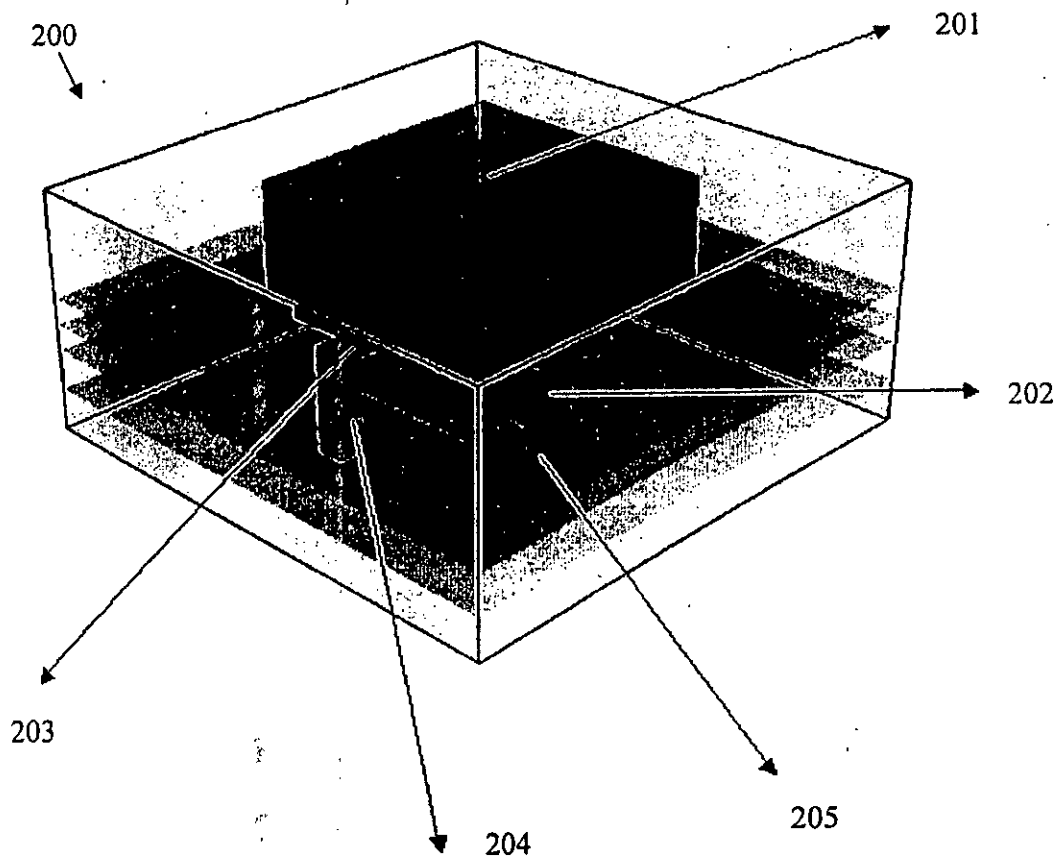


Figura 2

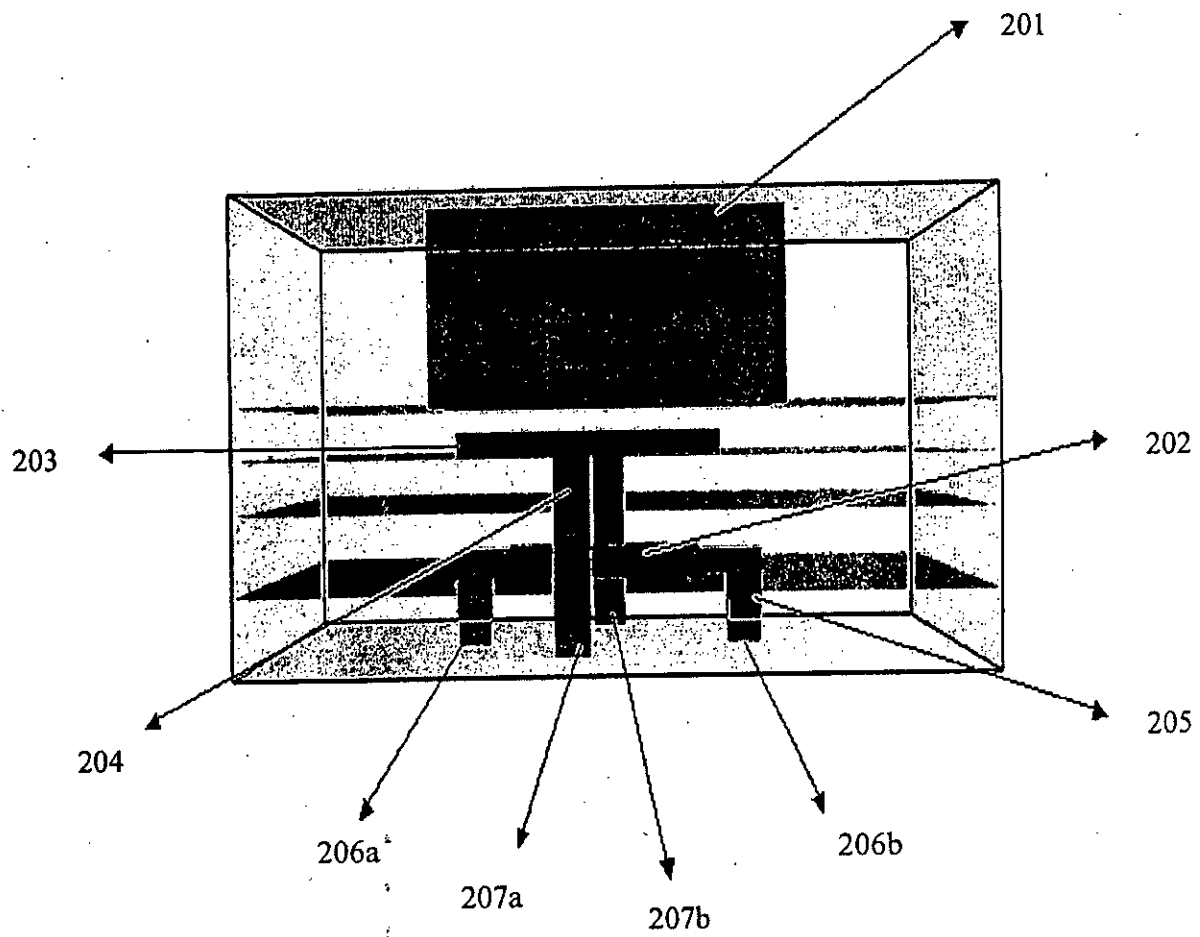


Figura 3

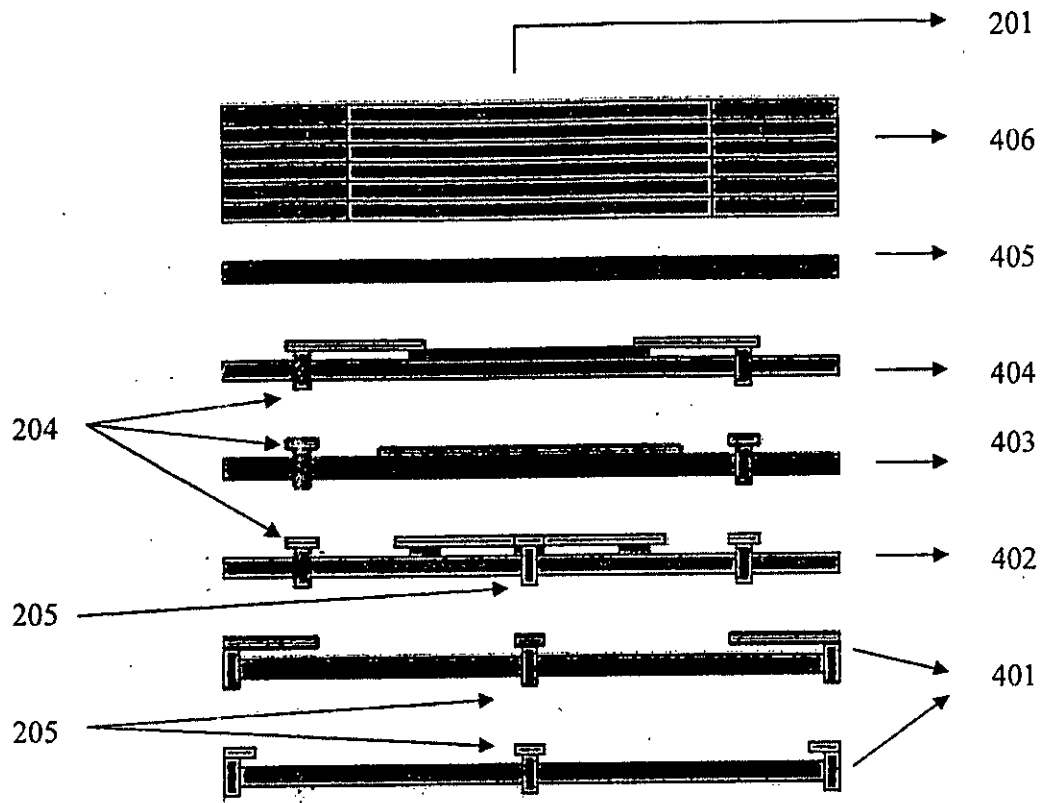


Figura 4

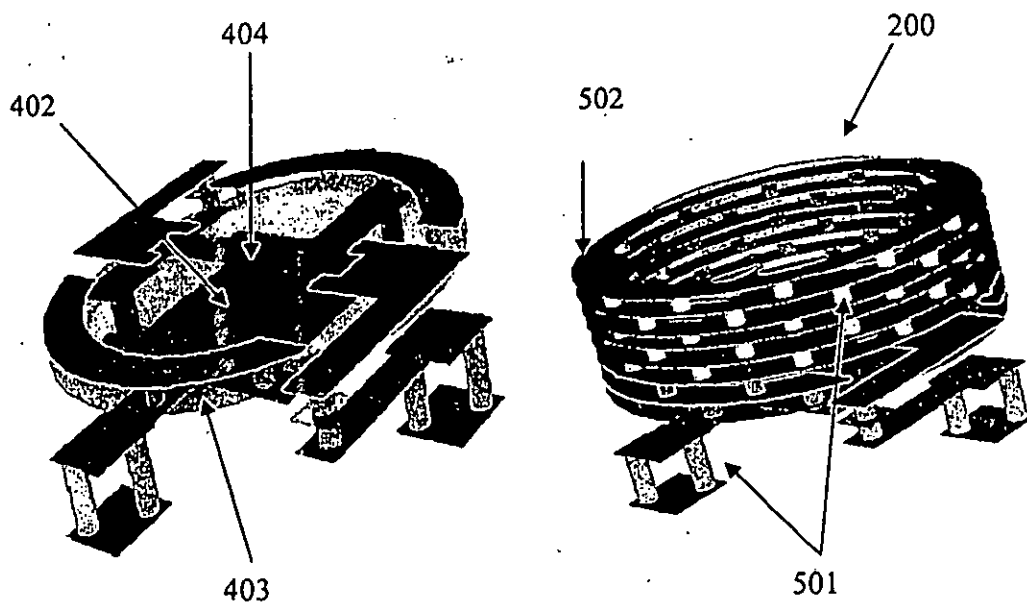


Figura 5

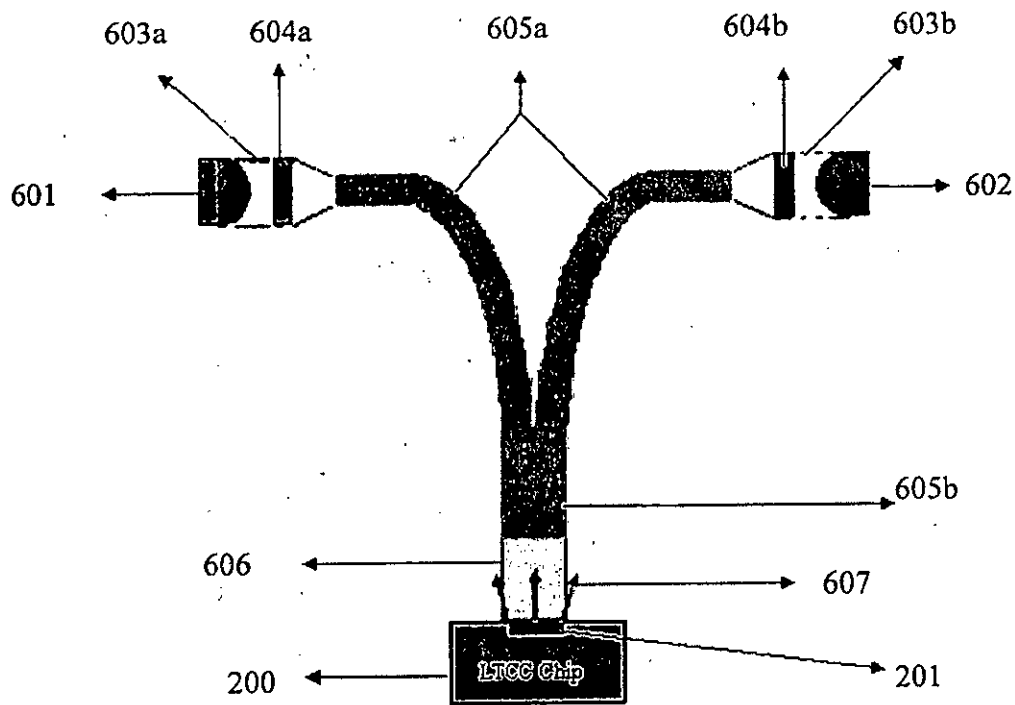


Figura 6

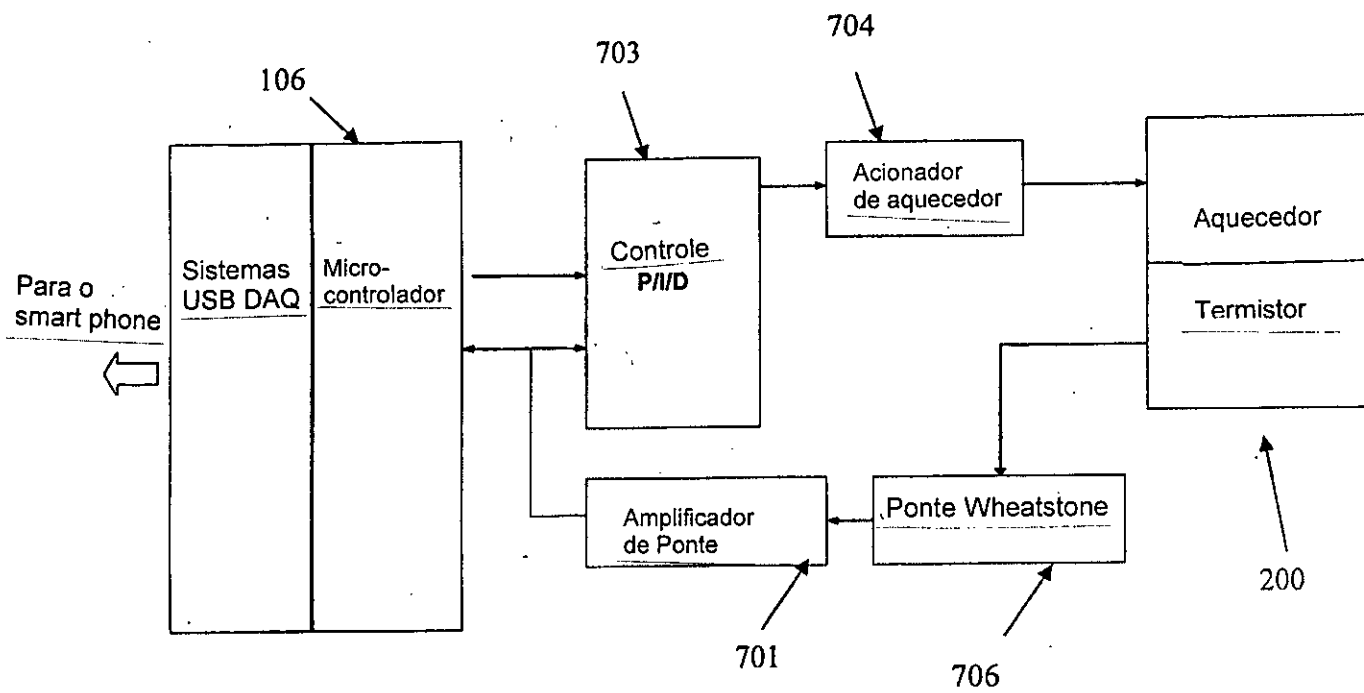


Figura 7

8/16

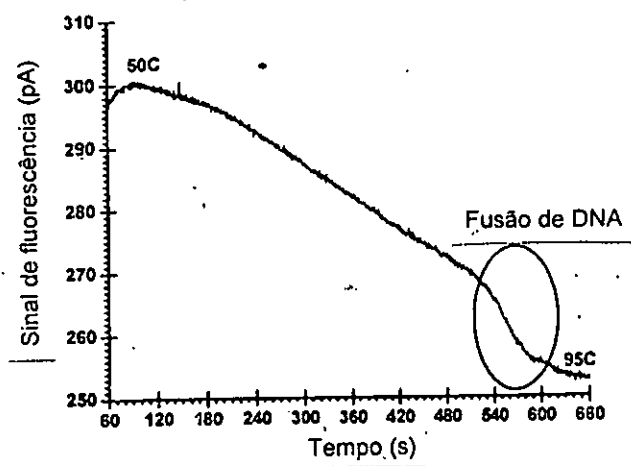
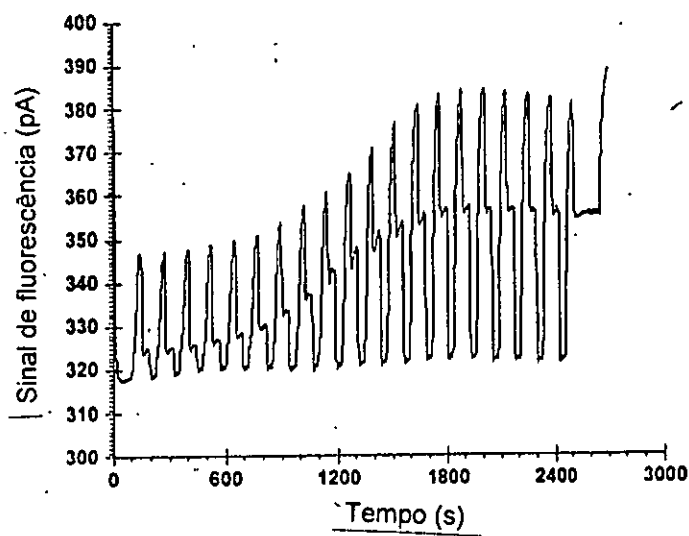
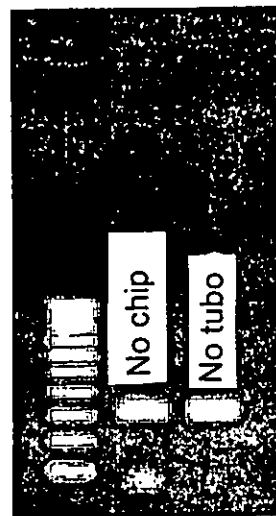


Figura 8



(a)



(b)

Figura 9

9/16

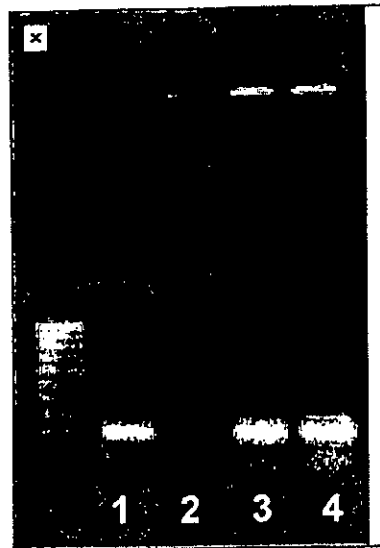


Figura 10

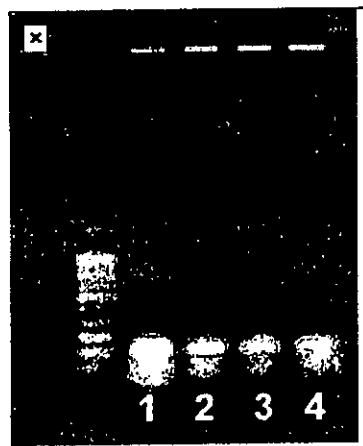


Figura 11

10/16

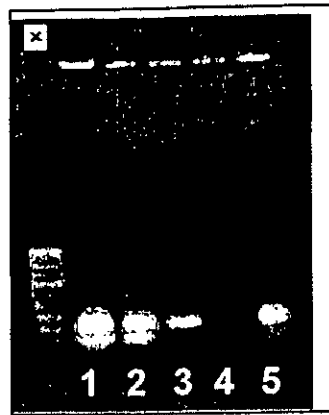


Figura 12

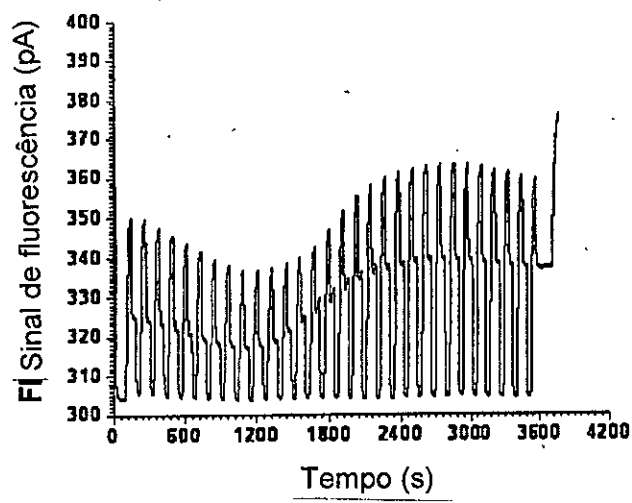
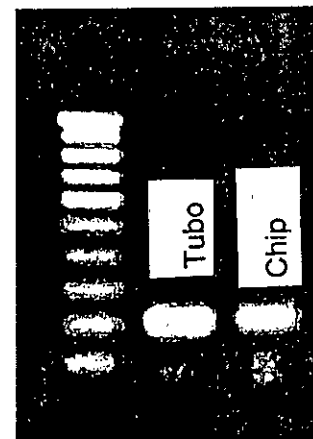


Figura 13



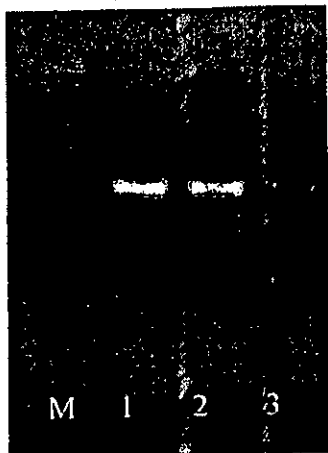


Figura 14

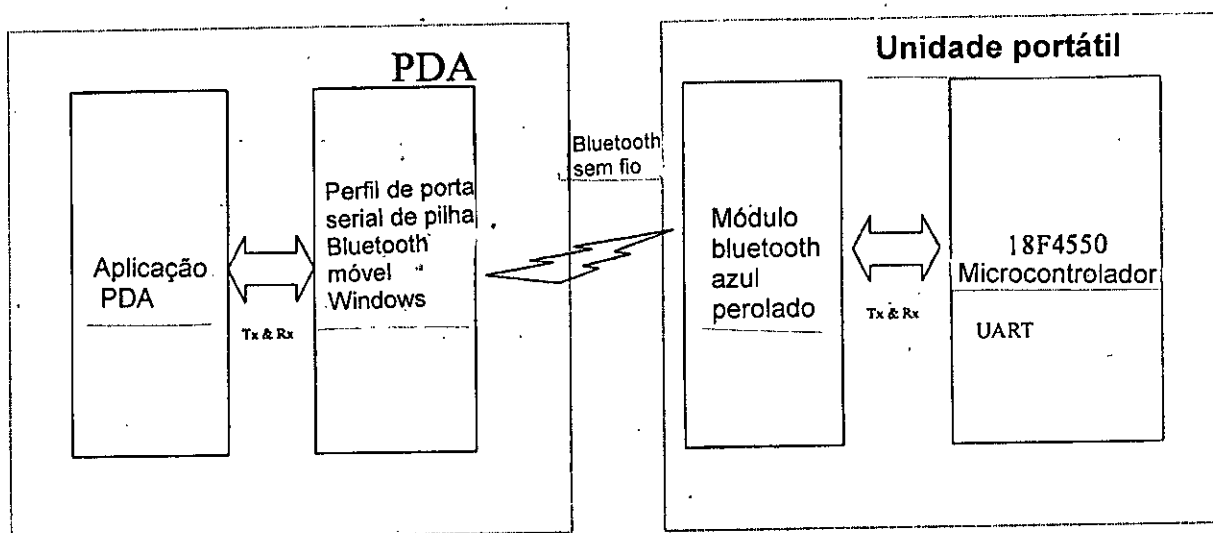


Figura 15

12/16

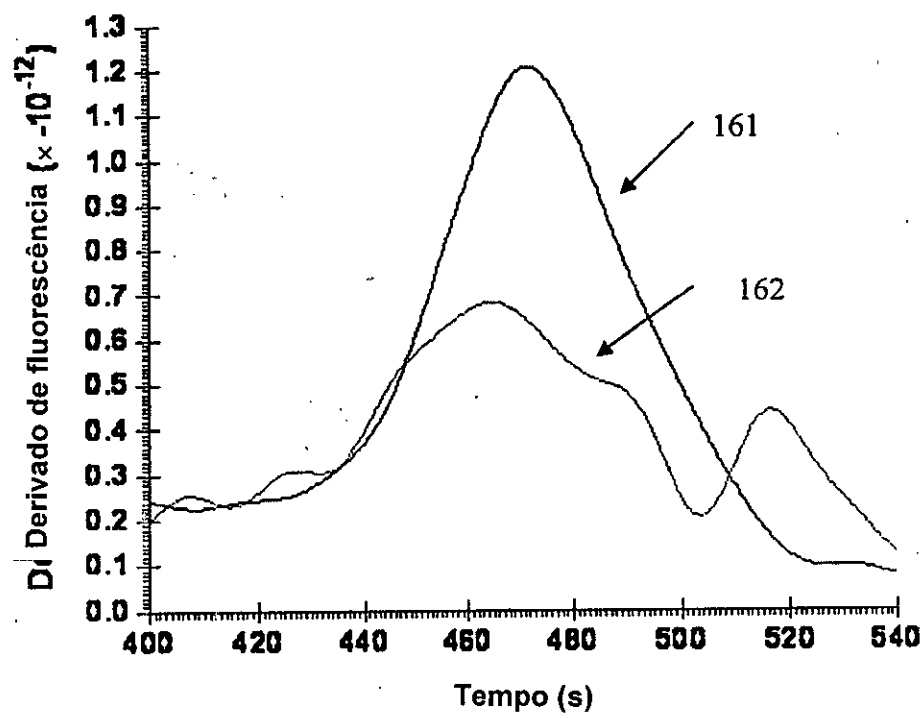


Figura 16

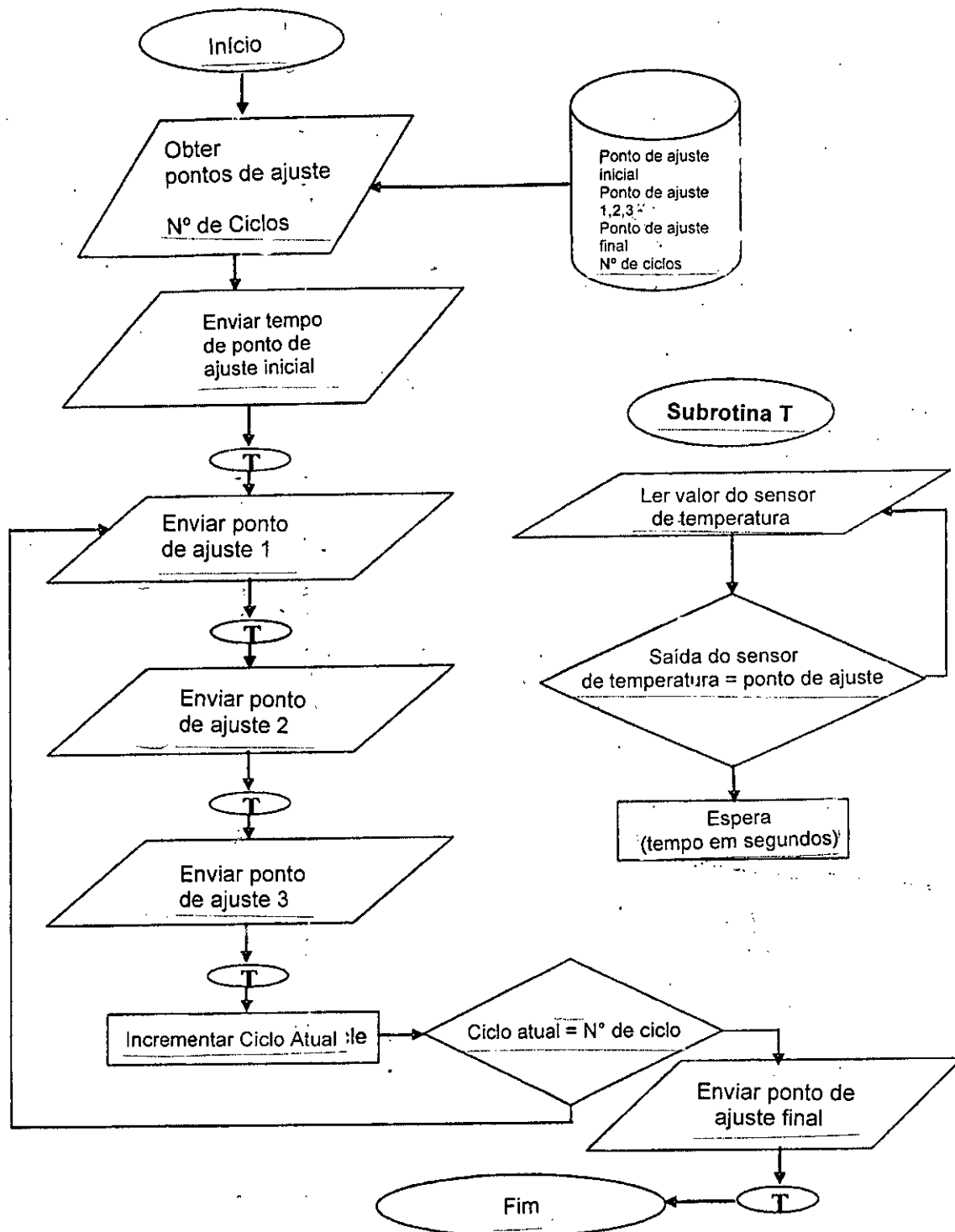
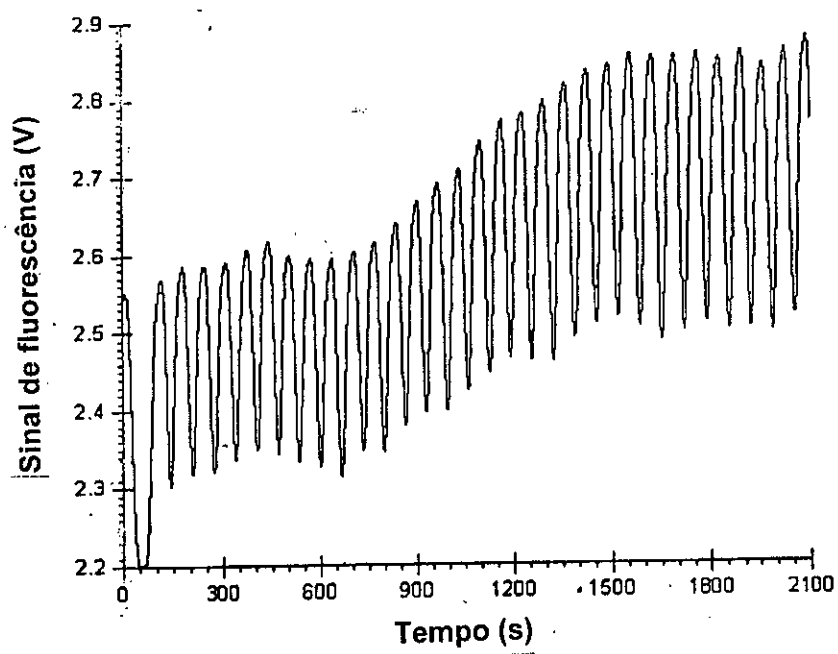


Figura 17

Figura 18

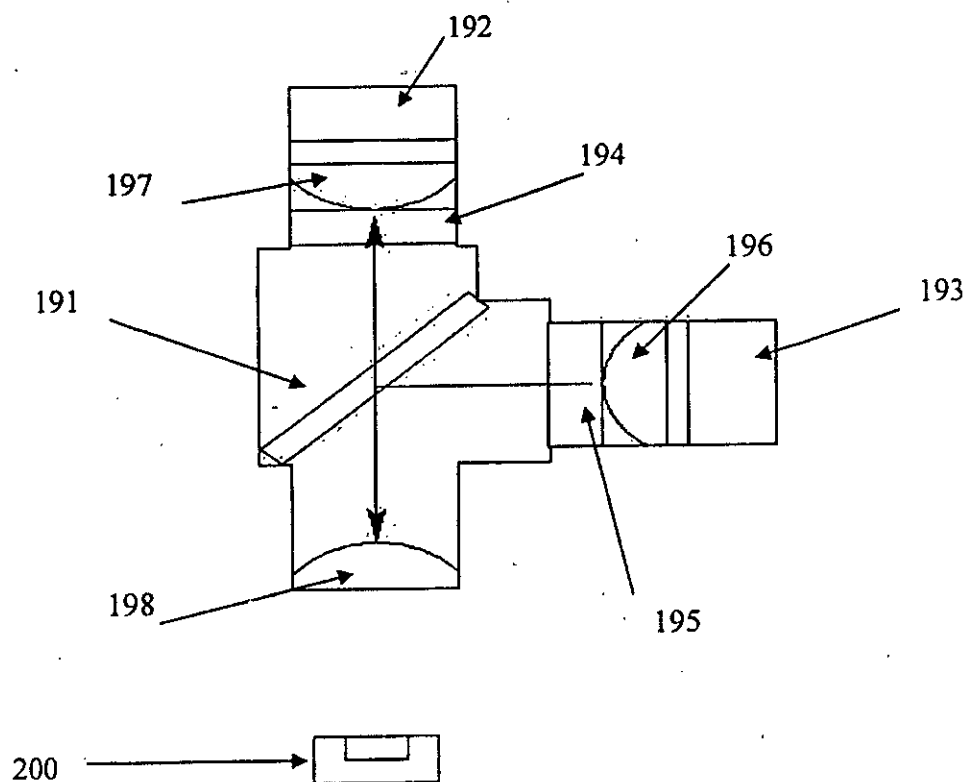


Figura 19

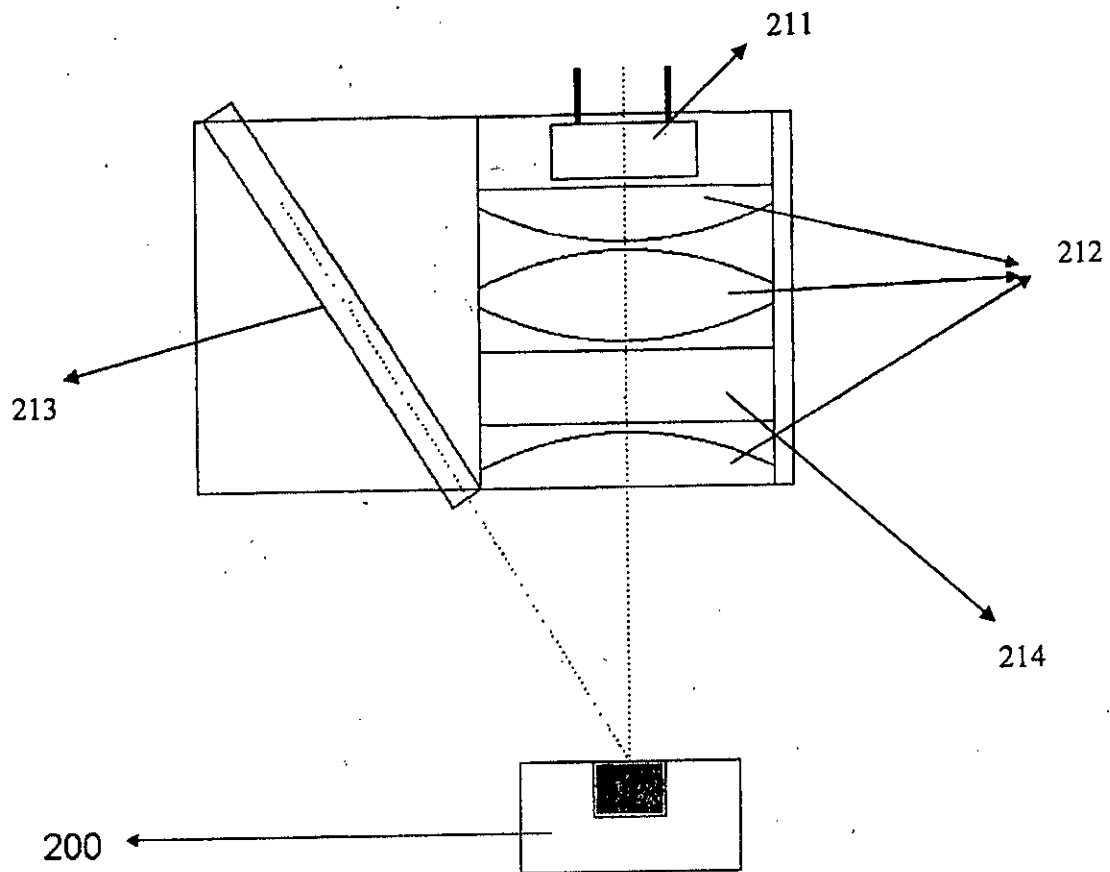


Figura 20

RESUMO

MICRODISPOSITIVO PCR DE MÃO. Invenção sobre um microdispositivo PCR de mão incluindo um microchip PCR LTCC contendo um aquecedor, uma câmara de reação para carregar uma amostra. Também inclui um controle de aquecedor para regular o aquecedor com base na entrada recebida de um sensor de temperatura, Tem ainda um sistema óptico contendo uma fibra óptica para detectar um sinal de fluorescência da amostra e pelo menos uma interface de comunicação para interagir com os outro(s) dispositivo(s).