



GRUP  
DE SENSORS I BIOSENSORS

UAB

Universitat Autònoma  
de Barcelona

UNIDAD DE QUÍMICA ANALÍTICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

# MINIATURIZACIÓN DE ANALIZADORES QUÍMICOS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA LTCC

MEMORIA PRESENTADA POR:

NÚRIA IBÁÑEZ GARCÍA

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

BELLATERRA, MAYO DE 2007

Esta tesis doctoral, titulada “Miniaturización de analizadores químicos mediante la tecnología LTCC”, ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Sensores y Biosensores del Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Barcelona por Núria Ibáñez García, bajo la dirección del Dr. Julián Alonso Chamarro

Bellaterra, 3 de mayo de 2007

Julián Alonso Chamarro  
Catedrático de Universidad

Grup de Sensors i Biosensors  
Departamento de Química, Edificio Cn  
08193 Cerdanyola del Vallès  
Universidad Autónoma de Barcelona  
<http://sensors.uab.es/>  
Telf.: +34 93 581 18 36  
Fax: +34 93 581 23 79

El trabajo descrito en la presente memoria se ha llevado a cabo gracias a la siguiente financiación:

**Beca predoctoral de formación de investigadores de la DGR/UAB (convocatoria 17.07.01)**, concedida por la UAB.

**Desarrollo de sistemas analíticos integrados de aplicación medioambiental (ACI2003-40)**, proyecto concedido por la Generalitat de Catalunya en colaboración con la Universidad de São Paulo (Brasil).

**Desarrollo de sistemas analíticos integrados de aplicación medioambiental (AIRE2003-8)**, proyecto concedido por la Generalitat de Catalunya, en colaboración con la Universidad de São Paulo (Brasil).

**Construcción de Microanalizadores de Parámetros de Interés Medioambiental basados en el uso de Tecnologías IC y LTCC (FIT310200-2004-38)**, proyecto concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, en colaboración con la empresa Adasa Sistemas, S.A (España).

**Projecte Cènit “Desarrollos tecnológicos hacia un ciclo del agua urbano sostenible (SOSTAQUA). Plataforma Automatizada Basada En Dispositivos Microfluídicos Y Biosensores Para La Detección Rápida Y Simultánea De Patógenos De Transmisión Hídrica Mediante Pcr “A Tiempo Real”**, empresa financiadora: Labaqua S.A. (Applus Medioambiente) (España).

**Microsistemas analíticos integrados ( $\mu$ TAS) con tecnología LTCC y de silicio. (TEC2006-13907-C04-04/MIC)**, proyecto concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

El trabajo descrito en esta memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Ibanez-Garcia N.; Goncalves R.D.M.; da Rocha Z.M.; Gongora-Rubio, M.R.; Seabra, A.C.; Chamarro, J.A. **LTCC meso-analytical system for chloride ion determination in drinking waters**, Sensors and Actuators B-Chemical, 2006, *118* (1-2), 67.

Ibanez-Garcia, N.; Mercader, M.B.; da Rocha, Z.M.; Seabra, C.A.; Gongora-Rubio, M.R.; Chamarro, J.A. **Continuous flow analytical microsystems based on low-temperature co-fired ceramic technology. Integrated potentiometric detection based on solvent polymeric ion-selective electrodes**, Analytical Chemistry, 2006, *78* (9), 2985.

Llopis, X.; Ibanez-Garcia, N.; Alegret, S.; Alonso, J. **Pesticide Determination by Enzymatic Inhibition and Amperometric Detection in a Low-Temperature Cofired Ceramics Microsystem**, Analytical Chemistry, 2007, DOI: 10.1021/ac062390z.

Martinez-Cisneros, C.S.; Ibanez-Garcia, N.; Valdes, F.; Alonso, J. **LTCC Microflow Analyzers with Monolithic Integration of Thermal Control**, aceptado en Sensors and Actuators A-Physical.

Als meus pares  
A la Cristina  
Al Xavier

## AGRAÏMENTS

He d'admetre que jo no sóc química per vocació, tot sigui dit. En la mateixa línia, el doctorat no va ser una cosa que tingués planejada des del començament de la carrera. Sóc aquí perquè volia estudiar i investigar quelcom que fos útil per al medi ambient... Faig balanç i bé, no puc dir que no hagi fet res relacionat amb la meua idea platònica inicial però no seria això el que més destacaria d'aquest període. L'autonomia, la logística i la capacitat de motivació (personal i externa) que es poden arribar a assolir en determinades circumstàncies és sorprenent. Per tot això, i per començar, he d'agrair al **Julián Alonso** que un dia, de la mà del mític **Eugeni Barquero**, em deixés incorporar al grup i em donés total confiança per fer i desfer a la meua manera (sabes que, a veces, també te hago caso).

D'altra banda, si no hagués estat pel Brasil, probablement jo ara no estaria escrivint això. Hi ha un abans, un durant i un després d'aquest país. L'*abans* és la tesina... etapa desastrosa dels meus primers flirteigs amb la ciència, en la qual vaig estar a punt d'abandonar el vaixell perquè considerava que tanta mala sort no podia ser fruit de la casualitat sinó de la meua incompatibilitat amb això de la investigació. El *durant* és la meua estada al fantàstic Brasil, a São Paulo concretament, ciutat que estimo i odio en una proporció que encara no tinc clara. Allà vaig aprendre de la mà de la **Zaira Mendes da Rocha** i el **Mário Góngora-Rubio** que eren les ceràmiques verdes i a intuir tot allò que podia arribar a fer-se amb elles. No només vull agrair-los el fet que ens ensenyessin tot el que sabien, sinó reconèixer que sense ells potser no hauríem encetat aquesta línia d'investigació.

El *després* és el retorn al grup i quatre anys d'una productivitat científica que no m'hagués imaginat al començament de la meua tesi: gairebé tot allò que ens plantejàvem sortia. Referent a aquest període, he d'agrair la fantàstica ajuda oferta per tres persones: el **Manel Bautista**, la **Rute Machado** i el **Carlos Azevedo**, sense els quals segur que no haguéssim avançat tan ràpid en el desenvolupament dels analitzadors potenciòmetrics i quimioluminiscent.

En la rauxa d'avaluació dels ginyes construïts, a la **Mireia Baeza** voldria agrair-li no només l'haver-me endinsat en el món de l'espectrofotometria, sinó també haver-me ajudat tant en la complexa modelització del sistema de detecció de nitrits.

La **Cynthia S. Martínez** va aterrar al grup quan jo ja donava per tancat el contingut experimental de la meua tesi... llàstima! perquè la simbiosi amb l'electrònica mexicana ha estat científicament genial (malgrat que culinàriament estigui encara molt lluny de les seves increïbles habilitats professionals).

Tret d'alguns moments de pessimisme (més o menys freqüents en funció de l'època)... què bé m'ho he passat al GSB durant aquests sis anys! I això té responsables amb noms i cognoms: **Aleix Parra**, com pot ser que diguis tantes burrades fins i tot anant amb "traje"? T'he de

donar les gràcies per haver-me fet riure mil vegades des de la taula del davant i per la teva col·laboració en la avaluació de les sondes. Per cert, això no ens havia de fer rics? L'altra ànima de Sensors ha estat, indubtablement, la **Mariona Massana**. Has sigut companya de laboratori (amb capacitat per aprendre quinze mil), consellera científica i, sobretot, una gran amiga. T'he dit mil cops que sense tu, aquest laboratori ja no és el mateix. A Biosensors, encara que degut al seu *discret* riure de vegades un es pensi que la té enganxada a l'orella, resideix l'optimisme en forma de dinamita: l'**Anna González**. Sincerament, no diré que tu i jo haguem compartit molts moments científics perquè seria enganyar-nos. També a fora, però sobretot a la facultat, quins bons cafès i quines bones tertúlies hem tingut (primer a tres i finalment a dues bandes). Ara et toca a tu enlairar-te. A la **Laia Rivera**, que ja fa temps que vola per altres indrets, he d'agrair-li algun que altre reny a temps, així com l'empremta deixada a òptics.

A la resta de companys de Sensors (**Rosa Olivé, Eva Arasa, Oriol Ymbern, Mar Pujol**) us desitjo sort i mols de paciència.

A la **Núria González** (la veïna de "quifi"), a la **Laura Grau** i a l'**Eva Ogué** els agraeixo l'haver-me recolzat i donat ànims en els bons i en els no-tan-bons moments. Que ja són... quants? 10 anyets d'aventures? Tela. Això deixa marca, *darlings*.

I és clar, a ningú que em conegui se li escapa que no són precisament els coneixements científics allò que ha valgut més la pena del meu pas pel GSB. Encara que espero que ja ho sàpiga, també vull deixar constància d'allò que agraeixo a en **Xavier Llopis**. En primer lloc, des d'un punt de vista científic, la genial idea de la ubicació de l'elèctrode de referència que tants bons resultats ens ha donat. Per altra banda, l'haver format equip en la construcció i avaluació de l'amperímetre miniaturitzat, que no podia haver sortit millor. Finalment, a nivell personal t'agraeixo que, al llarg d'aquests anys, hagis intentat encomanar-me la teva tranquil·litat i serenor en diversos aspectes de la vida. Malgrat la boira, cal caminar...

I per finalitzar amb la secció més *amigable* de la tesi només em falta esmentar el millor projecte que mai em podran concedir: els meus pares (l'**Antònia Garcia** i el **Josep Maria Ibáñez**) i la meva germana (la **Cristina Ibáñez**), amb qui som més germanes cada dia. Encara que pugui semblar evident, vull tornar a reconèixer als meus pares l'esforç realitzat per a que jo arribés fins aquí, facilitant-me tota la formació que volia rebre i, sobretot, posant-m'ho tot tan i tan fàcil. Gràcies de tot cor.

Com alguna vegada va escriure Shakespeare "el que és passat és pròleg". En el meu cas, la tesi i aquesta fase estan a punt de ser passat. El que no tinc clar és de quin llibre seran pròleg.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Tecnología del silicio</b>	<b>5</b>
1.1.1. CLASIFICACIÓN Y PROPIEDADES	5
1.1.2. TÉCNICAS DE MICROFABRICACIÓN	6
1.1.2.1. Fotolitografía	6
1.1.2.2. Procesos de grabado	7
1.1.3. TÉCNICAS DE SELLADO	9
1.1.3.1. Soldadura anódica (sellado electrostático)	9
1.1.3.2. Sellado por presión	9
1.1.3.3. Sellado mediante adhesivo	9
<b>1.2. Tecnología de polímeros</b>	<b>10</b>
1.2.1. CLASIFICACIÓN Y PROPIEDADES	10
1.2.2. TÉCNICAS DE MICROFABRICACIÓN	12
1.2.2.1. Estampado y grabado en caliente ( <i>Imprinting and hot embossing</i> )	13
1.2.2.2. Moldeado por inyección ( <i>Injection molding</i> )	14
1.2.2.3. Litografía blanda 3D ( <i>3D soft lithography</i> )	14
1.2.2.4. Otras técnicas	15
1.2.3. TÉCNICAS DE SELLADO	16
1.2.3.1. Laminación	16
1.2.3.2. Encolado	16
1.2.3.3. Termosellado	16
1.2.3.4. Soldadura con láser	17
1.2.3.5. Soldadura con ultrasonidos	17
1.2.3.6. Oxidación con plasma	17
1.2.3.7. Inyección de resina-gas	17
<b>1.3. Tendencias de la miniaturización</b>	<b>18</b>
<b>1.4. Tecnología LTCC</b>	<b>21</b>
1.4.1. CLASIFICACIÓN Y PROPIEDADES	23
1.4.2. PROCESOS DE MICROFABRICACIÓN	26
1.4.2.1. Perforado	26
1.4.2.2. Láser	26
1.4.2.3. Grabado con vapor a reacción	26
1.4.2.4. Fotolitografía	27
1.4.2.5. Micromecanizado CNC ( <i>Computer Numerically Controlled</i> )	27
1.4.3. TÉCNICAS DE SELLADO	27
1.4.4. APLICACIONES	28
<b>1.5. Sistemas analíticos miniaturizados</b>	<b>29</b>
1.5.1. PLATAFORMAS FLUÍDICAS	30
1.5.2. ETAPAS DE PRETRATAMIENTO	33
1.5.3. GESTIÓN DE FLUIDOS: MICROBOMBAS Y MICROVÁLVULAS	34
1.5.4. MICROACTUADORES	36
1.5.5. SISTEMAS DE DETECCIÓN	37
1.5.5.1. Técnicas electroquímicas	38
1.5.5.2. Técnicas ópticas	42
1.5.6. SISTEMAS ANALÍTICOS FABRICADOS EN LTCC	44



<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>3. METODOLOGÍA DE FABRICACIÓN</b>	<b>49</b>
3.1. Diseño del dispositivo .....	50
3.2. Mecanizado de las capas .....	53
3.3. Serigrafía .....	56
3.4. Integración de otros componentes .....	58
3.5. Laminación.....	59
3.5.1. TERMOCOMPRESIÓN.....	59
3.5.2. LAMINACIÓN A BAJA PRESIÓN Y BAJA TEMPERATURA.....	61
3.6. Sinterización .....	63
3.7. Dispositivos fabricados .....	66
<b>4. DISPOSITIVOS POTENCIOMÉTRICOS</b>	<b>69</b>
4.1. Analizador de ión fosfato con mezclador serpentina (DP1) .....	70
4.1.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	72
4.1.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.....	73
4.1.3. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA .....	73
4.1.3.1. Caudal .....	73
4.1.3.2. Volumen de inyección .....	75
4.1.3.3. Concentración de la solución acondicionadora .....	76
4.1.3.4. Efecto de las interferencias.....	78
4.1.4. CONCLUSIONES.....	80
4.2. Analizador de ión cloruro con mezclador serpentina (DP2) .....	80
4.2.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	81
4.2.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.....	81
4.2.3. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA .....	81
4.2.3.1. Volumen de inyección .....	81
4.2.3.2. Caudal .....	82
4.2.3.3. Concentración de la solución acondicionadora .....	83
4.2.3.4. Efecto de las interferencias.....	83
4.2.3.5. Análisis de muestras reales.....	85
4.2.4. CONCLUSIONES.....	86
4.3. Analizador de ión fosfato con etapa de preconcentración (DP3) .....	86
4.3.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	88
4.3.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.....	89
4.3.3. EVALUACIÓN DE LA ETAPA DE PRECONCENTRACIÓN .....	90
4.3.3.1. Efecto de la configuración del dispositivo .....	90
4.3.3.2. Evaluación del material preconcentrador.....	91
4.3.3.3. Secuencia de análisis .....	93
4.3.4. CONCLUSIONES.....	97
4.4. Analizador de ión amonio con difusión gaseosa (DP4) .....	98
4.4.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	100
4.4.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.....	100
4.4.3. EVALUACIÓN DE LA ETAPA DE SEPARACIÓN .....	102
4.4.3.1. Caudal y tiempo de acumulación.....	102

4.4.4.	CONCLUSIONES .....	104
<b>4.5.</b>	<b>Analizador de ión amonio/nitrato: integración monolítica de ESI y electrodo de referencia sobre estructuras de microfluídica (DP5) .....</b>	<b>104</b>
4.5.1.	MATERIALES Y REACTIVOS .....	108
4.5.2.	MONTAJE EXPERIMENTAL .....	108
4.5.3.	EVALUACIÓN DEL ELECTRODO DE REFERENCIA FABRICADO CON TECNOLOGÍA LTCC .....	109
4.5.4.	EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA DE AMONIO.....	112
4.5.5.	EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA DE NITRATO.....	115
4.5.6.	CONCLUSIONES .....	116
<b>4.6.</b>	<b>Analizador biparamétrico de ión nitrato y cloruro: integración monolítica de ESIs y electrodo de referencia (DP6) .....</b>	<b>117</b>
4.6.1.	MATERIALES Y REACTIVOS .....	118
4.6.2.	MONTAJE EXPERIMENTAL .....	118
4.6.3.	EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA .....	119
4.6.4.	CONCLUSIONES .....	122
<b>4.7.</b>	<b>Sondas de ión nitrato y amonio en suelos (DP7) .....</b>	<b>122</b>
4.7.1.	MATERIALES Y REACTIVOS .....	123
4.7.2.	MONTAJE EXPERIMENTAL .....	124
4.7.3.	EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES QUÍMICAS Y AMBIENTALES EN LA RESPUESTA DE LAS SONDAS .....	125
4.7.3.1.	Elección del electrodo de referencia .....	125
4.7.3.2.	Calibración de la sonda en agua y discontinuo .....	126
4.7.3.3.	Calibración de la sonda en suelo.....	127
4.7.3.4.	Monitorización de la dinámica de los nutrientes en un proceso de crecimiento vegetal.....	128
4.7.4.	CONCLUSIONES .....	130
<b>5.</b>	<b>DISPOSITIVOS AMPEROMÉTRICOS .....</b>	<b>131</b>
<b>5.1.</b>	<b>Analizador amperométrico de pesticidas (DA1) .....</b>	<b>131</b>
5.1.1.	MATERIALES Y REACTIVOS .....	135
5.1.2.	MONTAJE EXPERIMENTAL .....	136
5.1.3.	EVALUACIÓN DEL MICROSISTEMA CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA.....	136
5.1.3.1.	Elección de la geometría del dispositivo.....	136
5.1.3.2.	Optimización de las variables experimentales.....	139
5.1.3.3.	Evaluación del sistema.....	141
5.1.4.	CONCLUSIONES .....	141
<b>6.</b>	<b>DISPOSITIVOS ÓPTICOS .....</b>	<b>143</b>
<b>6.1.</b>	<b>Analizador de ión nitrito con integración monolítica de celda de detección óptica (DO1) .....</b>	<b>143</b>
6.1.1.	MATERIALES Y REACTIVOS .....	144
6.1.2.	DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL MICROSISTEMA.....	145
6.1.3.	MONTAJE EXPERIMENTAL .....	146

6.1.4. EVALUACIÓN .....	148
6.1.4.1. Modelización de la respuesta .....	149
6.1.4.2. Reacción química.....	152
6.1.5. CONCLUSIONES.....	153
<b>6.2. Microanalizador basado en medidas de quimioluminiscencia.</b>	
<b>Celda de medida basada en la configuración</b>	
<b>“mezclador vórtex” (DO2).....</b>	<b>154</b>
6.2.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	157
6.2.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.....	159
6.2.3. EVALUACIÓN Y RESULTADOS.....	160
6.2.3.1. Optimización del volumen de inyección, caudal	
y geometría del dispositivo .....	160
6.2.3.2. Optimización de la concentración y pH de la solución de luminol	
y la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para la determinación de Co <sup>2+</sup> .....	162
6.2.3.3. Evaluación del microsistema para la determinación de paracetamol	
basado en la inhibición inducida por éste en la reacción CL .....	165
6.2.4. CONCLUSIONES.....	170
<b>7. OTRAS APLICACIONES</b>	<b>171</b>
<b>7.1. Potenciómetro.....</b>	<b>171</b>
7.1.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	172
7.1.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.....	174
7.1.3. EVALUACIÓN Y RESULTADOS.....	175
7.1.4. CONCLUSIONES.....	175
<b>7.2. Control de temperatura.....</b>	<b>176</b>
7.2.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	176
7.2.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.....	180
7.2.3. EVALUACIÓN Y RESULTADOS.....	180
7.2.3.1. Caracterización del termistor y el resistor.....	180
7.2.4. CONCLUSIONES.....	182
<b>8. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>185</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

La Química Analítica se ha visto profundamente influenciada por los avances científicos y tecnológicos ocurridos en las últimas décadas. Más allá del uso que los químicos/as analíticos/as hacen de esta disciplina, son muchas las personas que, en diversas áreas de la ciencia, utilizan las herramientas y técnicas desarrolladas por la Química Analítica: desde el estudio del consumo de oxígeno durante el ejercicio, pasando por la monitorización de la contaminación del aire, hasta la sonda espacial que busca signos de vida en otro planeta.

Las industrias y su necesidad de optimizar y controlar la calidad de los productos para ser cada vez más competitivas han potenciado y hecho evolucionar el uso tanto de los métodos de análisis de alta sensibilidad y exactitud como de los que suministran información en tiempo real.

Uno de los paradigmas de la evolución experimentada en esta área de la ciencia, es el nivel de integración que han alcanzado los métodos de análisis clásicos. Se entiende por integración la acción o efecto de unir diferentes partes para formar un todo de manera que éste presente características y funciones que no estaban presentes en las partes constituyentes iniciales. A pesar de que este concepto ha sido más extensamente aplicado en el campo tecnológico (los circuitos integrados (IC) son un ejemplo), el significado que éste tiene en Química Analítica resulta también significativo, ya que las partes que pretenden integrarse son operaciones unitarias de un proceso analítico. Se entiende por proceso analítico la obtención de información útil a través de una secuencia de operaciones bien definida: muestreo, transporte de muestra, separación, reacción, medida, transducción, adquisición de la señal y procesamiento. La mayoría de sistemas analíticos se diseñan siguiendo, en parte o totalmente, la anterior secuencia.<sup>1</sup>

Durante el proceso de integración se dota de conectividad a las etapas del proceso analítico de manera que se minimice al máximo la intervención humana. Así, no sólo se reducen costes y tamaños, sino que se disminuyen los tiempos de análisis y se requiere de personal menos cualificado para su manejo.

Una manera flexible y sencilla de dotar de conectividad, parcial o total, a las operaciones unitarias es mediante el uso de sistemas de flujo continuo. De entre todas las técnicas de flujo continuo existentes, la más utilizada es la denominada Análisis por Inyección en Flujo (FIA). Ésta se basa en la inserción de un pequeño volumen de muestra en un canal por el que circula una disolución que la impulsa hacia un detector.

---

<sup>1</sup> Alegret, S. **in:** *Integrated Analytical Systems*; Alegret, S. (ed.); Elsevier, Amsterdam; **2003**, 1-36.

En su camino hacia el detector, la muestra es sometida a las etapas de pretratamiento necesarias. Estos sistemas de flujo permiten la integración de etapas como la de inyección, mezcla, difusión gaseosa, preconcentración, separaciones electroforéticas, así como una gran variedad de técnicas de detección (potenciométricas, amperométricas, ópticas, etc.).

Los sistemas totales de análisis, además de dotar de trazabilidad y exactitud a las medidas realizadas, confieren la capacidad de resolución temporal mediante el muestreo continuo y la automatización de la medida (a través de la técnica FIA). Sin embargo, presentan algunos inconvenientes como son un procesamiento de muestras lento, limitada selectividad, consumo elevado de reactivos (que se traduce en coste económico e impacto ambiental) y reducida portabilidad. Esto último restringe la posibilidad de dotar de resolución espacial a los sistemas analíticos. Algunas de estas desventajas pueden ser solventadas mediante la miniaturización o escalado de los analizadores. Con la intención de dar respuesta a estas necesidades, y en concordancia con las nuevas tendencias de la ciencia y la tecnología en general, surge un nuevo concepto de sistema de análisis conocido como  $\mu$ -TAS (microsistemas totales de análisis),<sup>2</sup> cuya consecución exige el escalado de todas las operaciones unitarias del procedimiento analítico. La aparición de los  $\mu$ -TAS no sólo permite la fabricación masiva de dispositivos de bajo coste sino que establece una nueva concepción de diseño de dispositivos que permite explotar algunos fenómenos que sólo son viables a microescala, como son los procesos de difusión.

En el año 1975 S.C. Terry presentó el primer dispositivo analítico miniaturizado fabricado en silicio: un analizador cromatográfico.<sup>3,4</sup> A pesar de la innovación del hecho, el impacto que este trabajo tuvo en la comunidad científica fue escaso debido al poco conocimiento que se tenía sobre la tecnología IC. En la década de los 90, cuando Manz presentó por primera vez el concepto  $\mu$ -TAS,<sup>2</sup> el gran desarrollo y la madurez de las tecnologías de microfabricación sobre silicio ayudó a afianzar la nueva idea de microsistemas de análisis entre los investigadores. Resultó clave, además, la explosión de la electroforesis capilar<sup>5,6</sup>, y en particular del flujo electroosmótico (EOF), como nuevo fenómeno de aplicación exclusiva a microescala, para consolidar los analizadores miniaturizados quince años después de la presentación del primer microcromatógrafo realizado en silicio.

Una dificultad añadida que ha ralentizado el desarrollo de este tipo de sistemas es la necesidad de constituir equipos de trabajo multidisciplinares.

---

<sup>2</sup> Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H.M. *Sens. Actuator B-Chem.*, **1990**, *1*, 244.

<sup>3</sup> Terry, S.C.; *Tesis Doctoral*, Stanford, Stanford, CA, **1975**.

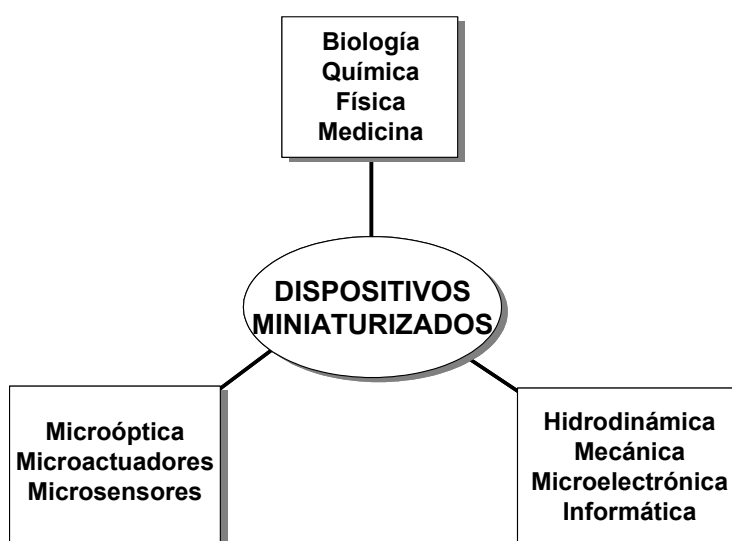
<sup>4</sup> Terry, S.C.; Jerman, J.H.; Angell, J.B. *IEEE Trans. Electron. Devices*, **1979**, *ED-26*, 1880.

<sup>5</sup> *Capillary electrophoresis: Theory and Practice*; Grossman, P.D. and Colburn, J.C. (eds.); Academic Press, New York, **1992**.

<sup>6</sup> Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D. *Anal. Chem.*, **1981**, *53*, 1298.

La complejidad tecnológica derivada de la miniaturización de los diferentes elementos que componen un microsistema analítico (microfluídica, sensores, actuadores, electrónica de control y tratamiento de datos, etc.) hace imprescindible la participación de expertos de muy diversas ramas científicas y tecnológicas. En la figura 1.1 se muestran algunas de las áreas de la ciencia y la tecnología implicadas en el proceso de construcción de este tipo de dispositivos. Cabe puntualizar que la mayoría de ocasiones en las que se habla de microsistemas, se trata en realidad de sistemas en miniatura (del orden de  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  m), o bien se trata de sistemas híbridos donde, como se explicará más adelante, tan sólo alguna de las partes del sistema analítico ha sido realmente miniaturizada, siendo el resto elementos macro.<sup>1</sup>

**Figura 1.1:**  
Multidisciplinaredad  
en la construcción de  
dispositivos  
miniaturizados.

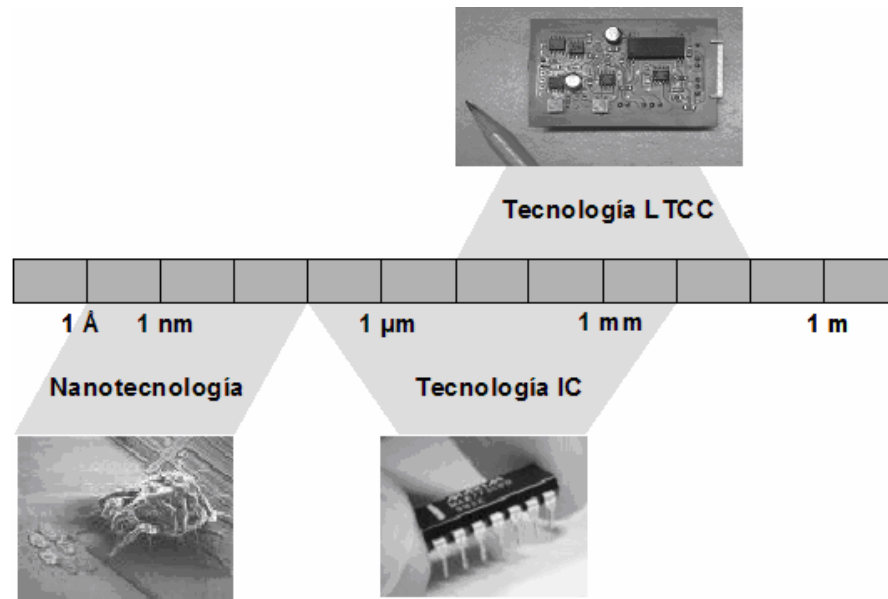


En el esquema de la figura 1.2 se muestran algunos componentes tanto del mundo natural como del tecnológico para situar, en términos de tamaño, los dispositivos miniaturizados de los que se hablará a lo largo de esta tesis.

Existen diversas revisiones bibliográficas que dan una visión excelente de la evolución y el progreso de los sistemas analíticos miniaturizados ( $\mu$ -TAS) así como de su estado actual. Reyes *et al.*,<sup>7,8</sup> por ejemplo, describen tanto la evolución histórica de los dispositivos, pasando por las tecnologías y materiales utilizados, como la construcción de componentes necesarios para desarrollar determinadas operaciones y aplicaciones actuales.

<sup>7</sup> Reyes, D.R.; Iossifidis, D.; Auroux, P.A.; Manz, A. *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 2623.

<sup>8</sup> Auroux, P.A.; Iossifidis, D.; Reyes, D.; Manz, A. *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 2637.



**Figura 1.2:** Situación comparativa de algunas tecnologías de miniaturización.

Otros artículos no tan extensos se centran específicamente en la microfluídica,<sup>9,10</sup> en los materiales utilizados,<sup>11-13</sup> en la integración de etapas de pretratamiento,<sup>14</sup> en los sistemas de detección<sup>15,16</sup> o en el tipo de aplicación.<sup>17</sup>

Tal y como muestran las numerosas publicaciones al respecto, el silicio ha sido sin duda el material más utilizado para la fabricación de microdispositivos. Sin embargo, las últimas tendencias dan a los polímeros un papel importante en el área de la microfabricación debido a algunas ventajas que presentan respecto al silicio. Entre otras cabría destacar su coste, su versatilidad y la rapidez de prototipado.

En el presente trabajo, se propone la tecnología Low Temperature Co-Fired Ceramics (LTCC) o cerámicas verdes como una alternativa a tener en cuenta para la fabricación de analizadores químicos miniaturizados. Con la finalidad de establecer un marco comparativo, en los siguientes apartados se dará una visión global de las tecnologías ya consolidadas y sus materiales asociados, discutiendo sus ventajas e inconvenientes para, finalmente, introducir la tecnología LTCC y sus aplicaciones actuales.

<sup>9</sup> Gravesen, P.; Branebjerg, Jensen O.S. *J. Micromech. Microeng.*, **1993**, *3*, 168.

<sup>10</sup> Shoji, S.; Esashi, M., *J. Micromech. Microeng.*, **1994**, *4*, 157.

<sup>11</sup> Becker, H.; Gärtner, C. *Electrophoresis*, **2002**, *21*, 12.

<sup>12</sup> Moore, D.F.; Syms, R.R.A., **in:** *IEEE Electronics and Communications Engineering Journal*, **1999**, 261.

<sup>13</sup> Ng, J.M.K.; Gitlin, I.; Stroock, A.D.; Whitesides, G.M. *Electrophoresis*, **2002**, *23*, 3461.

<sup>14</sup> Luque de Castro, M.D.; Gámiz-Gracia, L. *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *351*, 23.

<sup>15</sup> Haswell, S.J. *Analyst*, **1997**, *122*, 1R.

<sup>16</sup> Wang, J. *Talanta*, **2002**, *56*, 223.

<sup>17</sup> Chohan, T.; Guttman, A. *Trends Biotechnol.*, **2002**, *20*, 116.

## 1.1 Tecnología del silicio

### 1.1.1 CLASIFICACIÓN Y PROPIEDADES

La continua y creciente inversión en la tecnología del silicio para la obtención de circuitos integrados ha permitido fabricar dispositivos con dimensiones del orden de nanómetros. Una limitación de la tecnología tanto para la obtención de circuitos integrados como elementos de microfluídica miniaturizados es que a medida que las dimensiones de los dispositivos disminuyen, el coste se incrementa drásticamente.

Existen dos tipos de silicio: el polisilicio (poli-Si) y el silicio monocristalino (c-Si). El primero se utiliza como conductor en circuitos integrados, especialmente en FETS (*Field-Effect Transistor*). Consiste en la unión de múltiples monocristales de silicio cuya orientación o alineamiento varía de uno respecto al otro.

Las propiedades más destacables del silicio monocristalino son el resultado del perfecto orden de los átomos en su estructura cristalina cúbica centrada en las caras (fcc).<sup>18</sup> Se utiliza como semiconductor y como sustrato para micromecanizado debido a su grabado anisotrópico perfectamente caracterizado. En la actualidad, los suministradores especializados cubren las demandas del sector de la micromecánica, ofreciendo productos altamente específicos; por ejemplo: bajo contenido de oxígeno, orientación superficial exacta, alineación de planos y baja densidad de defectos cristalinos.

En contraste con los metales o el poli-Si, el c-Si muestra un comportamiento lineal-elástico hasta la fractura y una movilidad de dislocación extremadamente baja. La ausencia de plasticidad (para temperaturas por debajo de 650°C) garantiza el mantenimiento de las propiedades de componentes mecánicos fabricados en este material a lo largo del tiempo.<sup>19</sup>

El c-Si no varía sus propiedades térmicas y ópticas con la orientación del cristal. La baja absorción del silicio a las longitudes de onda normalmente utilizadas en telecomunicaciones y el alto índice de refracción, hacen que este material sea muy útil para lentes refractivas,<sup>20</sup> que se utilizan en grandes cantidades, por ejemplo, en módulos ópticos.<sup>21</sup> El silicio también se utiliza para la fabricación de guías de onda ópticas.<sup>22,23</sup> El silicio es generalmente poco reactivo a temperatura ambiente. El oxígeno y el agua no reaccionan con él debido a la capa protectora de óxido de silicio que se forma en la superficie. Sin embargo, a 900°C el silicio sí que reacciona con agua y a 1400°C con nitrógeno para formar Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y SiN.

<sup>18</sup> *Properties of Crystalline Silicon*; Hull, R. (ed.); Datareview Series nº20, London; **1999**.

<sup>19</sup> Frühauf J.; Gärtner E.; Jänsch E., *J. Micromech. Microeng.*, **1999**, 9, 305.

<sup>20</sup> Hoffmann, M.; Voges, E. *J. Micromech. Microeng.*, **2002**, 12, 349.

<sup>21</sup> Althaus, H.L.; Gramann, W.; Panzer, K. **in**: *IEEE Trans. Compon. Packag. Manuf. Technol.*, **1998**, B21, 147.

<sup>22</sup> Jalali, B.; Yegnanarayanan, X.; Yoon, T.; Yoshimoto, T.; Rendina, I.; Coppinger, F. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. Proc.*, **1998**, 4, 938.

<sup>23</sup> Puyol-Bosch, M. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, **2003**.



En contraste a otros sólidos, el silicio fundido es extremadamente reactivo, formando silicatos con la mayoría de metales.

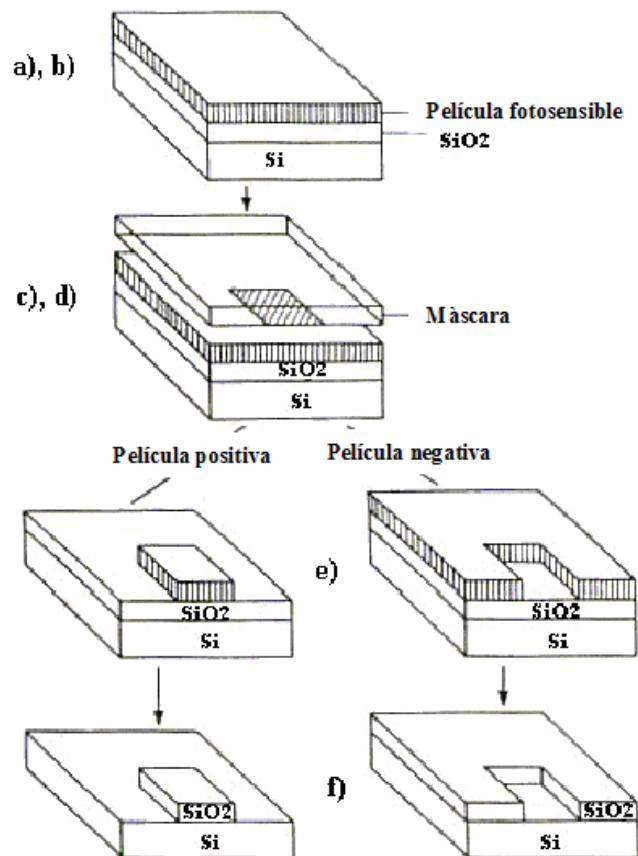
### 1.1.2 TÉCNICAS DE MICROFABRICACIÓN

Al tratamiento superficial del silicio para obtener estructuras mecánicas se le denomina micromecanizado<sup>24</sup> e incluye etapas como: deposición de capas finas, fotolitografía, grabado y sellado.<sup>25</sup>

A continuación se resumen, de manera general, algunas de las etapas de un proceso clásico de microfabricación del silicio.

#### 1.1.2.1 Fotolitografía

La fotolitografía es la técnica más utilizada para la definición de estructuras a micromecanizar.



**Figura 1.3:** Proceso general de micromecanizado de una oblea de silicio.

La figura 1.3 muestra un esquema del proceso. El punto de partida (figura 1.3a) es una oblea de silicio (sustrato) recubierta por una película fina (por ejemplo dióxido de silicio). El objetivo final es retirar ciertas áreas del óxido para definir la estructura deseada (figura 1.3f).

<sup>24</sup> Lin, L.Y.; Goldstein, E.L.; Tkach, R.W. *IEEE Photon. Technol. Lett.*, **1998**, *10*, 525.

<sup>25</sup> www.knovel.com (Junio 2006)

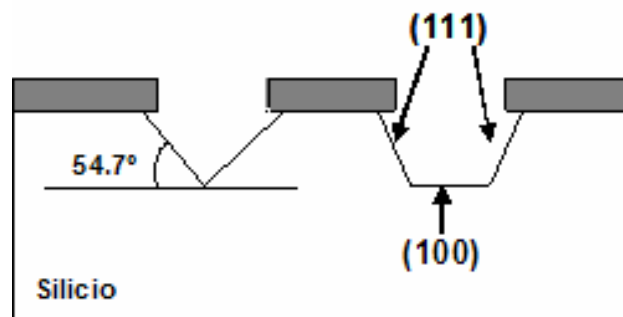
En primer lugar se fabrica la máscara. Normalmente se trata de un diseño realizado en cromo sobre una plancha de vidrio. La oblea se cubre con un polímero sensible a la radiación ultravioleta (figura 1.3b), llamado resina fotosensible o fotoresina (*photoresist*). La luz ultravioleta se irradia a través de la máscara sobre la fotoresina (figura 1.3c), que es revelada, transfiriendo así el modelo de la máscara sobre la resina (figura 1.3d). Existen dos tipos de resinas fotosensibles, denominadas positivas y negativas. Cuando la luz ultravioleta interacciona con las positivas, el polímero se reblandece y cuando la imagen se revela, el polímero se desprende allí donde la luz había interaccionado, transfiriendo la imagen positiva de la máscara a la capa fotosensible. Ocurre lo contrario con una resina negativa. Cuando la luz UV interacciona, refuerza el polímero y cuando éste es revelado, la parte no expuesta a la radiación se puede eliminar y una imagen negativa de la máscara es transferida a la resina fotosensible.

Seguidamente, se aplica un método químico (u otro que sirva) para retirar el óxido que queda expuesto a través de las aperturas de la fotoresina (figura 1.3e). Finalmente, ésta es retirada, dejando el óxido estampado (figura 1.3f).

### 1.1.2.2 Procesos de grabado

Existen dos procesos de grabado: húmedo y seco. En un ataque húmedo, el material se disuelve cuando es sumergido en una solución química; en un ataque en seco, el material es bombardeado o disuelto utilizando iones reactivos o una fase vapor.

a) **Grabado húmedo:** Es la tecnología de grabado más simple: se requiere de un contenedor con una solución que disuelva el material en cuestión. En primer lugar, se ha de tener en cuenta la elección del material para fabricar la máscara, ya que ésta no debe disolverse o, al menos, hacerlo mucho más lentamente que el material a atacar. En segundo lugar, se ha de tener en cuenta el tipo de ataque que presenta el material en cuestión. Así, algunos materiales monocristalinos, como el silicio, presentan un ataque anisotrópico ante ciertos agentes químicos.



**Figura 1.4:**  
Ataque anisotrópico de una oblea de silicio.

En este tipo de grabado, se atacan planos cristalinos a diferentes velocidades. Las estructuras más simples se pueden obtener utilizando KOH como reactivo atacante sobre la dirección cristalina más común (100). Tal y como se puede observar en la figura 1.4, se pueden obtener hendiduras en forma de V u hoyos con paredes con pendiente. Si se utilizan obleas con diferentes orientaciones cristalinas, se pueden conseguir hendiduras con paredes verticales.

El grabado anisotrópico, a diferencia del isotrópico, implica una velocidad de grabado diferente según la dirección del material. Los atacantes isotrópicos, por ejemplo HF, atacan el material con la misma velocidad en todas las direcciones.

b) **Grabado RIE (*Reactive Ion Etching*)**: En este tipo de grabado, el sustrato se sitúa dentro de un reactor en el cual se introducen diferentes gases. Se genera un plasma en la mezcla de gases mediante una fuente de radiofrecuencias, rompiendo las moléculas de gas en iones. Los iones son acelerados hacia la superficie del material donde reaccionan formando nuevo material gaseoso. Esta es la parte química del proceso RIE. La parte física del proceso está relacionada con la energía de los iones que pueden chocar y hacer saltar átomos del material sin que se produzca reacción química.

c) **Grabado DRIE (*Deep RIE*)**: En este proceso se pueden conseguir profundidades de hendidura del orden de centenares de micras de manera casi vertical. La tecnología primaria se basa en el “proceso Bosch” donde se alternan dos composiciones de gas dentro del reactor. La primera crea un polímero sobre la superficie del sustrato y la segunda lo graba. El polímero es bombardeado por la parte física del proceso pero tan sólo de manera horizontal. Debido a la baja disolución del polímero en el proceso químico, éste se coloca en las paredes de la hendidura, protegiéndolas del ataque.

La mayoría de las estructuras micromecanizadas convencionales contienen una topología casi bidimensional, aunque se han publicado algunos trabajos presentando estructuras tridimensionales.<sup>26-28</sup>

M. Madou. y M. Elwenspoek *et al.*, entre otros, presentan revisiones bibliográficas extensivas acerca del micromecanizado del silicio.<sup>29-32</sup>

---

<sup>26</sup> Friedberger, A.; Müller, R.S. *J. Microelectromech. Syst.*, **1998**, 7, 315.

<sup>27</sup> Yi, Y.W.; Liu, C. *J. Microelectromech. Syst.*, **1999**, 8, 10.

<sup>28</sup> Syms, R.R. *Sens. Actuators A-Phys.*, **1998**, 65, 238.

<sup>29</sup> Madou, M.J. **in**: *Fundamentals of microfabrication: the science of miniaturization*; 2da ed.; CRC Press, Boca Raton, Florida, **2002**.

<sup>30</sup> Elwenspoek, M.; Jansen, H. **in**: *Silicon micromachining*; Cambridge University Press, Cambridge, **1999**.

<sup>31</sup> Petersen, K.E. **in**: *Proc. IEEE*, **1982**, 70, 420.

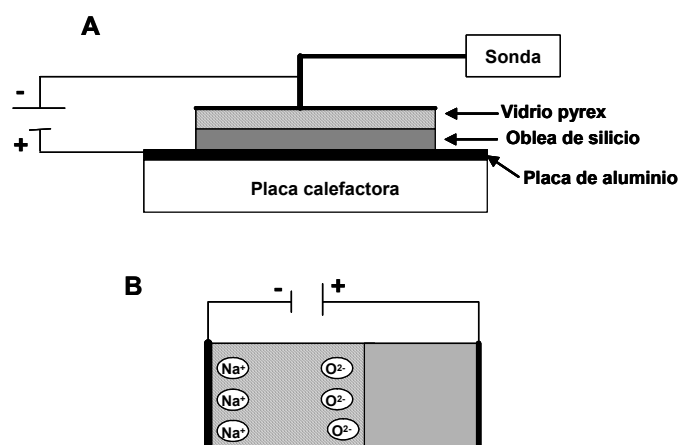
<sup>32</sup> Thornell, G.; Johansson, S. *J. Micromech. Microeng.* **1998**, 8, 251.

### 1.1.3 TÉCNICAS DE SELLADO

Existen varios métodos para unir obleas de silicio micromecanizadas entre ellas o a otros sustratos para formar dispositivos más complejos. Algunos de los más significativos se recogen a continuación.

#### 1.1.3.1 Soldadura anódica (sellado electrostático)

Es el método más comúnmente utilizado para unir obleas de silicio a vidrio. Ambos materiales se disponen uno encima del otro y se calientan a altas temperaturas (400-500°C) (siempre por debajo de la temperatura de transición vítrea del vidrio). La rugosidad de ambas superficies debe ser inferior a 0.1  $\mu\text{m}$  para que queden perfectamente unidas. Se aplica una fuente de corriente continua de manera que la superficie del silicio sea positiva respecto al vidrio. En la siguiente figura se esquematiza el montaje experimental utilizado:



**Figura 1.5:**

Soldadura anódica. **A:** montaje experimental.

**B:** difusión de los iones dentro del vidrio Pyrex debido a la diferencia de potencial aplicada.

El mecanismo implicado en el proceso de unión se atribuye a la presencia de iones móviles en el vidrio. A altas temperaturas, los iones sodio del vidrio ven incrementada su movilidad y son atraídos hacia el electrodo negativo situado en la superficie del vidrio, creándose simultáneamente, un exceso de iones  $\text{O}^{2-}$  en la interfase con el silicio. Estos iones difunden hacia el silicio, reaccionando con él y generando un enlace químico de manera irreversible.<sup>33</sup>

#### 1.1.3.2 Sellado por presión

Se pueden unir obleas de silicio mediante la aplicación de presión bajo agua (unión mediante enlace de silicio).

#### 1.1.3.3 Sellado mediante adhesivo

La unión entre sustratos también puede realizarse mediante capas adhesivas o películas fotosensibles.

<sup>33</sup> Albaugh, K.B. *J. Electrochem. Soc.*, **1991**, *138*, 3089.

Esta opción, sin embargo, tiende a producir la oclusión de la microestructura en la capa de silicio. Aunque la unión anódica y el enlace directo de silicio forman uniones muy fuertes, presentan también algunas desventajas, como son el requerimiento de superficies extremadamente lisas y limpias y en consecuencia, el uso de salas blancas.

## 1.2 Tecnología de polímeros

### 1.2.1 CLASIFICACIÓN Y PROPIEDADES

Los polímeros son sustancias macromoleculares (10.000-100.000 uma) compuestas por más de 1.000 unidades monoméricas. La polimerización de los monómeros se da gracias a una sustancia iniciadora o a un cambio provocado sobre algún parámetro físico de su entorno (luz, presión, temperatura).

Existen varias clasificaciones de polímeros (en función del origen del monómero, del proceso de polimerización, de su comportamiento frente al calor, etc.). En general, se utilizan con más frecuencia plásticos que polímeros puros debido a cierto número y tipo de aditivos que pueden contener los primeros y que influyen positivamente en su procesamiento, así como en las características finales del dispositivo construido. Así, se pueden encontrar elementos de relleno (mica, talco, carbonato de calcio), plastificantes (dioctilftalato en el PVC), estabilizadores de temperatura (compuestos organoestañados), antioxidantes (fenoles, aminas) y estabilizadores de radiación UV (benzofenonas, salicilatos).<sup>34</sup>

Desde el punto de vista de la construcción de dispositivos miniaturizados, la clasificación de los polímeros según su comportamiento frente al moldeo resulta muy útil. Dos ejemplos de materiales de características opuestas dentro de esta clasificación son los termoplásticos y los duroplásticos.<sup>11</sup> Los primeros están constituidos por cadenas moleculares nada o débilmente unidas. A temperaturas superiores a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), estos materiales se convierten en plásticos que pueden ser moldeados adoptando múltiples formas, las cuales se mantienen después de enfriar por debajo de  $T_g$ . En los segundos, las cadenas de polímeros se entrecruzan fuertemente y, en consecuencia, resulta imposible provocar un movimiento molecular para producir un cambio en la forma del polímero. Son más duros y quebradizos que los termoplásticos y sólo se reblandecen un poco antes de llegar la temperatura de descomposición. Una de las características más importantes de los plásticos, clave para determinar si el material será apto o no para un proceso de fabricación determinado, es la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Ésta se define como el rango de temperatura en que el polímero pasa de ser un material rígido vidrioso a uno blando (aunque no fundido). Si la temperatura aplicada es superior a  $T_g$ , el material se convierte en un plástico viscoso y puede ser fácilmente moldeado.

---

<sup>34</sup> Becker, H.; Locascio, L.E. *Talanta*, **2002**, *56*, 267.

Antes de desmoldarlo es necesario enfriar el material por debajo de  $T_g$ , de lo contrario la estabilidad de la geometría conseguida puede verse afectada debido a la relajación producida durante el desmoldado. Existe una gran variedad de polímeros que pueden ser utilizados para construir microsistemas. La tabla 1.1 enumera algunos de ellos, así como el rango de temperaturas de trabajo que toleran (la temperatura entre paréntesis indica los límites de resistencia durante breves períodos de tiempo):<sup>35</sup>

Acrónimo	Denominación química	Rango de temperatura(°C)	
		Mínima	Máxima
HDPE	Polietileno de alta densidad	-50	80 (120)
LDPE	Polietileno de baja densidad	-50	75 (90)
PA	Poliamida (PA6)	-30	80 (140)
PC	Policarbonato	-100	135 (140)
PE	Polietileno (HDPE/LDPE)	-40	80 (90)
PDMS	Polidimetilsiloxano	-40	200
PMMA	Polimetilmetacrilato	-40	85 (90)
POM	Polioximetileno	-40	90 (110)
PP	Polipropileno	-10	120(140)
PS	Poliestireno	-10	70(80)
PVC	Cloruro de polivinilo	-20	80
SI	Goma silicona	-50	180 (250)

**Tabla 1.1:** Polímeros más comunes y rango de temperaturas de trabajo tolerado.

Se puede observar como los rangos de temperatura medios son suficientemente buenos para poder trabajar con los materiales en casi cualquier tipo de aplicación (bio)química.

Para que los polímeros puedan ser utilizados como sustrato para la construcción de microanalizadores químicos, de entre las propiedades que estos presentan, es especialmente importante conocer la resistencia frente las diversas sustancias químicas. La tabla 1.2 resume las características más importantes de diferentes polímeros en cuanto a resistencia química.<sup>36</sup> Como es lógico, se ha de prestar especial atención cuando se utilicen disolventes orgánicos, por ejemplo en el caso de etapas de pretratamiento que incluyan extracciones líquido-líquido, ya que estos agentes pueden modificar drásticamente las propiedades de los polímeros.

<sup>35</sup> www.cienytech.com (Junio 2006)

<sup>36</sup> Weast, R.C.; Astle, M.J. **in:** *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; 60a ed.; CRC Press, Boca Raton, Florida, 1979, C781-C790.

Agente químico	PMMA	PC	PS	PVC	SI
Ácidos débiles	B	E	E	E	R-B
Ácidos fuertes	R-M	R	E	B-E	M-B
Ácidos oxidantes	M	--	M	R-B	--
Bases débiles	B	M	E	E	R
Bases fuertes	M	M	E	B	M
Alcoholes	--	M	E	E	M
Cetonas	D	M	D	M	M
Ésteres	D	M	M	M	--
HC alifáticos	B	M	M	E	R-B
HC aromáticos	M	M	D	M	M
Aceites vegetales, animales, minerales	B	M	E-M	E	B

M: mala; R: regular; B: buena; E: excelente; D: lo disuelve.

**Tabla 1.2:** Comportamiento de algunos polímeros frente a agentes químicos convencionales.

### 1.2.2 TÉCNICAS DE MICROFABRICACIÓN

A mitad de los años 90 aparecieron las primeras tentativas de fabricación de dispositivos mediante el uso de materiales alternativos al silicio como plásticos, cerámicas o metales. La mayor parte de la información aparecida entonces sobre el micromecanizado de polímeros con aplicaciones microfluídicas se encontraba en forma de patentes.<sup>37</sup> En 1996 apareció uno de los primeros ejemplos de canales construidos en plástico mediante una microfresadora.<sup>38</sup> El diámetro mínimo de canal conseguido fue de 800  $\mu\text{m}$ , lo que era comparable al diámetro interno de muchos de los tubos utilizados en sistemas de flujo convencionales y, por lo tanto, no planteaban problemas de mezclado de líquidos debido al alto rango de número de Reynolds obtenido.

<sup>37</sup> Ekström, B.; Jacobsson, G.; Öhman, O.; Sjödin, H. *Patent WO 91/16966, 1990.*

<sup>38</sup> VerLee, D.; Alcock, A.; Clark, G.; Huang, T.M.; Kantor, S.; Nemcek, T.; Norlie, J.; Pan, J.; Walsworth, F.; Wong, S.T. *in: Proc. Solid State Sensor Actuator Workshop, 1996, 9.*

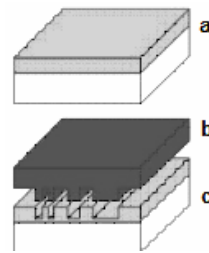
No es hasta finales de los años 90 que empezaron a aparecer ejemplos de canales a microescala, debido al interés e inversión creciente por parte de las empresas para desarrollar tecnología microfluídica.

A continuación se explican brevemente algunas técnicas empleadas en la fabricación de estructuras microfluídicas mediante el uso de polímeros. Se ha optado por mantener entre paréntesis el nombre en inglés, por ser más conocido que su traducción al castellano.

### 1.2.2.1 Estampado y grabado en caliente (*Imprinting and hot embossing*)

Esta técnica consiste en el estampado de un diseño sobre un polímero reblandecido previamente mediante un aumento de temperatura, justo por encima de su temperatura de transición vítrea. El sello utilizado para definir el estampado en el polímero se puede conseguir de diferentes maneras, incluyendo el micromecanizado de silicio, el proceso LIGA (Lithographie, Galvanoformung, Abformtechnik) o el uso de microfresadoras (para tamaños más grandes).

**Figura 1.6:**  
 Moldeado por compresión. **a:** *spin-coating* del termoplástico sobre un sustrato duro. **b:** sello con el motivo en bajorelieve. **c:** grabado en caliente y desmoldado.



La figura 1.6 muestra un esquema del proceso. Para realizar el estampado o grabado de microcanales, se coloca el plástico (en este caso, un termoplástico) sobre un sustrato rígido no deformable. A continuación se aplica una presión determinada durante un tiempo inferior a 10 minutos, entre el sello y el sustrato rígido, quedando el polímero en medio de ambos. En el caso del grabado en caliente, se aplican temperaturas cercanas a la temperatura de transición vítrea y menos presión. Sin temperatura, se necesitan presiones superiores. Algunos de los plásticos comúnmente utilizados para trabajar con esta técnica son: poliestireno (PS), copolímero de polietilén tereftalato (PETG), polimetilmetacrilato (PMMA), cloruro de polivinilo (PVC) y policarbonato.<sup>39-44</sup>

<sup>39</sup> Johnson, T.; Waddell, E.A.; Kramer, G.W.; Locascio, L.E. *Appl. Surf. Sci.*, **2001**, *181*, 149.

<sup>40</sup> Becker, H.; Dietz, W.; Dannberg, P. **in:** *MicroTotal Analysis Systems 1998*; Harrison, D.J. and van den Berg, A. (eds.); Kluwer, Dordrecht, **1998**, 253-256.

<sup>41</sup> Becker, H.; Heim, U. *Sens. Actuators A-Phys.*, **2002**, *83*, 130.

<sup>42</sup> Ueno, K.; Kitagawa, F.; Kim, H.B.; Tokunaga, T.; Matsuo, S.; Misawa, H.; Kitamura, N. *Chem. Lett.*, **2000**, *8*, 858.

<sup>43</sup> Uchiyama, K.; Xu, W.; Yamamoto, M.; Shimosaka, T.; Hobo, T. *Anal. Sci.*, **1999**, *15*, 825.

<sup>44</sup> Soper, S.A.; Ford, S.M.; Qi, S.; McCarley, R.L.; Kelly, K.; Murphy, M.C. *Anal. Chem.*, **2000**, *72A*, 642.



### 1.2.2.2 Moldeado por inyección (*Injection molding*)

Este método, ampliamente utilizado a escala macro para fabricar componentes plásticos en casi cualquier geometría mediante el uso de materiales termoplásticos, se ha aplicado también a la fabricación de componentes a escala micro.<sup>45-48</sup>

El proceso comienza a partir del material en crudo, normalmente de forma granular. Estos gránulos son introducidos en un cilindro que incorpora una hélice a temperatura elevada, donde las bolas empiezan a fundir. El líquido fundido se inyecta mediante altas presiones (normalmente 60-100 MPa = 600-1000 bar) hacia la cavidad del molde donde está la estructura original o master. Posteriormente, la cavidad será enfriada para permitir la expulsión del componente microestructurado. Este proceso, denominado cámara caliente (*variotherm*), permite la fabricación de estructuras más pequeñas que el proceso de cámara fría.

### 1.2.2.3 Litografía blanda 3D (*3D Soft lithography*)

La introducción de técnicas de moldeado basadas en polímeros elastoméricos supuso un gran avance en el área de la microfluídica, ya que permitieron el rápido prototipado de dispositivos sin necesidad de salas blancas. Con esta técnica se construyeron dispositivos del orden de 20-100  $\mu\text{m}$ , que es un rango relevante para sistemas microfluídicos.<sup>49,50</sup> A este tipo de técnicas se las denominó de litografía blanda (*soft lithography*).<sup>49,50-52</sup>

Igual que los métodos comentados hasta el momento, es necesario utilizar una máscara positiva, por ejemplo de silicio. Se deposita el polímero elastomérico sobre el sello de silicio y se cura a temperatura ambiente o a temperaturas ligeramente elevadas para acelerar el proceso (normalmente 40-70°C para el PDMS). A continuación se desprende el polímero del sello.

---

<sup>45</sup> Ekstrand, G.; Holmquist, C.; Orlefors, A.E.; Hellman, B.; Larson, A.; Andersson, P. **in:** *MicroTotal Analysis Systems 2000*; van den Berg, A.; Olthius, W. and Bergveld, P. (eds.); Dordrecht, **2000**, 249-252.

<sup>46</sup> Weber, L.; Ehrfeld, W.; Freimuth, H.; Lacher, M.; Lehr, H.; Pech, B. **in:** *Proc. SPIE Micromachining and Microfabrication Process Technology II*, **1996**, 157.

<sup>47</sup> McCormick, R.M.; Nelson, R.J.; Alonso-Amigo, M.G.; Benvegnu, D.J.; Hooper, H.H. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 2626.

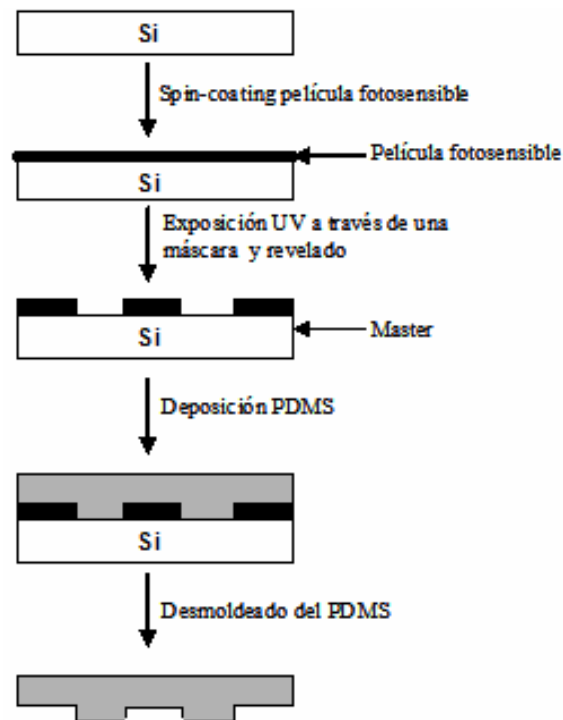
<sup>48</sup> Paulus, A.; Williams, S.J.; Sassi, A.P.; Kao, P.K.; Tan, H.; Hooper, H.H. **in:** *Proc. SPIE Microfluidic Devices and Systems*, **1998**, 94-103.

<sup>49</sup> Duffy, D.C.; McDonald, J.C.; Schueller, O.J.A.; Whitesides, G.M. *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 4974.

<sup>50</sup> McDonald, J.C.; Duffy, D.C.; Anderson, J.R.; Chiu, D.T.; Wu, H.; Whitesides, G.M. *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 27.

<sup>51</sup> Effenhauser, C.S.; Bruin, G.J.M.; Paulus, A.; Ehrat, M. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 3451.

<sup>52</sup> Hosokawa, K.; Fujii, T.; Endo, I. **in:** *MicroTotal Analysis Systems 1998*; Harrison, D.J. and van den Berg, A. (eds.); Kluwer, Dordrecht, **1998**, 307-310.



**Figura 1.7:**  
Proceso de creación de un molde maestro en silicio y, a partir de él, dispositivos en PDMS.

Tal y como se explicará más adelante, el uso de polímeros elastoméricos permite una relativa fácil adhesión entre capas, lo que facilita la construcción de estructuras tridimensionales.<sup>53-55</sup> La figura 1.7 muestra el procedimiento general de fabricación de dispositivos mediante el uso de PDMS, polímero extensamente utilizado en los últimos años para la construcción de elementos microfluídicos.

#### 1.2.2.4 Otras técnicas

La fotoablación por láser (*laser photoablation*) fue propuesta por primera vez por Roberts *et al.*<sup>56</sup> y consiste en la exposición del polímero a un fuente pulsante de rayos UV.<sup>57</sup> El mecanismo exacto mediante el cual se produce la descomposición en el proceso de ablación se desconoce. Se acepta, sin embargo, que se debe a la combinación de procesos de fotodegradación y degradación térmica.<sup>58</sup>

<sup>53</sup> Jackman, R.J.; Brittain, S.T.; Adams, A.; Prentiss, M.G.; Whitesides, G.M. *Science*, **1998**, *280*, 2089.

<sup>54</sup> Anderson, J.R.; Chiu, D.T.; Jackman, R.J.; Cherniavskaya, O.; McDonald, J.C.; Wu, H.K.; Whitesides, S.H.; Whitesides, G.M. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 3158.

<sup>55</sup> Jo, B.H.; Van Lerberghe, L.M.; Motsegood, K.M.; Beebe, D.J. *J. Microelectromech. Syst.*, **2000**, *9*, 76.

<sup>56</sup> Roberts, M.A.; Rossier, J.S.; Bercier, P.; Girault, H. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 2035.

<sup>57</sup> Srinivasan, R. *Polym. Degrad. Stab.*, **1987**, *17*, 193.

<sup>58</sup> Schmidt, H.; Ihlemann, J.; Luther, K.; Troe, J. *Appl. Surf. Sci.*, **1999**, *138-139*, 102.

Otra técnica empleada es la litografía por rayos X (*X-ray lithography*), donde el sustrato polimérico más empleado es el PMMA porque presenta una alta absorción a rayos X (rayos X blandos: 0.7-0.8 nm) y es sensible a la degradación por ellos.<sup>42,59</sup> La máscara que sirve para definir los motivos se realiza en cuarzo-cromo.

Este proceso se utiliza tanto para generar microcanales como para generar sellos (similares a los de silicio) para las técnicas de grabado (*imprinting*) o moldeado por inyección (*injection molding*).

### 1.2.3 TÉCNICAS DE SELLADO

Todos los métodos de fabricación descritos hasta el momento requieren del sellado de los microcanales mediante una tapa para conseguir una estructura totalmente cerrada. El sellado de microcanales poliméricos es más sencillo que los microcanales construidos en silicio o vidrio, ya que se puede conseguir mediante procesos de templado a baja temperatura.<sup>44,60</sup>

El sellado de canales, sobretodo cuando se trata de capilares, es muy importante, tanto que, en ocasiones, resulta la etapa clave del proceso de fabricación de microdispositivos.

A continuación se explican brevemente las técnicas de sellado más comúnmente utilizadas.

#### 1.2.3.1 Laminación

En este proceso se utiliza una fina lámina de PET (polietilén tereftalato), de un grosor aproximado de 30  $\mu\text{m}$ , cubierta con una capa de adhesivo fundible (5-10  $\mu\text{m}$ ) que se dispone sobre la estructura a sellar mediante un rodillo caliente.<sup>56,61</sup> La capa adhesiva funde durante este proceso y ayuda a sellar la lámina al sustrato polimérico que contiene los canales. Este método tiende a provocar la obturación de los canales por culpa del adhesivo.

#### 1.2.3.2 Encolado

Proceso similar a la laminación. Se basa en el uso de un adhesivo para colar el sustrato polimérico a su tapa.<sup>51,61</sup> Se dan los mismos problemas de oclusión de los microcanales que en el proceso de laminación.

#### 1.2.3.3 Termosellado

Esta metodología es sólo aplicable para diseños con áreas estructuradas pequeñas en comparación con la superficie total del chip y para polímeros que soporten temperatura sin variar drásticamente sus propiedades químico-físicas.<sup>48</sup>

---

<sup>59</sup> Ford, S.M.; Kar, B.; McWhorter, S.; Davies, J.; Soper, S.A.; Klopff, M.; Calderon, G.; Saile, V. *J. Microcolumn*, **1998**, *10*, 413.

<sup>60</sup> Locascio, L.E.; Perso, C.E.; Lee, C.S. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *857*, 275.

<sup>61</sup> Soane, D.S.; Soane, Z.M.; Hooper, H.H.; Alonso-Amigo, M.G. *International Patent Application WO 98/45693*, **1998**.

#### 1.2.3.4 Soldadura con láser

Los polímeros pueden unirse entre sí mediante el fundido local producido por el calor generado por un láser.

Esta técnica ha sido poco utilizada en el caso de fabricación de microcanales porque el sellado de éstos implicaría un tiempo de exposición al láser demasiado elevado (a lo largo de todo el canal) y podría provocar daños en la estructura.

#### 1.2.3.5 Soldadura con ultrasonidos

En este caso, se produce el calentamiento local mediante la densidad de energía de una onda ultrasónica.

#### 1.2.3.6 Oxidación con plasma

Esta técnica ha resultado ser muy adecuada para unir el PDMS a diferentes superficies (vidrio, silicio, óxido de silicio, cuarzo, nitruro de silicio, polietileno, poliestireno y carbono vítreo). Se supone que el enlace irreversible generado es debido a una reacción de condensación que genera un enlace covalente siloxano.<sup>49</sup>

El caso del PDMS es particular, ya que éste es un material que puede unirse de manera no permanente a varios materiales, como al propio PDMS, vidrio, silicona, polietileno y poliestireno. Sin embargo, no se une a PMMA, poliamida o policarbonato.<sup>49,62,63</sup>

Las técnicas que implican el uso de altas energías, en ocasiones, pueden alterar la superficie de los polímeros de manera irreversible.<sup>64</sup>

#### 1.2.3.7 Inyección de resina-gas

Esta técnica permite realizar simultáneamente la modificación superficial del polímero y el rellenado de los microcanales mediante una resina que actuará como tamiz en sistemas en los que se desee llevar a cabo, por ejemplo, separaciones de ADN mediante electroforesis. El proceso consiste en ir alternando la inyección de resina (unas veces con finalidades adhesivas, otras para rellenar los canales) con el curado con radiación UV. Normalmente se hace uso de máscaras para delimitar aquellas zonas en las que se desea polimerizar la resina.<sup>64</sup>

Todas estas técnicas de sellado tienen el inconveniente de requerir condiciones de fabricación y procesamiento muy limpias, ya que la contaminación debida a partículas puede reducir significativamente la calidad del enlace. Es por ello que se recomienda trabajar en salas blancas.

---

<sup>62</sup> Kwok, Y.C.; Jefferey, N.T.; Manz, A. *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 1748.

<sup>63</sup> Barker, S.L.R.; Tarlov, M.J.; Canavan, H.; Hickman, J.J., Locascio, L.E. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 4899.

<sup>64</sup> Lai, S.; Cao, X.; Lee, L.J. *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 1175.

### 1.3 Tendencias de la miniaturización

En la mayor parte de los trabajos publicados sobre microfluídica aparecidos a partir de la década de los años 90, se utiliza como sustrato vidrio, cuarzo o silicio; hecho justificado si se tiene en cuenta el gran avance de técnicas como la fotolitografía y el grabado húmedo para la producción de microestructuras.<sup>65</sup>

Las tendencias actuales, sin embargo, plantean nuevas direcciones. Alan J. Heeger, ganador del premio Nobel en el 2000 por haber participado en la creación del primer polímero conductor en 1977, afirmó: “aunque las aplicaciones electrónicas del plástico hoy en día están muy por detrás de aquellas basadas en el uso de silicio, la velocidad a la que se están desarrollando elementos electrónicos, como los transistores poliméricos, es increíble y el mercado potencial se está expandiendo al mismo ritmo”.<sup>66</sup>

Un ejemplo de la expansión real de los polímeros en el área de la microfabricación es la colaboración entre las compañías Motorola Inc., Dow Chemical y Xerox, que están desarrollando en la actualidad métodos de impresión con los que se podrían fabricar circuitos flexibles de plástico a la velocidad de impresión de un periódico.<sup>66</sup>

En el ámbito europeo, y gracias a la fuerte presencia de industrias químicas en el continente, el 1 de julio de 2004 se inició el programa PolyApply subvencionado en un 50% por la Unión Europea (unos 25 millones de euros). El proyecto, que finaliza el 31 de diciembre de 2007, integra más de 20 compañías e institutos de investigación con un único objetivo: el desarrollo de componentes electrónicos mediante el uso de polímeros, en particular, se centran en el desarrollo de tarjetas poliméricas de identificación mediante radiofrecuencias (RFID), es decir, códigos de barras inteligentes que, mediante antenas, permitirán la comunicación entre paquetes y productos con los ordenadores de las empresas, tiendas y casas particulares.<sup>67</sup>

Los principales motivos que explican la tendencia progresiva a sustituir el silicio por los polímeros como sustratos para microelectrónica (haciéndose pues extensivo a otras áreas como la microfluídica) son de tipo económico, aunque también existen otras razones más aplicadas, que hacen más aptos unos materiales que otros debido a algunas de sus propiedades fisico-químicas.

En la tabla 1.3 se comparan los precios de diferentes sustratos utilizados para la fabricación de chips microfluídicos. Se ha de tener en cuenta que estos valores tan sólo reflejan el coste del material, sin contemplar el valor del proceso de micromecanizado, ni la mano de obra especializada. De manera general, se puede utilizar como parámetro comparativo el uso o no de salas blancas, que encarecen notablemente el proceso de fabricación, en comparación con otras metodologías de trabajo.

---

<sup>65</sup> de Mello, A. *Lab Chip*, **2002**, 2, 31N.

<sup>66</sup> [www.businessweek.com](http://www.businessweek.com) (Junio 2006)

<sup>67</sup> [www.polyapply.org](http://www.polyapply.org) (Junio 2006)

MATERIAL	PRECIO	FABRICANTE
Oblea de silicio <sup>a</sup>	0.14 €/cm <sup>2</sup> (25 €/oblea)	Okmetic <sup>68</sup>
Oblea de silicio SOI ( <i>Silicon On Insulator</i> )	1.9 €/cm <sup>2</sup> (340 €/oblea)	SOITEC <sup>69</sup>
Glass ( <i>soda lime glass</i> ) <sup>c</sup>	0.003 €/cm <sup>2</sup> (3 €/pie <sup>b</sup> )	Micralyne <sup>70</sup>
PDMS ( <i>Sylgard</i> ® 186 <i>Silicone Elastomer</i> )	0.08 €/g (40 €/500g)	Dow Corning <sup>71,72</sup>
LTCC <sup>b</sup>	0.04 €/cm <sup>2</sup> (1000 €/ 26.000 cm <sup>2</sup> )	Dupont <sup>73</sup>

<sup>a</sup> Área de una oblea de 7.6 cm de diámetro (180 cm<sup>2</sup>)

<sup>b</sup> Rollo de 50 pies x 6.625"

<sup>c</sup> De 2.5 cm de grosor

**Tabla 1.3:** Comparación entre precios de diferentes materiales utilizados en la fabricación de dispositivos a microescala.

Aunque el vidrio es un material más barato que el silicio, desde el punto de vista de la aplicación, la elección entre estos materiales como sustrato para el micromecanizado de estructuras, debe hacerse teniendo en cuenta, a parte de los costes de fabricación, su idoneidad para la función prevista.

Gran parte de los trabajos presentados sobre miniaturización de sistemas de análisis se centran en dispositivos que integran métodos de separación, tales como la electroforesis capilar (CE).<sup>74,75</sup>

Aunque los chips de silicio se utilizaron mucho en CE, su conductividad comportaba problemas al aplicar los altos voltajes necesarios para generar el flujo electroosmótico (EOF).<sup>76,77</sup> En consecuencia, la mayoría de dispositivos enfocados a separaciones electroforéticas fueron construidos mediante el uso de vidrios. Los vidrios poseen algunas características que los hacen especialmente aptos para estas aplicaciones, tales como una química de superficie bien definida, mejores características ópticas y buenas propiedades electroosmóticas.

<sup>68</sup> www.okmetic.com (Junio 2006)

<sup>69</sup> www.soitec.com (Junio 2006)

<sup>70</sup> www.micralyne.com (Junio 2006)

<sup>71</sup> www.dowcorning.com (Junio 2006)

<sup>72</sup> www.ellsworth.com (Junio 2006)

<sup>73</sup> www.dupont.com (Junio 2006)

<sup>74</sup> Manz, A.; Harrison, D.J.; Verpoorte, M.J.; Fettingner, J.C.; Paulus, A.; Ludi, H.; Widmer, H.M. *J. Chromatogr.*, **1992**, 593, 253.

<sup>75</sup> Harrison, D.J.; Fluri, K.; Seiler, K.; Fan, Z.H.; Effenhauser, C.S.; Manz, A. *Science*, **1993**, 261, 859.

<sup>76</sup> Harrison, D.J.; Glavina, P.G. *Sens. Actuators B-Chem.*, **1993**, 10, 107.

<sup>77</sup> Jeong, Y.; Kim, S.; Chun, K.; Chang, J.; Chung, D.S.; *Lab Chip*, **2001**, 1, 143.

Sin embargo, aunque el micromecanizado de vidrio (similar al del silicio) se puede realizar de manera automatizada (incluyendo como etapas básicas la limpieza de los sustratos, la transferencia del diseño fotolitográficamente y el grabado), es un proceso que no sólo requiere de mucho tiempo y personal cualificado, sino que es caro debido en parte, a los costes asociados al equipamiento y mantenimiento de las salas blancas. Es por eso que el uso de polímeros, como el PDMS, ha tenido muy buena aceptación en el campo de la miniaturización de sistemas analíticos. Algunas de las ventajas que presenta son la fabricación de dispositivos a menor coste que los de silicio. De esta manera se puede pensar en la idea de dispositivos de un solo uso que solventaría algunos problemas asociados a los microcanales, tales como la obturación o la contaminación entre muestras.

En el caso concreto de aplicaciones electroforéticas, a pesar de la falta de grupos ionizables en las estructuras poliméricas,<sup>44,78</sup> existen diversos ejemplos de dispositivos fabricados en plástico que, bien sea mediante variaciones en las técnicas de construcción,<sup>79</sup> bien sea mediante la modificación superficial de las paredes poliméricas de los canales,<sup>80,81</sup> han conseguido flujos electroosmóticos perfectamente definidos y controlados.

Parece pues que la cronología de los hechos nos propone al vidrio como alternativa al silicio ya que, pese a tener metodologías de fabricación igual de complejas, presenta algunas ventajas respecto a determinadas aplicaciones (bio)químicas. Sin embargo, los polímeros, y en especial el PDMS, son los protagonistas actuales de la micromecanización por ser materiales baratos y fáciles de trabajar. Por otro lado, presentan también algunas desventajas como por ejemplo la necesidad de funcionalizar las paredes de los microcanales para conseguir determinadas aplicaciones químicas y el sellado entre capas. El sellado en sistemas de PDMS, mediante la formación de enlaces O-Si-O, resulta mucho más sencillo que en el caso del vidrio (~600°C) o silicio (>800°C o voltajes de 500-1500 V para generar el enlace anódico).<sup>50</sup> Sin embargo el proceso de formación del enlace (445 KJ/mol) requiere de una oxidación con plasma, hecho que complica instrumentalmente el proceso de construcción de los dispositivos. Otra desventaja de los dispositivos construidos en PDMS es que no soportan determinadas presiones generadas por los fluidos en su interior, llegándose a observar pérdidas de líquidos en las interfases, así como deformaciones de las estructuras internas.<sup>82</sup>

---

<sup>78</sup> Ocvirk, G.; Munroe, M.; Tang, T.; Oleschuk, R.; Westra, K.; Harrison, D.J. *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 107.

<sup>79</sup> Pugmire, D.L.; Wadell, E.A.; Haasch, R.; Tarlov, M.J.; Locascio, L.E. *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 871.

<sup>80</sup> Wang, J.; Pumera, M.; Chatrathi, M.P.; Rodriguez, A.; Spillman, S.; Martin, R.S.; Lunte, S.M. *Electroanalysis*, **2002**, *14*, 1251.

<sup>81</sup> Lui, Y.; Fanguy, J.C.; Bledsoe, J.M.; Henry, C.S.; *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 367.

<sup>82</sup> Li, S.; Floriano, P.N.; Christodoulides, N.; Fozdar, D.Y.; Shao, D.; Ali, M.F.; Dharshan, P.; Mohanty, S.; Neikirk, D.; McDevitt, J.T.; Chen, S. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, *21*, 574.

Con el objetivo de conseguir sistemas de análisis total miniaturizados ( $\mu$ -TAS), no sólo es necesario tener en cuenta los elementos de microfluídica y los materiales con los que se construyen sino también otros elementos integrantes como bombas, válvulas, etapas de pretratamiento de muestra, sistemas de detección y el control electrónico de las señales generadas por éstos. Por tanto, la elección de la técnica de miniaturización más adecuada se ha de hacer teniendo en cuenta la necesaria integración de cada una de las operaciones unitarias que conforman un proceso analítico. Cada una de estas operaciones unitarias puede conllevar el uso de materiales específicos que pueden ser diferentes al sustrato empleado como soporte microfluídico. Por ejemplo, la integración de elementos de bombeo puede implicar el uso de ferrofluidos que, accionados mediante imanes, impulsen los líquidos a través de los canales; una etapa de pretratamiento puede consistir en la integración de una resina de intercambio iónico en forma de perlas sólidas; los sistemas de detección pueden requerir del uso de pistas serigrafiadas conductoras o la inserción de elementos metálicos, así como la integración de otro tipo de materiales como las membranas poliméricas selectivas a iones. Así pues, sería muy interesante que la técnica de fabricación escogida no sólo fuera apta como sustrato para la fabricación de la plataforma fluídica, sino también de estructuras tridimensionales complejas que facilitarían la integración del máximo número de operaciones unitarias del proceso analítico.

#### 1.4 Tecnología LTCC

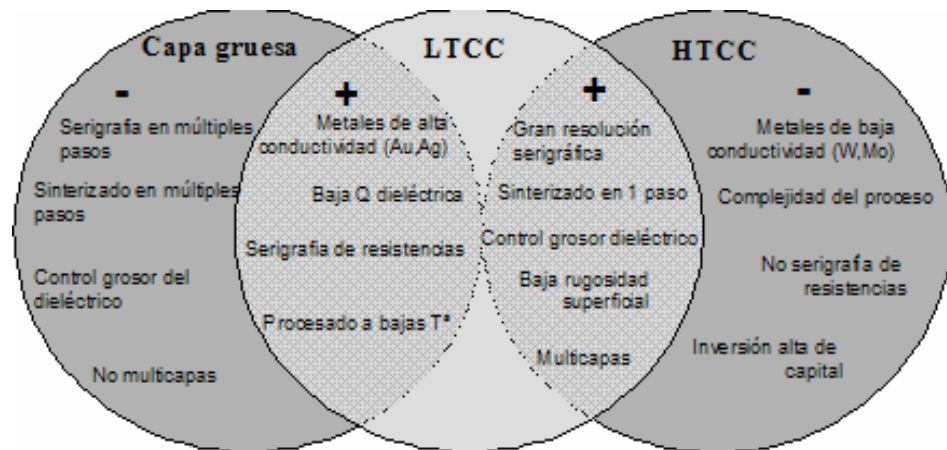
La tecnología LTCC presenta algunas ventajas muy interesantes que la convierten en una tecnología a tener en cuenta como alternativa a las ya detalladas. A continuación se intentará ofrecer una visión general de la tecnología LTCC, desde los materiales implicados a las aplicaciones más comunes, pasando por diversas técnicas de fabricación empleadas, con la finalidad de justificar el uso de este material como sustrato para la construcción de microanalizadores.

La tecnología LTCC fue desarrollada originalmente por Hughes y DuPont con finalidades militares,<sup>83</sup> y fue concebida como un híbrido entre las ventajas de las tecnologías de capa gruesa (*thick film*) y la HTCC (*High Temperature Co-fired Ceramics*), tal y como se puede observar en la figura 1.8. A las capas de cerámica se las llama de “baja temperatura” porque el proceso de sinterizado tiene lugar a temperaturas por debajo de los 1000°C, valores habituales para otros materiales cerámicos. El término “*co-fired*” hace referencia a la posibilidad de sinterizar conjuntamente pastas conductores serigrafiados y el sustrato cerámico de manera totalmente compatible. La demanda de dispositivos electrónicos de tamaño cada vez más reducido y multifuncionales para agendas electrónicas, teléfonos móviles, etc. ha hecho patente la necesidad de obtener circuitos multicapa de creciente densidad.

<sup>83</sup> [http://www2.dupont.com/MCM/en\\_US/uses\\_apps/military.html](http://www2.dupont.com/MCM/en_US/uses_apps/military.html) (Junio 2006)



En este sentido, las ventajas principales que impulsaron el desarrollo de la tecnología LTCC fueron la facilidad de construcción de sistemas complejos multicapa que permitieran la integración de otros componentes y el procesado en cadena, que reducía significativamente los costes y tiempos de producción.<sup>84</sup>



**Figura 1.8:** Comparación de tecnologías cerámicas híbridas.

Los materiales cerámicos han sido utilizados durante muchos años en la fabricación de circuitos electrónicos y sus componentes. Su nacimiento tuvo lugar en los años 60 en paralelo a la explosión de la tecnología de capa gruesa. Los años 70 marcaron su mayor crecimiento, sobretodo debido al gran número de aplicaciones militares que se le dieron. Con la llegada de la tecnología de montaje superficial (SMT, *Surface Mount Technology*) durante los años 80, surgió la posibilidad de miniaturización de los circuitos electrónicos.

A partir de los 90 son múltiples los ejemplos de aplicaciones cerámicas en campos como MCM (*Multi Chip Modules*), RF (radiofrecuencias) o MW (microondas) y, más recientemente, en MST (*Micro System Technologies*).

Algunos de los motivos principales por los cuales la tecnología LTCC resulta adecuada para llevar a cabo la integración y miniaturización de tanto elementos electrónicos como fluidicos son los siguientes:

- Fabricación de dispositivos multicapa.
- Simplicidad de micromecanizado en “estado verde” con motivos que van de las 25 micras a milímetros.
- Aplicables métodos de producción en masa.
- Facilidad de integración de circuitos microelectrónicos mediante técnicas híbridas o monolíticas.
- Posibilidad de modificación de las propiedades físico-químicas de la propia cerámica en función de las necesidades del usuario.
- Dispositivos robustos.
- Técnicas de fabricación simples y baratas.

<sup>84</sup> Gongora-Rubio, M.R.; Espinoza-Vallejos, P.; Sola-Laguna, L.; Santiago-Aviles, J.J. *Sens. Actuators A-Phys*, **2001**, *89*, 222.

### 1.4.1 CLASIFICACIÓN Y PROPIEDADES

Las cerámicas LTCC se denominan también cerámicas “verdes” porque son manipuladas en el estado “verde”, es decir, cuando todavía son blandas y mecanizables. Una vez han sido sinterizadas, el material se vuelve duro y sólo es posible trabajarlo mediante herramientas especiales de diamante.

A pesar del adjetivo “verde”, las cerámicas son de color azul, que se hace más intenso después del sinterizado, debido a sales de cobalto que incorpora (aluminato de cobalto,  $\text{CoAlO}$ , en el caso de la cerámica 951 de Dupont). Una composición habitual de estos materiales comprende un 45% de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 40% de vidrio y un 15% de compuestos orgánicos. Aunque el material principal o *filler* es alúmina, otros óxidos, tipo óxido de berilio (gran conductor térmico), perovskitas ferroeléctricas o cerámicas fotovoltaicas-piezoeléctricas podrían ser usados. Respecto a los compuestos orgánicos que forman parte de la composición, existen tres tipos mayoritarios:<sup>85</sup>

a) **Disolvente:** Ayuda a disolver los aditivos orgánicos; proporciona una viscosidad adecuada al material y ayuda a dispersar las partículas sólidas cerámicas. Por ejemplo: xileno, etanol.

b) **Plastificante:** Da flexibilidad de manera que la cerámica pueda ser fácilmente manipulada. Por ejemplo: Santicizer 160, UCON.

c) **Aglutinante:** Permite que las partículas cerámicas permanezcan unidas. Por ejemplo: Butvar 98.<sup>86</sup>

Muchos grupos de investigación trabajan en la modificación de los componentes de la cerámica con la finalidad de adaptar las características físico-químicas finales del material a sus necesidades, de ahí la alta variabilidad de LTCC encontradas en el mercado. Como muestra de ello, la tabla 1.4 muestra algunos de los fabricantes habituales de cerámicas verdes:

PROVEEDOR	REFERENCIA
Dupont	<a href="http://www.dupont.com">www.dupont.com</a>
Ferro	<a href="http://www.ferro.com">www.ferro.com</a>
Heraeus	<a href="http://www.heraeus.com">www.heraeus.com</a>
CeramTec	<a href="http://www.ceramtec.com">www.ceramtec.com</a>
ESL Electro-Science	<a href="http://www.electroscience.com">www.electroscience.com</a>
Kyocera	<a href="http://www.kyocera.de">www.kyocera.de</a>
Nikko	<a href="http://www.nikkos.co.jp">www.nikkos.co.jp</a>
Northrop Grumman	<a href="http://www.es.northropgrumman.com">www.es.northropgrumman.com</a>

**Tabla 1.4:** Listado de fabricantes de cerámicas para usos electrónicos.

<sup>85</sup> Luo, X.J.; Zhang, B.L.; Li, W.L.; Zhuang, H.R. *J. Mater. Sci.*, **2004**, *39*, 4387.

<sup>86</sup> Jantunen, H. *Tesis Doctoral*, University of Oulu, Oulu, Finlandia, **2001**.

Comercialmente, las cerámicas son producidas en capas de grosor variable, normalmente entre 100 y 400  $\mu\text{m}$ . Este grosor se controla durante el proceso de fabricación mediante un sistema *Doctor Blade*.

La fabricación de las capas de cerámica, una vez formulada la composición deseada, se realiza mediante su deposición en una cinta mecánica sobre la cual se halla una película de acetato de celulosa, Teflon®, Mylar® o celofán. Mediante un proceso de cocido suave se eliminan parte de los componentes orgánicos volátiles, obteniendo una cinta flexible que puede ser mecanizada fácilmente.

Una de las características más importantes a tener en cuenta durante el proceso de diseño y fabricación de un dispositivo mediante el uso de LTCC, es el encogimiento que estos materiales sufren en presencia de una fuente de calor. Este fenómeno es consecuencia de la volatilización de sus componentes orgánicos. Según DuPont,<sup>73</sup> sus cerámicas encogen un 12.7% en los ejes X-Y y un 15% en el eje Z. Otras cerámicas, como las 0-*Shrinkage* de Heraeus, no encogen en el eje X-Y (0.2%) y sí en el Z (32%). Existen, tal y como se explicará en secciones posteriores (§3.6), varios métodos a seguir para evitar los problemas que se puedan derivar de este fenómeno.

En general, los valores de encogimiento son bastante predecibles, de manera que se pueden compensar mediante el diseño inicial de los motivos a construir. Este hecho es especialmente crítico cuando en el interior del dispositivo cerámico se pretende integrar un componente de otro material diferente al cerámico, por ejemplo pequeñas placas de platino, rejillas metálicas, chips de silicio, etc. Puesto que estos elementos no encogen, o lo hacen en un porcentaje diferente a las cerámicas, es necesario diseñar perfectamente la cavidad donde van a ser alojados para que, una vez que la cerámica haya encogido, el material insertado no provoque fisuras en el dispositivo.

Otra característica importante a tener en cuenta, sobretodo para determinadas aplicaciones (bio)químicas, es la porosidad del material una vez sinterizado. La porosidad de los sistemas LTCC es muy baja debido a la presencia de material vítreo en su composición. El tamaño de grano y, en consecuencia, la rugosidad media de la superficie de la cerámica sinterizada, es del orden de 0.3  $\mu\text{m}$ .<sup>87</sup> Sin embargo, la rugosidad a tener más en cuenta es aquella generada por el método de mecanización. En el caso de trabajar con una microfresadora, la rugosidad que queda en los canales viene dada por la forma de la broca o fresa utilizada, y es bastante elevada. Sin embargo, si se trabaja con un láser, la rugosidad se minimiza. Por tanto, si se piensa en el uso de material biológico, enzimas por ejemplo, para realizar análisis resultará vital tener en cuenta que, debido a la alta rugosidad de los canales, se podrán producir adsorciones de dicho material a lo largo del circuito hidráulico. Para evitar problemas de contaminación entre muestras se requerirá la introducción de etapas intermedias de limpieza.

---

<sup>87</sup> Dupont LTCC *datasheet*.

Otra característica a destacar en este tipo de material, es el hecho de que, debido a la alta temperatura de fusión de los materiales empleados en la composición de las cerámicas verdes, se requiere de un proceso de sinterización para convertir la capa cerámica blanda en un material sólido denso y rígido. Hausner define el proceso de sinterización como “la unión de partículas en una masa de polvo debido a atracciones moleculares o atómicas en el estado sólido por aplicación de calor, causando el reforzamiento de la masa de polvos y resultando en una densificación y recristalización por transporte de materiales.”<sup>88</sup> Kuczynski, extiende la definición a un transporte de materia difusional debido a la acción de fuerzas capilares.<sup>89</sup> En este sentido, existen cuatro tipos de procesos de sinterización:<sup>90,91</sup>

- a) **En fase sólida:** El que tiene lugar sobre un polvo sin la formación de una fase líquida.
- b) **En fase líquida:** Proceso en el cual la temperatura de sinterización se encuentra por encima del punto de fusión del constituyente que antes funde, de manera que la sinterización tiene lugar en presencia de una fase líquida.
- c) **Viscosa:** Proceso muy común en muchos sistemas cerámicos que contengan gran cantidad de silicatos, ya que éstos, normalmente acompañados de óxidos alcalinos, tienen una elevada viscosidad.
- d) **Vitrificación:** Proceso mediante el cual se convierte un material en un sólido amorfo, sin estructura cristalina, ya sea por sustracción o adición de calor o mediante el mezclado con un aditivo.

En el caso de las cerámicas verdes, por tratarse de un material compuesto por vidrio y partículas de alúmina, la sinterización experimentada es del tipo viscosa. Asumiendo una distribución aleatoria de los granos de alúmina, supuestamente esféricos, un modelo simple de sinterización sería como el que se muestra en figura 1.9. Durante el proceso, debido al incremento de temperatura, los gránulos de vidrio pasan a estado viscoso y los de alúmina, que permanecen en el sólido, resultan envueltos por el vidrio debido a fuerzas capilares. A medida que la temperatura decrece, tiene lugar la vitrificación del vidrio y la densidad del material se ve incrementada.<sup>84</sup>

---

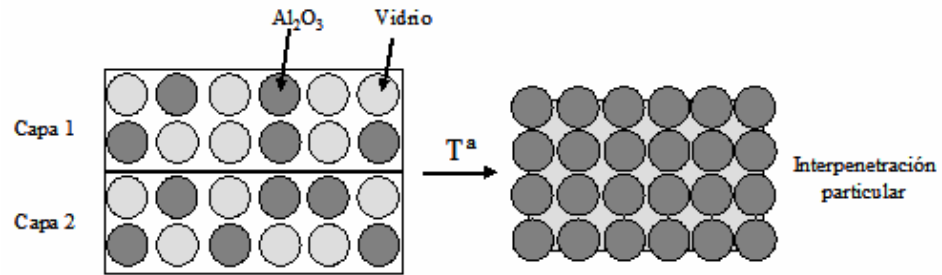
<sup>88</sup> Hausner, H.H. **in:** *Sintering New Development*, M.M. Ristic (ed.), Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam, **1979**, 3.

<sup>89</sup> Kuczynski, G.C. **in:** *Sintering New Development*. M.M. Ristic (ed.), Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam, **1979**, 245.

<sup>90</sup> Rahaman, M.N. *Ceramic Processing and Sintering*, Marcel Dekker, New York, **1995**.

<sup>91</sup> Kuang, X.; Carotenuto, G.; Nicolais, L. *Advanced Performance Materials*, **1997**, 4, 257.

**Figura 1.9:** Interpenetración de las partículas de alúmina durante el proceso de sinterización. Unión de las capas constituyentes iniciales y formación de un bloque sólido homogéneo.



Respecto a las rampas de temperatura empleadas en el proceso de sinterización, aunque dependen del material y cada fabricante especifica sus propias condiciones, en general consisten en dos períodos de temperatura constante a los que se llega mediante rampas más o menos rápidas. En la primera meseta de temperatura (300-400°C), se eliminan los componentes orgánicos de la cerámica. En la segunda (750-850°C) tiene lugar la temperatura de transición vítrea de la mayoría de vidrios, con lo que comienza la fase de interpenetración de los granos de alúmina entre capas de manera que, al final del proceso de sinterización, no es posible distinguir las capas que inicialmente formaban el dispositivo, sino que se obtiene un bloque sólido y homogéneo.

#### 1.4.2 PROCESOS DE MICROFABRICACIÓN

A continuación se explican los procesos de fabricación más comúnmente utilizados con cerámicas verdes. Al igual que los procesos explicados para silicio y polímeros, estos también fueron optimizados inicialmente para la construcción de circuitos electrónicos.

##### 1.4.2.1 Perforado

Teniendo en cuenta que la principal aplicación de las cerámicas verdes es la fabricación de circuitos electrónicos de varias capas, conectadas entre ellas mediante vías conductoras, se entiende que el método de perforación mediante el uso de brocas sea el más utilizado para el mecanizado de cerámicas verdes, sobretodo para producciones en masa. Los costes de los equipos, sin embargo, son muy elevados para mediana o pequeña producción.

##### 1.4.2.2 Láser

Los láseres de Nd-Yag, CO<sub>2</sub>, IR o pulsados de excímero (XeF, XeCl) son aquellos que consiguen la mínima tolerancia y mayor rapidez de fabricación. El coste de los equipos también es demasiado alto si no se desean realizar grandes producciones.

##### 1.4.2.3 Grabado con vapor a reacción

Esta técnica se basa en el uso de un propulsor de disolvente colimado de manera que, en contacto con la cerámica, disuelve los componentes orgánicos y, arrastrándolos con ellos, las partículas sólidas de alúmina.

Usando acetona como disolvente, se pueden conseguir agujeros de unos 35  $\mu\text{m}$  de diámetro y canales de 100  $\mu\text{m}$ . Esta técnica resulta más versátil que, por ejemplo, el perforado, porque se pueden conseguir cavidades parciales; además, los costes del equipamiento son más bajos.<sup>92</sup>

#### 1.4.2.4 Fotolitografía

Emulando las técnicas fotolitográficas basadas en silicio, se trata de utilizar una versión de la instrumentación necesaria mucho más barata, debido a que no se requieren resoluciones tan elevadas.

Se necesitan capas de cerámica parcialmente sinterizadas sobre las cuales se deposita una película fotosensible y sobre ésta se coloca la máscara y se irradia con UV. La película se revela con carbonato de sodio.

#### 1.4.2.5 Micromecanizado CNC (*Computer Numerically Controlled*)

El micromecanizado de agujeros (o vías) es equivalente a la técnica de perforación vista anteriormente. Para la fabricación de analizadores químicos miniaturizados, sin embargo, no sólo es necesario realizar vías de conexión entre pistas conductoras sino también canales y cavidades de diferentes formas y tamaños que pueden estar interconectados entre ellos. Para ello se utilizan microfresadoras controladas por software. Esta metodología de trabajo permite la obtención de prototipos rápidamente, aunque no resulta demasiado viable para producciones en masa ya que el proceso contiene una gran componente manual que lo ralentiza.

Las características más destacables de esta técnica de trabajo se explicarán en detalle en el capítulo 3 (Metodología de fabricación) y en los Anexos A y B, ya que la mayor parte de los trabajos presentados en esta tesis se han realizado con una máquina de microfresado.

#### 1.4.3 TÉCNICAS DE SELLADO

A diferencia de los otros materiales expuestos en esta introducción (silicio, vidrio y polímeros) las cerámicas verdes sólo poseen una metodología de sellado de capas: la sinterización. Tal y como ya se ha comentado, después de aplicar la rampa de temperatura propuesta por el fabricante de la cerámica, debido a la interpenetración entre partículas de alúmina y el amalgamamiento mediante el vidrio de diferentes capas, resulta imposible distinguir las capas que inicialmente formaban parte del dispositivo, obteniéndose un bloque sólido y homogéneo, que incluye la estructura tridimensional previamente diseñada en su interior.

---

<sup>92</sup> de Carvalho, T.; Garcia, L.; Pereira da Silva, M.L.; Ramos, I.; Furlan, R.; Santiago-Aviles, J.J. *in: Tenth Annual International Conference on Composites Engineering (ICCE/10)*, 2003, 83.

Previo a la etapa de sinterización, es necesario llevar a cabo el proceso de laminación, de gran importancia, que también se detalla en el capítulo 3 y en el Anexo A.

#### 1.4.4 APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA LTCC

Aunque la principal aplicación de la tecnología LTCC es el campo de la microelectrónica, existen otras muy interesantes. En esta sección se describen algunas aplicaciones de las cerámicas verdes en diferentes ámbitos: sensores físicos, actuadores y otras aplicaciones de carácter no electrónico.

La tabla 1.5 muestra un resumen de algunos dispositivos electrónicos y sensores físicos realizados con esta tecnología.

TIPO DE DISPOSITIVO	APLICACIÓN	REF.
Sensor de proximidad de corriente de Eddy	Posicionamiento de objetos metálicos (detección de agujeros, remaches, tornillos). Perfilómetro de superficies metálicas para cajeros automáticos. Posicionamiento de las ruedas de los automóviles en sistemas de frenado ABS. Monitorización y diagnóstico de la vibración en motores de turbina.	93
Sensor de flujo de masa	Módulos de control de motores (ECM, <i>Engine Control Module</i> ) para el control de la inyección de combustible	94
Sensores de gases	Medidas de concentraciones de gases como: monóxido de carbono, alcohol etílico, ozono en aire o hidrógeno.	95,96
Sensor de presión	Sensor de presión a altas temperaturas en motores de turbina.	93,97
Pantallas de plasma (PDP)	Reducción de costes de fabricación de las pantallas de plasma.	98,99

<sup>93</sup> Wilde, J.; Lai, Y.Q. *Microelectron. Reliab.*, **2003**, *43*, 345.

<sup>94</sup> Schmid, U. *Sens. Actuators A-Phys*, **2002**, *97*, 253.

<sup>95</sup> Teterycz, H.; Kita, J.; Bauer, R.; Golonka, L.J.; Licznarski, B.W.; Nitsch, K.; Wisniewski, K. *Sens. Actuators B-Chem*, **1998**, *47*, 100.

<sup>96</sup> Pisarkiewicz, T.; Sutor, A.; Potempa, P.; Maziarz, W.; Thust, H.; Thelemann, T. *Thin Solid Films*, **2003**, *436*, 84.

<sup>97</sup> Fonseca, M.A.; English, J.M.; von Arx, M.; Allen, M.G. *J. Microelectromech. Syst.*, **2002**, *11*, 337.

<sup>98</sup> Park, Y.H.; Cho, C.R.; Kim, I.T.; Lee, M.W.; Hwang, K.T.; Yu, J.D.; Mun, J.D.; Kong, S.S.; Kim, B.K.; Sreeram, A.N.; Palit, K.; Liberatore, M.; Tormey, E.; Hozer, L.; Prabhu, A. *in SID (Society for Information Display)*, **2000**, 478.

<sup>99</sup> Mun, J.D.; Kim, I.T.; Cho, C.R.; Hwang, K.T.; Moon, S.J.; Boo, K.H.; Moon, G.J.; Lee, S.H.; Kwon, Y.H.; Kim, M.S.; Koo, B.J.; Han, J.K.; Kong, S.S.; Kim, J.D. *in: SID (Society for Information Display)*, **2002**, 1064.

Microondas (MW) y Radiofrecuencias (RF)	Integración de componentes pasivos en el diseño de circuitos miniaturizados para disminuir costes.	100,101 (MW) 102 (RF)
---	--	-----------------------------

**Tabla 1.5:** Aplicaciones de la tecnología LTCC: dispositivos electrónicos y sensores físicos.

Últimamente y debido a la facilidad de construcción de sistemas tridimensionales mediante el uso de cerámicas verdes, este material ha mostrado nuevas potencialidades para la construcción de actuadores. En la tabla 1.6 se dan algunos ejemplos de ellos.

TIPO DE DISPOSITIVO	APLICACIÓN	REF.
Microbomba	Propulsión de fluidos para facilitar su mezcla a través de estructuras de canales complejas.	103,104
Motor esférico	Actuadores de robótica: caderas, codos y hombros. Ruedas omni-direccionales para robots móviles. Actuadores para cámaras de visión.	105
Control de temperatura: enfriamiento activo/pasivo	Generación de un mecanismo de transporte térmico a través de un sustrato. Si este sustrato está unido a un material conductor, el calor puede repartirse a través de una gran área.	106

**Tabla 1.6:** Aplicaciones de la tecnología LTCC: actuadores.

## 1.5 Sistemas analíticos miniaturizados

En este apartado se pretende realizar una breve revisión bibliográfica de la miniaturización aplicada a sistemas analíticos y/o a algunas de las operaciones unitarias en ellos contenidas (microcanales, etapas de pretratamiento, sistemas de bombeo, sistemas de detección, etc.). Finalmente, nos centraremos en las aplicaciones actuales de las cerámicas verdes, no sólo en el campo de la microelectrónica, sino en el de los sensores físicos, químicos y analizadores químicos.

<sup>100</sup> Demovsek, O.; Naeini, A.; Preu, G.; Wersing, W.; Eberstein, M.; Schiller, W.A. *J. European Ceram. Soc.*, **2001**, *21*, 1693.

<sup>101</sup> Jantunen, H.; Kangasvieri, T.; Vahakangas, J.; Leppavuori, S. *J. European Ceram. Soc.*, **2003**, *23*, 2541.

<sup>102</sup> Sim, S.H.; Kang, C.Y.; Choi, J.W.; Choi, H.W.W.; Yoon, Y.J.; Yoon, S.Y.; Kim, H.J. *J. European Ceram. Soc.*, **2003**, *23*, 2717.

<sup>103</sup> Bau, H.H.; Zhu, J.; Qian, S.; Xiang, Y. *Sens. Actuators B-Chem*, **2003**, *88*, 205.

<sup>104</sup> Zhong, J.; Yi, M.; Bau, H.H. *Sens. Actuators A-Phys*, **2002**, *96*, 59.

<sup>105</sup> Li, J.; Ananthasuresh, G.K. *J. Micromech. Microeng.*, **2002**, *12*, 198.

<sup>106</sup> Bischoff, G.; Thust, H.; Thelemann, T.; Kirchner, T. *in: International Symposium on Microelectronics*, **1999**, 636.



### 1.5.1 PLATAFORMAS MICROFLUÍDICAS

Las plataformas microfluídicas han sido, de entre todos los componentes necesarios para fabricar sistemas de análisis miniaturizados, los que más atención han centrado y por tanto, aquellos que más desarrollo han experimentado. Su evolución ha transcurrido en paralelo a las diferentes técnicas y materiales utilizados. La microfluídica no sólo es importante para dar soporte a etapas de pretratamiento de muestra y a procesos de mezcla/reacción, sino también para dotar de conectividad a las diferentes operaciones unitarias de un proceso analítico.

Cuando el tamaño de un dispositivo o sistema adquiere dimensiones del orden de la micra, las partículas de fluido, o las partículas suspendidas en él, resultan comparables a las dimensiones del aparato en sí. Las fuerzas capilares, la transferencia de calor y/o masa toman una relevancia vital en la comprensión del comportamiento de los líquidos en este entorno.

Una mezcla rápida y efectiva resulta ser un paso clave en la mayoría de sistemas (bio)químicos. Sin embargo, en sistemas a microescala, donde las estructuras son del orden de centenares de micras, resulta muy difícil conseguir un flujo turbulento que ayude a incrementar el grado de mezcla entre reactivos. En este caso, el flujo es estrictamente laminar y la mezcla se da gracias a la difusión molecular entre capas de diferente concentración.<sup>107</sup> Con la finalidad de aumentar el grado de mezcla en este tipo de sistemas se han propuesto diferentes mezcladores que podríamos agrupar en dos grandes grupos:

a) **Mezcladores activos:** son los que mejor grado de mezcla proporcionan.<sup>108,134</sup> Se sirven del uso de partes móviles o de algún tipo de energía, como los ultrasonidos,<sup>109</sup> para imponer una perturbación en el sistema.<sup>110</sup>

b) **Mezcladores pasivos:** No utilizan ningún tipo de energía, tan sólo el mecanismo utilizado para impulsar los fluidos a través de los canales (bombas, caídas de presión,<sup>111</sup> etc.) y la ayuda de canales de geometrías complejas. En este caso, se trata de incrementar el área de la interfase en la que tiene lugar la difusión, lo que se conoce como turbulencia caótica (*chaotic advection*).<sup>112,113</sup>

---

<sup>107</sup> Mengeaud, V.; Jossierand, J.; Girault, H.H. *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 4279.

<sup>108</sup> Yang, Z.; Matsumoto, S.; Goto, H.; Matsumoto, M.; Maeda, R. *Sens. Actuators A-Phys*, **2001**, *93*, 266.

<sup>109</sup> Petersson, F.; Nilsson, A.; Jonsson, H.; Laurell, T. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 1216.

<sup>110</sup> Nguyen, N.T.; Wu, Z. *J. Micromech. Microeng.*, **2005**, *15*, R1.

<sup>111</sup> Dertinger, S.K.W.; Chiu, D.T.; Jeon, N.L.; Whitesides, G.M. *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 1240.

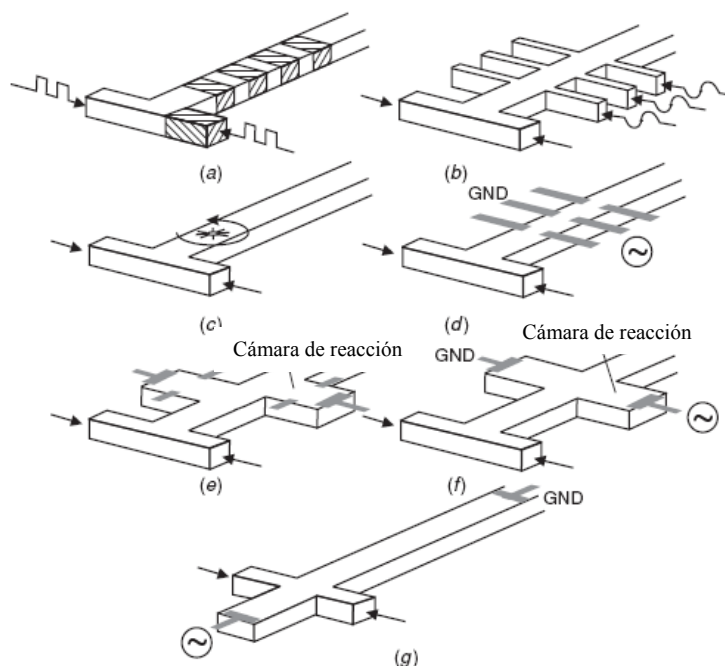
<sup>112</sup> Liu, R.H.; Stremmer, M.A.; Sharp, K.V.; Olsen, M.G.; Santiago, J.G.; Adrian, R.J., Aref, H.; Beebe, D.J. *J. Microelectromech. Syst.*, **2000**, *9*, 190.

<sup>113</sup> Aref, H. *Phys. Fluids*, **2002**, *14*, 1315.

**Figura 1.10:**

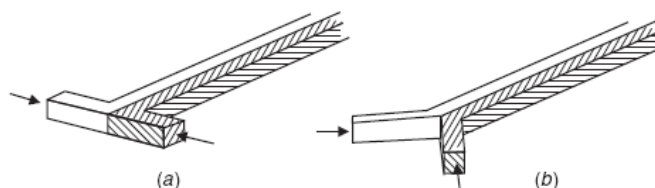
Micromezcladores activos:

(a) segmentación en serie, (b) turbulencia por presión a lo largo del canal de mezcla, (c) microagitador integrado en el canal de mezcla, (d) turbulencia electrohidrodinámica, (e) turbulencia dielectroforética, (f) turbulencia electrocinética en la cámara de reacción, (g) turbulencia electrocinética en el canal de mezcla.<sup>110</sup>

**Figura 1.11:**

Micromezcladores pasivos básicos:

(a) en forma de T, (b) en forma de Y.<sup>111</sup>



Como primera aproximación al diseño de mezcladores, y con la finalidad de optimizar el trabajo y los costes, existe la posibilidad de simular mediante software el grado de mezcla conseguido con diferentes configuraciones antes de proceder a su fabricación.<sup>107,114,115-118</sup>

En la tabla 1.7 se dan algunos ejemplos de mezcladores pasivos, ya que son estos los que evaluaremos a lo largo de la presente tesis. Asimismo se detallan el material y técnica con los que fueron construidos.

<sup>114</sup> Bertsch, A.; Heimgartner, S.; Cousseau, P.; Renaud, P. *Lab Chip*, **2001**, *1*, 56.

<sup>115</sup> Ehrfeld, W.; Golbig, K.; Hessel, V.; Lowe, H.; Richter, T. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1999**, *38*, 1075.

<sup>116</sup> Hinsmann, P.; Frank, J.; Svasek, P.; Harasek, M.; Lendl, B. *Lab Chip*, **2001**, *1*, 16.

<sup>117</sup> Engler, M.; Kockmann, N.; Kiefer, T.; Woias, P. *Chem. Eng. J.*, **2004**, *101*, 315.

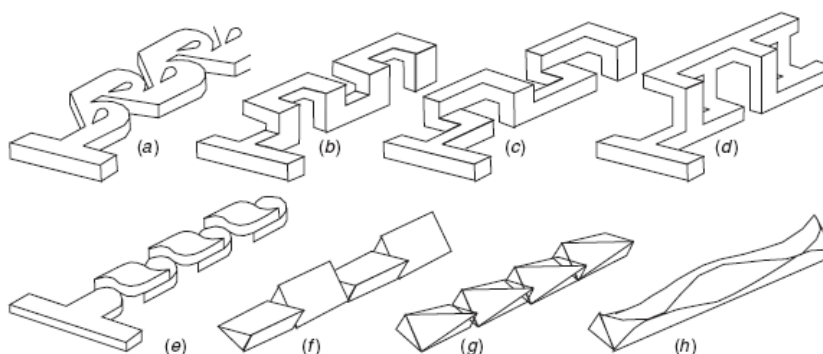
<sup>118</sup> Wong, S.H.; Ward, M.C.L.; Wharton, C.W. *Sens. Actuators B-Chem*, **2004**, *100*, 359.

MEZCLADOR PASIVO	MATERIAL	TÉCNICA DE FABRICACIÓN	REF.
Serpentín tridimensional	Silicio	Grabado anisotrópico con KOH	112
Nudos tridimensionales	PDMS	Fotolitografía sobre obleas de silicio. Moldeado del PDMS sobre ellas. Apilamiento de capas con diferentes motivos.	54,119, 120,53
Estructuras tridimensionales variadas	PDMS	Superposición de capas de PDMS con diseños bidimensionales fabricadas mediante moldeado de PDMS sobre obleas de silicio.	55
Alternancia de flujos laminares	Vidrio/silicio	Grabado por ambos lados del silicio.	121
Creación de gradientes de flujo laminar	PDMS	Fotolitografía sobre obleas de silicio. Moldeado del PDMS sobre ellas. Apilamiento de capas con diferentes motivos.	111
Creación de vórtex en uniones tipo T	Silicio	Canales contruidos mediante RIE y cubiertos de vidrio.	117,118

**Tabla 1.7:** Mezcladores pasivos. Materiales y técnicas utilizadas en su fabricación.

**Figura 1.12:**

Diseños de micromezcladores con turbulencia caótica para valores medios de Reynolds: **(a)** estructura Tesla modificada, **(b)** en forma de C, **(c)** en forma de L, **(d)** formas L conectadas fuera del plano, **(e)** microcanal retorcido, **(f), (g), (h)** otros diseños de canal retorcido.<sup>111</sup>



De entre la gran variedad de mezcladores pasivos existentes, se ha demostrado teórica y experimentalmente que los de configuración en serpentín son los que inducen mejor mezcla entre reactivos.<sup>54,55,112,119,120</sup> Sin embargo, resultan difíciles de construir mediante el uso de técnicas y materiales de fabricación convencionales.

<sup>119</sup> Wu, H.; Odom, T.W.; Chiu, D.T.; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 554.

<sup>120</sup> McDonald, J.C.; Whitesides, G.M. *Accounts Chem. Res.*, **2002**, *35*, 491.

<sup>121</sup> Bessoth, F.G.; deMello, A.J.; Manz, A. *Anal. Commun.*, **1999**, *36*, 213.

En la figura 1.12 se muestran algunos ejemplos de diseños de micromezcladores con turbulencia caótica:<sup>110</sup>

### 1.5.2 ETAPAS DE PRETRATAMIENTO

En muchas ocasiones, los detectores habitualmente utilizados tanto en sistemas micro como macro no son todo lo selectivos o sensibles que desearíamos para poder obtener límites de detección adecuados para la determinación de algunos analitos. Por este motivo, habitualmente, es necesario integrar etapas de pretratamiento de la muestra que ayuden a eliminar interferencias de matriz y/o mejoren el límite de detección de la técnica de medida utilizada.

Existe una gran variedad de etapas de pretratamiento que podríamos clasificar en cuatro grandes grupos: derivatización (marcaje, complejación), pretratamiento bioquímico (amplificación, digestión enzimática), separación del analito de la matriz (diálisis, filtración, purificación) y preconcentración de la muestra (extracción en fase sólida, isotacoforesis).<sup>14,122</sup> La integración de cada una de estas etapas en un sistema de análisis miniaturizado ha de cumplir algunos requisitos básicos como son el uso de volúmenes de reactivos, tiempos de análisis y consumos energéticos compatibles con los de los sistemas de los cuales van a formar parte. La principal dificultad para implementar alguna de estas etapas en un sistema miniaturizado, sin embargo, no son las limitaciones anteriores, sino el proceso de fabricación. En general, las técnicas y materiales empleados en la construcción de estos dispositivos suelen presentar una baja versatilidad estructural, lo que dificulta muchas veces la integración de determinadas operaciones unitarias del proceso analítico.

En la tabla 1.8 aparecen algunos ejemplos de etapas de pretratamiento integradas en sistemas analíticos miniaturizados. Se trata sólo de una representación de la multitud de artículos presentados al respecto.

TIPO DE ETAPA	MATERIAL	CARACTERÍSTICA	REF.
Separación de partículas	Silicio	Uso de fuerzas acústicas para la separación de partículas de 5 µm suspendidas en flujo laminar.	109
Separación de partículas	Silicio	Separación de esferas de 5.5 µm de diámetro mediante la fabricación de cavidades rodeadas por microcolumnas. No se aplica ninguna fuerza externa, sólo el propio flujo.	123

<sup>122</sup> Lichtenberg, J.; de Rooij, N.F.; Verpoorte, E. *Talanta*, **2002**, *56*, 233.

<sup>123</sup> Andersson, H.; van der Wijngaart, W.; Enoksson, P.; Stemme, G., *Sens. Actuators B-Chem*, **2000**, *67*, 203.

Intercambio iónico	Vidrio	Fabricación de una cavidad en silicio en la que se colocan esferas de 1.5-4 $\mu\text{m}$ que actúan como intercambiador iónico. Las paredes de esta cavidad no llegan al vidrio, dejando así un canal para la entrada y salida de líquidos, que se controlan mediante EOF.	124
Separación de ADN	PDMS	Separaciones de material genético previamente hibridizado sobre la superficie de partículas magnéticas (4.5 $\mu\text{m}$ de diámetro). El filtro para retenerlas son unos pilares de 10 $\mu\text{m}$ de grosor.	125
Extracción líquido-líquido	Varios	Diversas configuraciones de sistemas de microextracción.	126
Diálisis	PVC	Uso de una membrana de separación, a ambos lados de la cual se sitúan electrodos potenciométricos tubulares para la detección diferencial de cloruro.	127

**Tabla 1.8:** Etapas de pretratamiento. Material utilizado y características más relevantes.

### 1.5.3 GESTIÓN DE FLUIDOS: MICROBOMBAS Y MICROVÁLVULAS

Respecto a los sistemas miniaturizados de análisis, bombas y válvulas siguen siendo todavía el mayor de los retos a conseguir. No sólo resulta complicado llevar a cabo la miniaturización de estos elementos, sino que su integración real y compacta en un sistema de análisis miniaturizado presenta una enorme dificultad.

Las microbombas se pueden clasificar en función de diferentes parámetros, uno de ellos es la presencia o no de un actuador que ejerza sobre la bomba la energía necesaria para hacerla funcionar. Luque de Castro realizó una interesante revisión bibliográfica sobre dispositivos propulsores en microsistemas.<sup>128</sup>

En general podríamos agrupar las microbombas en dos grandes grupos:<sup>10</sup>

**a) Pasivas:** Trabajan sin actuador, obtienen la energía a través de una diferencia de presión a través de válvulas.

**b) Activas:** Contienen un actuador externo o interno.

<sup>124</sup> Oleschuk, R.D.; Shultz-Lockyear, L.L.; Ning, Y.; Harrison, D.J. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 585.

<sup>125</sup> Deng, T.; Prentiss, M.; Whitesides, G.M. *Appl. Phys. Lett.*, **2001**, *80*, 461.

<sup>126</sup> Psillakis, E.; Kalogerakis, N. *Trends Anal. Chem.*, **2002**, *21*, 53.

<sup>127</sup> Miró, M.; Frenzel, W. *Analyst*, **2003**, *128*, 1291.

<sup>128</sup> Prado-Rosales, R.C.; Luque-García, J.L.; Luque de Castro, M.D. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *461*, 169.

En función de cuál sea y cómo se aplique la energía mediante el actuador, existen también subclasificaciones de bombas.

De la misma manera, se pueden clasificar las válvulas en función de si requieren o no de actuador y, para el primer grupo, en función del tipo de actuador. Así encontramos válvulas neumáticas, termoneumáticas, termomecánicas, piezoeléctricas, electrostáticas, electromagnéticas, electroquímicas o de fuerzas capilares. D. J. Laser y J. G. Santiago efectuaron una amplia revisión bibliográfica sobre microbombas.<sup>129</sup>

TIPO DE BOMBA	MATERIAL	¿ACTUADOR?	REF.
Bidireccional peristáltica	Silicio/vidrio	Sí: piezoeléctrico	130
De membrana	PDMS	Sí: imán.	131
Electroquímica	Vidrio, poliimida y PDMS	Sí: reacción electroquímica que controla la formación de H <sub>2</sub>	132
Electroquímica	Silicio y poliimida	Sí: reacción electroquímica que genera o consume gas.	133
Peristáltica	PCB	Sí: piezoeléctrico	134
Oscilatoria	PMMA y silicona	Sí: ferrofluidos	135
Con válvula de diafragma	PDMS	No: uso de presión (aunque éste era generado por una válvula externa electromecánica)	136
Con válvula de tapa	PDMS	No: uso de presión (aunque éste era generado por una válvula externa electromecánica)	136
On-off	PDMS y silicona	Sí: variación de presión <sup>a</sup>	137
Magnetohidrodinámica	LTCC	Sí: uso de electrodos y diferencias de potencial	138

<sup>a</sup> Al contrario que la referencia nº136, este artículo considera que la aplicación de presión es en sí un actuador y, por lo tanto, la válvula/bomba resultante es activa.

**Tabla 1.9:** Bombas pasivas y activas. Material utilizado y principio de funcionamiento.

<sup>129</sup> Laser, D.J.; Santiago, J.G. *J. Micromech. Microeng.*, **2004**, *14*, R35.

<sup>130</sup> Husband, B.; Bu, M.; Apostolopoulos, V.; Melvin, T.; Evans, A.G.R. *Microelectron. Eng.*, **2004**, *73-74*, 858.

<sup>131</sup> Khoo, M.; Liu, C. *Sens. Actuators A-Phys*, **2001**, *89*, 259.

<sup>132</sup> Suzuki, H.; Yoneyama, R. *Sens. Actuators B-Chem*, **2003**, *96*, 38.

<sup>133</sup> Neagu, C.R.; Gardeniers, J.G.E.; Elwenspoek, M.; Kelly, J.J. *Electrochim. Acta*, **1997**, *42*, 3367.

<sup>134</sup> Nguyen, N.T.; Huang, X. *Sens. Actuators A-Phys*, **2001**, *88*, 104.

<sup>135</sup> Yamahata, C.; Chastellain, M.; Parashar, V.K.; Petri, A.; Hofmann, H.; Gijs, M.A.M. *J. Microelectromech. Syst.*, **2005**, *14*, 96.

<sup>136</sup> Jeon, N.L.; Chiu, D.T.; Wargo, C.J.; Wu, H.; Choi, I.S.; Anderson, J.R.; Whitesides, G.M. *Biomed. Microdevices*, **2002**, *4*, 117.

<sup>137</sup> Unger, M.A.; Chou, H.P.; Thorsen, T.; Scherer, A.; Quake, S.R. *Science*, **2000**, *288*, 113.

<sup>138</sup> Zhong, J.; Yi, Mingqiang, Bau, H.H. *Sens. Actuators A-Phys*, **2002**, *96*, 59.

Muchas de las bombas descritas en la tabla 1.9, requieren del uso de válvulas para poder funcionar. En el artículo de K. W. Oh y C. H. Ahn aparecen descritas y clasificadas decenas de microválvulas.<sup>139</sup> Algunas de ellas se muestran en la tabla 1.10:

TIPO DE VÁLVULA	MATERIAL	¿ACTUADOR?	REF.
De 3 vías	Silicio y siliconas	Sí: neumático	140
Diafragma	PDMS	No: uso de presión	136
Tapa	PDMS	No: uso de presión	136
Electroquímica	Vidrio, poliimida y PDMS	Sí: reacción electroquímica que controla la formación de H <sub>2</sub>	132
On-off	PDMS y silicona	Sí: variación de presión	137

**Tabla 1.10:** Válvulas pasivas y activas. Material utilizado y principio de funcionamiento.

De nuevo en esta clasificación observamos como la presión es considerada por algunos autores como actuador y por otros no.

A pesar de que se ha realizado un enorme esfuerzo para obtener este tipo de dispositivos, no existen ejemplos de sistemas de análisis químicos que incorporen bombas y/o válvulas y que éstas gestionen de manera totalmente autónoma el flujo a través de los canales.

En general se han utilizado sistemas híbridos (micro/macro) que tienden a complicar el montaje experimental.

#### 1.5.4 MICROACTUADORES

Aunque no suele ser requisito de la mayoría de sistemas de análisis miniaturizados, la consecución de, por ejemplo, un buen control de la temperatura es fundamental en algunos de ellos. Es el caso, por ejemplo, de los dispositivos PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizados para llevar a cabo la amplificación exponencial de secuencias de ADN, donde normalmente se requiere del control de temperaturas en dos o tres zonas con una precisión de  $\pm 1^\circ\text{C}$  como mínimo.<sup>141-144</sup> La velocidad de muchas reacciones enzimáticas también se ve favorecida cuando la temperatura es de  $37^\circ\text{C}$ , condiciones muy cercanas a aquellas encontradas en mamíferos. Sin embargo, temperaturas superiores a  $45^\circ\text{C}$

<sup>139</sup> Oh, K.W.; Ahn, C.H. *J. Micromech. Microeng.*, **2006**, *16*, R13.

<sup>140</sup> Ohori, T.; Shoji, S.; Miura, K.; Yotsumoto, A. *Sens. Actuators A-Phys*, **1998**, *64*, 57.

<sup>141</sup> Wittwer, C.T.; Garling, D.J. *BioTechniques*, **1991**, *10*, 76.

<sup>142</sup> Wittwer, C.T.; Fillmore, C.; Garling, D.J. *Anal. Biochem.*, **1990**, *186*, 328.

<sup>143</sup> Chiou, J.; Matsudaira, P.; Sonin, A.; Ehrlich, D. *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 2018.

<sup>144</sup> Northrup, M.A. in *Proc. 8th Int. Conf. Solid State Sensors Actuators (Transducers '95)*, **1995**, .764.

50°C pueden desnaturalizar la proteína, inhibiendo sus propiedades catalíticas, de ahí la necesidad de un control preciso.<sup>145</sup>

Existen diversos mecanismos de calentamiento y enfriamiento que incluyen ciclos de aire,<sup>141,142</sup> dispositivos externos Peltier,<sup>146,147</sup> o calentadores integrados mediante técnicas serigráficas.<sup>144</sup> En ocasiones, la muestra ha de ser transportada a través de diferentes zonas de temperatura,<sup>143,148,149</sup> lo que requiere de la integración de calentadores adicionales, así como de una configuración de canales mucho más compleja. Éste es el caso de los dispositivos que realizan PCR.

Respecto a los sensores que han sido utilizados para el control de la temperatura, se pueden encontrar ejemplos de termopares situados directamente en la muestra o incluso termistores integrados en el mismo elemento calentador externo.<sup>143,144,146</sup> Tanto en el caso de los calentadores como en el de los sensores, su integración monolítica es un objetivo clave para la consecución de un microsistema analítico real. Sin embargo, las tecnologías convencionales empleadas para la fabricación de las plataformas fluídicas no siempre facilitan la integración de estos elementos, ni tampoco de la electrónica asociada para llevar a cabo su control. Es por ello que, normalmente, se sitúan de manera externa respecto al dispositivo donde tiene lugar la reacción, obteniendo, una vez más, sistemas híbridos.

### 1.5.5 SISTEMAS DE DETECCIÓN

A lo largo de esta tesis se ha trabajado con diferentes tipos de sistemas de detección: electroquímicos (potenciometría, amperometría) y ópticos (absorbancia, quimioluminiscencia). A pesar de la gran selectividad de los métodos ópticos, la miniaturización de sistemas que integran este tipo de detección presenta como inconvenientes: la disminución del camino óptico (y, en consecuencia, la sensibilidad del método) o el efecto negativo de la turbidez de la muestra en la medida. El uso de técnicas electroquímicas en sistemas de análisis miniaturizado representa una alternativa a los métodos ópticos, hecho que se refleja en el gran número de publicaciones que existen al respecto.

Con la finalidad de contextualizar el trabajo realizado, en el siguiente apartado se realizará una breve revisión bibliográfica de lo que, hasta el momento y de forma general, se ha descrito sobre la miniaturización e integración de dichos tipos de detectores en microsistemas de análisis.

---

<sup>145</sup> Palmer, T.; *Understanding Enzymes* (2da ed.), Ellis Horwood Publishers, John Wiley & Sons, Inglaterra, **1985**.

<sup>146</sup> Wilding, P.; Shoffner, A.; Cheng, J.; Hvichia, G.; Kricka, J. *Clinical Chem.*, **1995**, *41*, 1367.

<sup>147</sup> Woolley, A.T.; Hadley, D.; Landre, P.; de Mello, A.J.; Mathies, R.A.; Northrup, M.A. *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 4081.

<sup>148</sup> Kopp, M.U.; de Mello, A.J.; Manz, A. *Science*, **1998**, *280*, 1046.

<sup>149</sup> Nakano, H.; Matsuda, K.; Yonda, M.; Nagamune, T.; Endo, I.; Yamane, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1994**, *58*, 349.



### 1.5.5.1 Técnicas electroquímicas

Las técnicas potenciométricas permiten extraer información cualitativa y cuantitativa sobre la composición de una solución, aprovechando el establecimiento de una diferencia de potencial entre un electrodo indicador y uno de referencia. La medida de esta diferencia de potencial, bajo condiciones de corriente prácticamente nula, es la esencia de la potenciometría, convirtiéndose en un método electroanalítico muy útil y simple.

Los electrodos indicadores más utilizados son los electrodos selectivos a iones (ESIs). En ellos, la membrana es la responsable tanto del reconocimiento selectivo como de la transducción del potencial de membrana generado en una señal del dominio eléctrico.

Un ESI convencional se puede describir como una semicelda electroquímica, constituida por una membrana encargada del reconocimiento, una solución electrolítica interna y un electrodo de referencia interno. Mediante un electrodo de referencia externo sumergido en la misma solución, la fuerza electromotriz de la celda medida ( $fem$ ) permite seguir el cambio del potencial de la membrana en función de la actividad del analito en la solución. La información obtenida se relaciona con la concentración/actividad del analito mediante la ley de Nernst, que de forma general se puede describir como:

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln a_i$$

Donde  $E^0$  es el potencial estándar del electrodo,  $R$  la constante de gases (8.314 J/K·mol),  $T$  es la temperatura absoluta,  $F$  la constante de Faraday (96487 C/mol) y  $z_i$  la carga del ión. En el caso de utilizar un electrodo selectivo de portador móvil, el ionóforo selectivo del analito se encuentra disuelto en un disolvente mediador en la membrana. Este disolvente, a parte de plastificar la matriz polimérica, influye en numerosos parámetros que caracterizan la respuesta del electrodo.<sup>150</sup>

El uso de PVC como matriz polimérica de soporte de la membrana representó un gran avance en términos de mejora de las características operacionales de los dispositivos, al dotar de estabilidad a la membrana, evitando problemas como la exudación de sus componentes. Para incrementar la robustez de los electrodos se sustituyó la solución de referencia interna por un soporte conductor sólido. Esto permitió desarrollar electrodos indicadores con nuevos tipos de configuraciones. No obstante, la deposición de la membrana sobre un soporte conductor sólido provoca incertidumbre sobre el potencial de referencia interna, que no queda claramente definido desde un punto de vista teórico. Aparentemente, dicho potencial depende de la presencia de oxígeno y fluctuaciones de éste en la muestra provocan derivas de potencial.

<sup>150</sup> Prantis, D.M.; Telting, D.; Meyerhoff, M.E. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1992**, *23*, 163.

Dado que la difusión del oxígeno a través de la membrana es lenta, este problema no es grave pero exige una recalibración periódica del sistema de medida.

A pesar de este inconveniente, esta configuración dota de una enorme versatilidad al proceso de construcción. Esto ha facilitado su integración en sistemas de flujo continuo<sup>151</sup> y el desarrollo de dispositivos miniaturizados. En este sentido, existen varios trabajos que describen intentos de integración de este tipo de detectores en sistemas microfluídicos contruidos con diferentes materiales, como el PDMS o silicio.<sup>80,152,153</sup>

En sistemas con detección potenciométrica, sin embargo, no sólo es necesario llevar a cabo la integración y miniaturización de los electrodos selectivos a iones, sino también la del electrodo de referencia. Esto dificulta la consecución del sistema de análisis total. Algunos autores han presentado diferentes estrategias para realizar la miniaturización del electrodo de referencia. La mayoría de ellas se basan en el uso de electrodos Ag/AgCl.<sup>154</sup> Sin embargo, el principal problema detectado es la dificultad de aislar la disolución de muestra de la disolución de referencia sin que ésta resulte alterada o contaminada. Para evitar este inconveniente, se han propuesto diferentes soluciones. Algunas consisten en la integración de un puente salino que conecte eléctricamente ambas semiceldas. Otros autores han utilizado fibra de vidrio a modo de diafragma, para conectar la solución de referencia interna con la muestra.<sup>155</sup> Otros autores han hecho uso de polímeros hidrofílicos (geles acrílicos, por ejemplo) que contienen una solución electrolítica, sustituta del puente salino.<sup>156-159</sup> Estos últimos electrodos han demostrado funcionar bien durante cortos periodos de tiempo por lo que se han utilizado en sensores de un solo uso. En nuestro grupo de investigación, sin embargo, hemos descartado esta opción para la integración del electrodo de referencia en sistemas miniaturizados por ser tecnológicamente complicada. Como alternativa, y utilizando un esquema ya propuesto en sistemas de flujo continuo convencional, el electrodo de referencia (Ag/AgCl) se ha integrado en sistemas microfluídicos situándolo en un canal auxiliar conectado al principal más allá de la posición del electrodo indicador.<sup>160</sup>

---

<sup>151</sup> Alegret, S.; Alonso, J.; Bartrolí, J.; Lima, J.L.F.C.; Machado, A.A.S.C.; Paulis, J.M. *Anal. Lett.*, **1985**, *18*, 2291.

<sup>152</sup> Wang, J. *Trends Anal. Chem.*, **2002**, *21*, 226.

<sup>153</sup> Tantra, R.; Manz, A. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 2875.

<sup>154</sup> Cranny, A.W.J.; Atkinson, J.K. *Meas. Sci. Technol.*, **1998**, *9*, 1557.

<sup>155</sup> Mroz, A.; Borchardt, M.; Diekmann, C.; Cammann, K.; Knoll, M.; Dumschat, C. *Analyst*, **1998**, *123*, 1373.

<sup>156</sup> Ciobanu, M.; Wilburn, J.; Lowy, D.A. *Electroanalysis*, **2004**, *16*, 1351.

<sup>157</sup> Huang, I.Y.; Huan, R.S.; Lo, L.H. *Sens. Actuators B-Chem.*, **2003**, *94*, 53.

<sup>158</sup> Ciobanu, M.; Wilburn, J.P.; Buss, N.I.; Ditavong, P.; Lowy, D.A. *Electroanalysis*, **2002**, *14*, 989.

<sup>159</sup> Yalcinkaya, F.; Powner, E.T. *Med. Eng. Phys.*, **1997**, *19*, 299.

<sup>160</sup> Ibañez-García, N.; Mercader, M.B.; da Rocha, Z.M.; Seabra, C.A.; Gongora-Rubio, M.R.; Chamarro, J.A., *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 2985.

De este modo se evita la contaminación de la muestra por la disolución de referencia y viceversa. A esta configuración se la denomina unión líquida de difusión libre.<sup>161</sup>

La técnica electroquímica que más aceptación ha tenido como sistema de detección integrado en analizadores miniaturizados es la amperometría. Esto se ha debido, en parte, a la facilidad de escalado, la alta sensibilidad proporcionada, bajo coste, bajo consumo energético, etc.<sup>80,152</sup>

Los sensores amperométricos se basan en la medida de la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva sobre la superficie del electrodo, como resultado de la aplicación de un potencial constante. La adecuada elección de este potencial aporta cierta selectividad electroquímica, ya que sólo permite la oxidación/reducción de las especies químicas que reaccionen a un potencial inferior al aplicado.

La intensidad de corriente es proporcional a la velocidad de reacción electroquímica descrita por la ley de Faraday. Esta velocidad de reacción depende de varios factores: la velocidad de transferencia de los electrones desde la superficie del electrodo a las especies electroquímicas (y viceversa); las características y área del propio electrodo; el transporte de masa de analito hacia la superficie del electrodo (que a su vez depende de la concentración de analito en el seno de la solución), así como de las condiciones de migración y convección. Si la migración se reduce mediante la presencia de un electrolito inerte y la convección se mantiene constante con una agitación controlada, se crea una zona cercana al electrodo, denominada capa de difusión. En esta capa el transporte de materia se debe exclusivamente a la difusión y la intensidad de corriente cumple la expresión:

$$I = \frac{nFAD_A C_A}{\delta} = K C_A$$

donde  $n$  es el número de electrones que participan en el proceso redox,  $A$  es el área del electrodo de trabajo,  $F$  es la constante de Faraday,  $D_A$  es el coeficiente de difusión de las especies electroactivas,  $C_A$  es la concentración de analito en la muestra y  $\delta$  es el grosor de la capa de difusión.

Generalmente, las medidas de la señal amperométrica se realizan con tres electrodos: el de trabajo (sobre el cual se produce la reacción electroquímica indicadora), el auxiliar (que actúa como contraelectrodo y cierra el circuito) y el de referencia que, conectado a un potenciostato, mantiene y asegura que el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo sea el deseado y constante.

---

<sup>161</sup> Dohner, R.E.; Wegmann, D.; Morf, W.E.; Simon, W. *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2585.

Existen diferentes configuraciones de sistemas de detección amperométricos en relación a su conformación y posición respecto a los microcanales. En la mayoría de los casos, especialmente cuando se trata de dispositivos basados en separaciones electroforéticas, el sensor se coloca fuera del canal de separación para aislarlo así de los altos potenciales aplicados. Estas configuraciones incluyen las modalidades *flow-by* (la superficie de los electrodos se sitúa paralela al flujo; típico de electrodos serigrafiados, por ejemplo),<sup>162,163</sup> *flow-onto* (con la superficie del electrodo normal a la dirección del flujo y dentro del canal),<sup>164,165</sup> o *flow-through* (el detector situado también en posición normal al flujo pero a la salida de éste).<sup>166</sup> Son particularmente interesantes los detectores de configuración *flow-by* puesto que, si la tecnología lo permite, se pueden crear mediante técnicas de serigrafía e introducirlos directamente en los microcanales. Wang escribió una interesante revisión bibliográfica sobre los avances realizados en el área de miniaturización de sistemas de detección electroquímicos que puede ayudar a obtener una visión mucho más amplia sobre el *state-of-the-art* de la materia.<sup>16</sup>

Respecto al uso de electrodos fabricados serigráficamente sobre sustrato cerámico existen ciertos inconvenientes tecnológicos que ha sido necesario tener en cuenta. Durante el proceso de sinterización, la volatilización de los componentes orgánicos produce gases que pueden generar poros tanto en los electrodos internos como en el sustrato. Esto que puede provocar deformaciones en la interfase metal-cerámica.<sup>167</sup>

Además, el uso de metales como la plata o el cobre en pistas internas, implica otros problemas como la oxidación del metal, difusión y migración durante la sinterización, microrupturas en la interfase, segregación entre el sustrato y el electrodo debido a la expansión térmica, etc.<sup>168,169</sup>

Estos inconvenientes, de tipo estructural, se pueden solucionar empleando materiales (cerámicas y pastas conductoras) de compatibilidad perfectamente estudiada. Adicionalmente, existen otros problemas que tienen que ver con el uso que se les da a las pistas serigrafiadas.

<sup>162</sup> Woolley, T.; Lao, K.; Glazer, A.N.; Mathies, R.A. *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 684.

<sup>163</sup> Martin, R.S.; Gawron, A.J.; Lunte, S.M.; Henry, C.S. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 3196.

<sup>164</sup> Wang, J.; Tian, B.; Sahlin, E. *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 873.

<sup>165</sup> Hilmi, A.; Luong, J.H.; Nguyen, A. *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 873.

<sup>166</sup> Hilmi, A.; Luong, J.H. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 4677.

<sup>167</sup> Pepin, J.G.; Borland, W.; O'Callaghan, P.; Young, R.J.S. *J. Am. Ceram. Soc.*, **1989**, *72*, 2287.

<sup>168</sup> Gasper, D.J.; Patterson, F.K.; Iorfido, B.L. **in:** *ISHM Proceedings*, **1998**, 246.

<sup>169</sup> Dixon, J.B.; Rooney, D.T.; Castello, N.T. **in:** *ISHM Proceedings*, **1976**, 267.

Así, es conocido el fenómeno de difusión de iones plata a través de la cerámica cuando se aplica un potencial elevado a la pista conductora, cosa que sucede en medidas amperométricas, o en presencia de humedad, y que deforman la superficie de la pista conductora.<sup>170-174</sup>

### 1.6.5.2 Técnicas ópticas

Además de los métodos electroquímicos también se han utilizado métodos de detección ópticos. A pesar de los problemas que plantea su escalado, su aplicación en sistemas miniaturizados se ha visto favorecida por la aparición de componentes optoelectrónicos miniaturizados como los LEDs, diodos láser, fotodiodos o fototransistores. El uso de métodos colorimétricos en equipos portátiles que consumen volúmenes mínimos de reactivo y producen volúmenes muy pequeños de residuo, resultan muy atractivos ante la demanda actual de sistemas automáticos de control para aplicaciones diversas. Estos métodos, aunque tienen pocas interferencias y son aplicables a una multitud de analitos, presentan como mayor problema que la magnitud de la señal se ve influenciada negativamente por el proceso de escalado. La ley de Beer-Lambert, que describe la respuesta en este tipo de sistemas, predice una reducción de la señal proporcional a la reducción del camino óptico:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot L$$

donde  $A$  es la absorbancia,  $\varepsilon$  es el coeficiente de absorptividad molar de la especie a determinar ( $\text{l/mol}\cdot\text{cm}$ ),  $C$  es la concentración del analito ( $\text{mol/l}$ ) y  $L$  es el camino óptico ( $\text{cm}$ ).

En las medidas de absorbancia en sistemas miniaturizados las ventanas de detección tiene un camino óptico del orden de  $100\text{-}500\ \mu\text{m}$ , mientras que en sistemas macro, lo son de unas  $10.000\ \mu\text{m}$ .<sup>175</sup> Asimismo, estas técnicas de detección se ven afectadas por la turbidez o absorción de matriz de la muestra. A pesar de estos inconvenientes, la miniaturización de la electrónica asociada es, de entre los sistemas de detección presentados, una de las más avanzadas.

---

<sup>170</sup> Haskard, M.; Pitt, K. *Thick-film technology and applications*, Electrochemical Publications LTD, Isle of Man, British Isles, **1997**.

<sup>171</sup> Coleman, M.V.; Winster, A.E. *Microelectron. J.*, **1981**, *12*, 23.

<sup>172</sup> Vianco, P.T.; Stephens, J.J.; Rejent, J.A. *IEEE Transactions on components, packaging and manufacturing technology-part A*, **1997**, *20*, 478.

<sup>173</sup> Rogren, P. *in Proc. Inter. Microelec. Symp.*, **1976**, 267.

<sup>174</sup> *Handbook of Thick Film Hybrid Microelectronics*, C. Harper (ed.), McGraw-Hill, New York, 1982, 5.

<sup>175</sup> Baeza Labat, M.M *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, **2004**.

Asimismo, para solventar el problema del camino óptico, algunos autores han propuesto soluciones como el uso de ondas de guía planas y/o fibras ópticas.<sup>176-179</sup>

Una técnica óptica cuyo uso permite simplificar la instrumentación necesaria para realizar las medidas es la quimioluminiscencia. Por un lado, la medida de emisión de radiación incrementa el rango de trabajo y mejora los límites de detección. Por otro lado, se hace innecesario el uso de fuentes de emisión. La técnica se basa en la capacidad que tienen ciertas sustancias para, en presencia de un oxidante y un catalizador, generar productos en estado excitado que, al volver al estado fundamental, emiten una radiación fluorescente. El dispositivo final miniaturizado es relativamente más sencillo ya que sólo incorpora el fotodetector y no es necesaria una fuente de radiación para excitar la emisión. Fletcher *et al.*<sup>180</sup> describen más de 230 ejemplos de especies detectables mediante reacciones quimioluminiscentes, entre las que se encuentran compuestos de interés farmacéutico, medioambiental (metales, nitritos, fosfatos, etc.), biomédico, alimenticio, etc. Zhang *et al.*<sup>181</sup> también presentan un resumen de diferentes aplicaciones y avances en el campo de la quimioluminiscencia. Estas reacciones se han aplicado en sistemas miniaturizados de análisis fabricados mediante diferentes técnicas y materiales. Nakamura *et al.*<sup>182</sup>, por ejemplo, fabricaron una celda de flujo en forma de espiral en silicio para la detección de lactato. La misma configuración de celda, pero fabricada con otros materiales, ha sido descrita por diferentes autores.<sup>183,184</sup> La configuración en espiral resulta de gran utilidad porque las reacciones quimioluminiscentes son extremadamente rápidas y por ello es conveniente situar el detector en la zona de reacción para evitar pérdidas de intensidad, cosa que estas celdas permiten. Es interesante, además, que la celda de reacción genere una mezcla eficiente y rápida para obtener la máxima intensidad.

En general, al igual que los dispositivos con detección electroquímica, se trata de montajes experimentales híbridos, es decir, sólo la parte fluidica está realmente miniaturizada. Bombas, válvulas, sistemas de detección o de adquisición de datos, suelen ser macro debido a la dificultad de su miniaturización. Es difícil encontrar ejemplos de integración y miniaturización total del sistema de análisis.<sup>132</sup>

---

<sup>176</sup> Puyol, M.; del Valle, M.; Garces, I.; Villuendas, F.; Dominguez, C.; Alonso, J. *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 5037.

<sup>177</sup> Bargiel, S.; Górecka-Drzazga, A.; Dziuban, J.A.; Prokaryn, P.; Chudy, M.; Dybko, A.; Brzozka, Z. *Sens. Actuators A-Phys*, **2004**, *115*, 245.

<sup>178</sup> Szekely, L.; Reichert, J.; Freitag, R. *Sens. Actuators A-Phys*, **2004**, *113*, 48.

<sup>179</sup> Greenway, G.M.; Haswell, S.J.; Petsul, P.H. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *387*, 1.

<sup>180</sup> Fletcher, P.; Andrew, K.N.; Calokerinos, A.C.; Forbes, S.; Worsfold, P.J. *Luminescence*, **2001**, *16*, 1.

<sup>181</sup> Zhang, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *541*, 37.

<sup>182</sup> Nakamura, H.; Murakami, Y.; Yokoyama, K.; Tamiya, E.; Karube, I.; Suda, M.; Uchiyama, S. *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 373.

<sup>183</sup> Yuan, J.; Shiller, A.M. *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 1975.

<sup>184</sup> Zhang, W.; Danielson, N.D. *Microchem. J.*, **2003**, *75*, 255.

### 1.5.6 SISTEMAS ANALÍTICOS FABRICADOS EN LTCC

La aplicación de la tecnología LTCC fuera del ámbito de la electrónica es muy limitada. Aún así, se han descrito ya un reducido número de sistemas analíticos basados en esta tecnología que muestran su viabilidad. En la Tabla 1.11 se recogen algunos ejemplos destacables:

TIPO DE DISPOSITIVO	APLICACIÓN	REF.
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Identificación de ADN, clonación genómica y diagnóstico de enfermedades.	185
Electroforesis	Técnica de separación.	186
Espectrómetro de movilidad de iones (IMS)	Detección de compuestos químicos peligrosos. Técnica rápida de detección de trazas de explosivos y drogas.	187
Sensores electroquímicos: <i>Hot-layer</i>	Investigación de coeficientes de temperatura de pares redox en estado no estacionario. Estudio de la desnaturalización de moléculas biológicas.	188
Medidores de presión de la lengua	Control del crecimiento de las mandíbulas.	189
Sensores medioambientales	Monitorización de contaminantes en ríos y aguas residuales.	190

**Tabla 1.11:** Aplicaciones de la tecnología LTCC: medicina, química, automoción, etc.

Avanzando un paso más, esta tesis pretende mostrar la enorme potencialidad de la tecnología LTCC para la fabricación de sistemas de análisis miniaturizados. Entre otras ventajas, su elección se apoya en la facilidad de construir sistemas tridimensionales mediante la metodología multicapa. Esta ventaja diferencial facilita la integración de diversas operaciones unitarias de un proceso analítico que, en ocasiones, puede implicar el uso de materiales diferentes a las propias cerámicas verdes.

La mayoría de aplicaciones que se presentan a lo largo de este trabajo no requieren de canales y estructuras a escala micrométrica, aunque es posible obtenerlas utilizando equipos de micromecanizado láser.

<sup>185</sup> Chou, C.F.; Changrani, R.; Roberts, P.; Sadler, D.; Burdon, J.; Zenhausern, F.; Lin, S.; Mulholland, A.; Swami, N.; Terbrueggen, R. *Microelectron. Eng.*, **2002**, 61-62, 921.

<sup>186</sup> Henry, C.S.; Zhong, M.; Lunte, S.M.; Kim, M.; Bau, H.; Santiago, J.J. *Anal. Commun.*, **1999**, 36, 305.

<sup>187</sup> Pfeifer, K.B.; Rumpf, A.N. *Anal. Chem.*, **2005**; 77, 5215.

<sup>188</sup> Voß, T.; Gründler, P.; Kirbs, A.; Flechsig, G.U. *Electrochem. Commun.*, **1999**, 1, 383.

<sup>189</sup> Muller, R.; Schuster, G.; Rose, A.; Hohfeld, O.; Blechschmidt-Trapp, R.; Werthschützky, R. *Biomed. Tech.*, **2003**, 48, 226.

<sup>190</sup> Blechschmidt-Trapp, R.A.; Hohfeld, O.; Muller, R.; Werthschützky, R. *Biomed. Tech.*, **2002**, 47, 43.

Tal y como se detallará en posteriores capítulos, la metodología de fabricación es sencilla, no requiriendo del uso ni de sofisticados equipos de difícil uso, ni de personal altamente cualificado. Además, dada la experiencia que se tiene acerca de la fabricación de circuitos electrónicos mediante el uso de cerámicas verdes, es posible también aprovechar este material para integrar, no sólo la fluidica y los sistemas de detección, sino además la electrónica de control y adquisición de datos.



## 2. OBJETIVOS

**E**l objetivo básico de esta tesis es la puesta en marcha de una nueva línea de investigación dirigida a la obtención de microsistemas de análisis utilizando para su fabricación la tecnología LTCC. Como aplicaciones demostradoras de su potencial, se pretende aprovechar el bagaje del grupo de Sensores y Biosensores en el desarrollo de equipos automáticos para la monitorización de parámetros medioambientales.

Así, el objetivo global de la tesis es el siguiente:

- Implantación de la tecnología LTCC y adaptación de la misma a las necesidades específicas derivadas de la fabricación de dispositivos miniaturizados de análisis.

Los objetivos parciales de este trabajo se han planteado tanto en función de los analitos de interés a determinar, como en función del nivel de desarrollo tecnológico alcanzado en cada fase del trabajo experimental. Cabe destacar que se trata de una tesis de marcado carácter multidisciplinar que requiere de la combinación de diversas áreas del conocimiento.

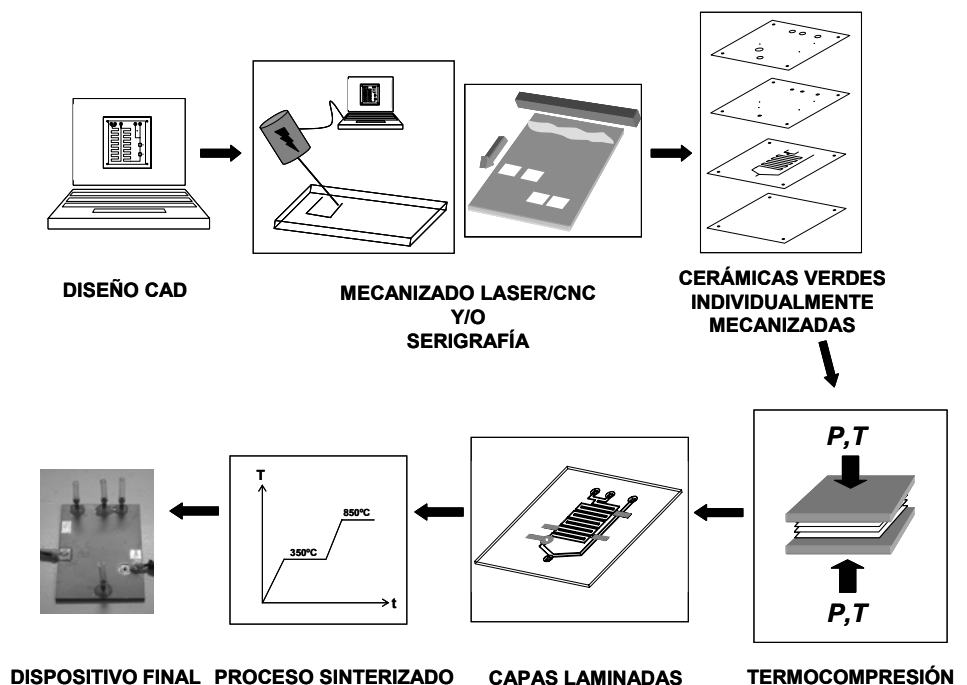
De manera simplificada, los hitos parciales propuestos han sido:

- Uso y generalización de la tecnología LTCC para la construcción rápida y versátil de plataformas fluidicas que pudieran ser aplicadas a cualquier tipo de aplicación analítica.
- Integración de los sistemas de detección más habitualmente utilizados en la determinación de parámetros de interés medioambiental: potenciométrico, amperométrico y óptico.
- Integración monolítica de elementos fluidicos y electrónicos en un mismo sustrato con el objetivo final de conseguir, mediante la tecnología LTCC, un verdadero microsistema total de análisis.

### 3. METODOLOGÍA DE FABRICACIÓN

A lo largo de esta sección experimental se describirá la metodología general de construcción de dispositivos mediante el uso de la tecnología LTCC. El procedimiento establecido es una adaptación a nuestras necesidades del protocolo general de fabricación de circuitos electrónicos mediante el uso de cerámicas verdes. Para una explicación en detalle se han incluido los Anexos A y B, en los que se puede encontrar información que en este capítulo ha sido omitida expresamente para aligerar su contenido, pero que puede ser de utilidad en caso de querer reproducir alguno de los diseños que aparecen a lo largo de este trabajo. Este capítulo se ha estructurado en apartados que coinciden con las etapas básicas del proceso de fabricación. Estas etapas, esquematizadas en la figura 3.1, son:

- Diseño del dispositivo mediante un programa CAD (*Computer Assisted Design*).
- Mecanizado de las capas constituyentes del dispositivo.
- Serigrafiado de pistas conductoras.
- Integración de diferentes componentes en las cerámicas.
- Laminación de las capas.
- Sinterización.



**Figura 3.1:** Esquema general del proceso de fabricación de un dispositivo mediante la tecnología LTCC.

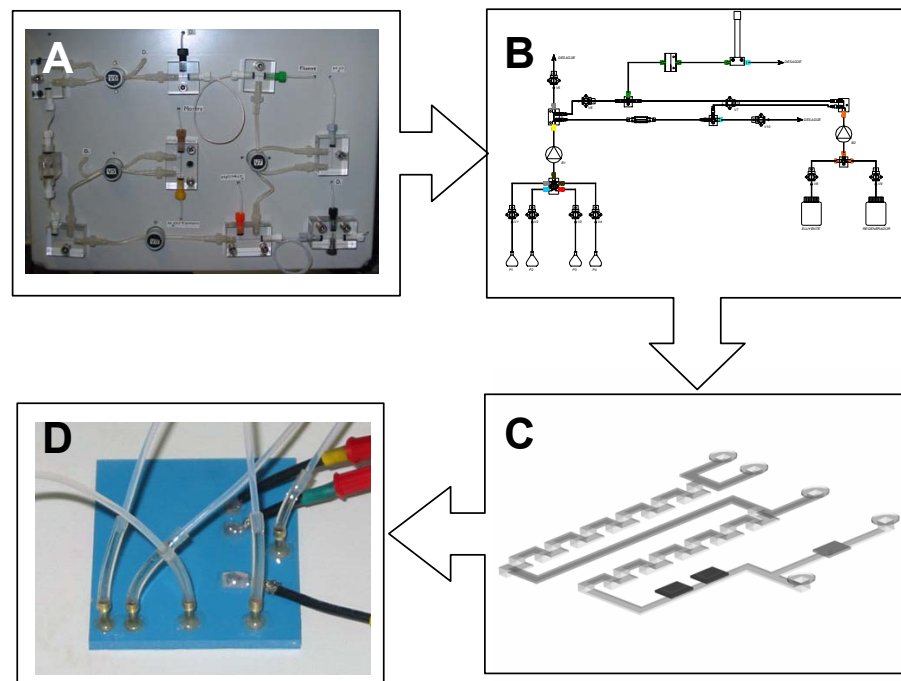
La etapa de serigrafiado es la única prescindible para la obtención de los dispositivos. Su introducción sólo es necesaria cuando se pretendan integrar monolíticamente circuitos electrónicos.

### 3.1 Diseño del dispositivo

El desarrollo de la nueva metodología de fabricación de dispositivos analíticos miniaturizados ha venido impulsado por la necesidad de escalar equipos de análisis total automáticos y autónomos, previamente desarrollados en nuestro grupo de investigación para su aplicación en la monitorización de parámetros de calidad en aguas superficiales. Dichos equipos presentan problemas de robustez y de mantenimiento que podrían ser minimizados mediante su escalado. El primer problema deriva de la complejidad de los circuitos hidráulicos provocada por la integración de etapas de pretratamiento. El segundo problema está relacionado con el elevado consumo de reactivos.

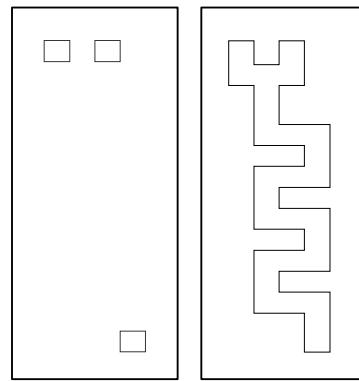
Durante el proceso de escalado se ha procedido a simplificar al máximo las etapas de pretratamiento para reducir el número de actuadores (válvulas y bombas) necesarios para la gestión de fluidos en las microestructuras de cerámica.

El esquema de la figura 3.2 muestra el proceso de escalado seguido para la fabricación de la mayoría de los dispositivos a partir de los analizadores convencionales ya existentes. Los elementos de fluidica de dichos equipos (tubos de teflón y silicona, conexiones en T, etc.) han sido sustituidos por canales y mezcladores pasivos fabricados en cerámica; los electrodos por pistas serigrafiadas; las cubetas de medida óptica, por pequeñas celdas de detección integradas monolíticamente en la estructura de cerámica, etc.

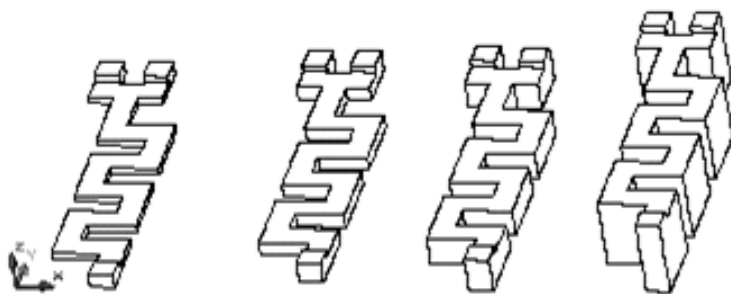


**Figura 3.2:**  
**A:** Circuito hidráulico de un equipo analizador macro (~ 35x50cm).  
**B:** esquema del circuito y etapas de funcionamiento del equipo.  
**C:** estructura tridimensional del circuito hidráulico a diseñar mediante la superposición de capas.  
**D:** analizador LTCC miniaturizado, conteniendo la estructura descrita en C (~ 5x5cm).

Algunos de los dispositivos presentados no tienen como referente un analizador convencional, sino que son novedosos tanto en lo referente al circuito hidráulico como a la técnica de detección o aplicación final. Independientemente de los antecedentes o aplicación, en el diseño del microanalizador mediante la tecnología LTCC se ha de tener en cuenta que éste deberá fabricarse mediante la metodología de superposición de capas. Es decir, se construirán diferentes capas de cerámica, cada una de ellas con un motivo que, al superponerse siguiendo el orden adecuado, permitirán obtener la estructura tridimensional deseada. Veamos, como ejemplo, el tipo de capas que constituyen un mezclador bidimensional (figura 3.3). Este tipo de canales es el ejemplo más simple de cómo la superposición de capas genera una estructura determinada. Siguiendo la misma metodología, se pueden construir canales tridimensionales como los que aparecen en la figura 3.2C, cavidades que ayuden a integrar diferentes materiales, pistas serigrafiadas, etc.

**A****B****Figura 3.3:**

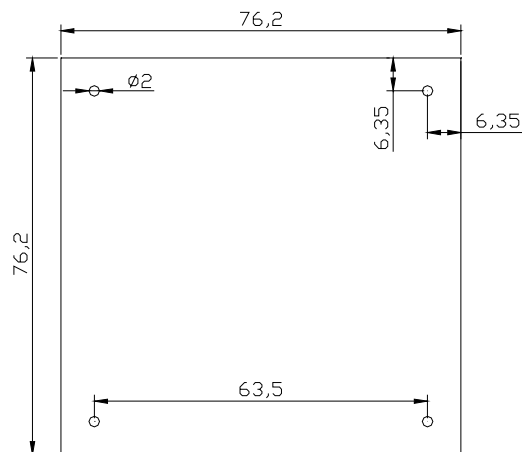
**A:** capa superior del diseño (delimita las entradas y salida del líquido). **B:** capa inferior (delimita la forma y medidas del canal). **C:** estructuras microfluídicas. La diferencia entre ellas se encuentra en el número de capas tipo **B** que se utilicen.

**C**

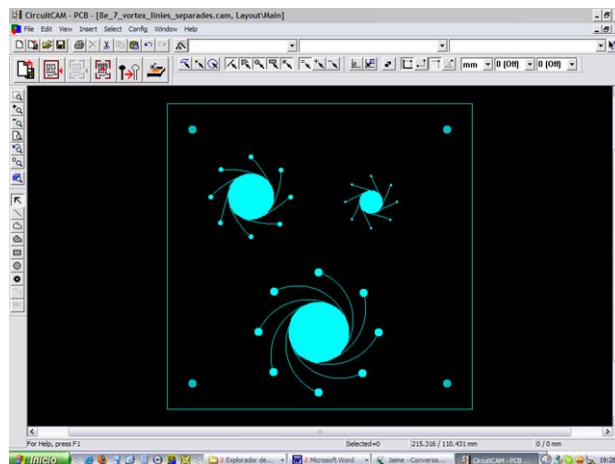
El número de capas que pueden llegar a formar parte de un dispositivo LTCC es variable, aunque el término medio oscila entre 6 y 12.

El uso de un número elevado (mayor de 20) no es aconsejable puesto que se requiere de tiempos de laminación superiores y esto puede alterar las estructuras internas creadas, además de generar estrés en algunas pistas conductoras integradas.

El área máxima que los dispositivos pueden ocupar viene determinada por el área de los platos metálicos de que se dispone para llevar a cabo la laminación de las capas cerámicas. Este dispositivo, que se explicará con detalle en el apartado de laminación, sirve para alinear las capas y aplicar después un proceso de termocompresión sobre ellas. El área del dispositivo de alineado se muestra en la figura 3.4. Cabe remarcar que entre los platos de acero y las cerámicas siempre ha de colocarse una película de, por ejemplo, Mylar<sup>®</sup> para evitar que las cerámicas se adhieran sobre el metal. En algunos casos, si los motivos contenidos en las capas no precisan de una alineación exhaustiva, se puede prescindir de los platos de alineación y aplicar la termocompresión sobre las cerámicas ordenadas y dispuestas entre los dos plásticos. En este caso, el área de trabajo útil viene dada por el área de los platos de la prensa hidráulica, en nuestro caso 250x150mm<sup>2</sup>.



**Figura 3.4:**  
Área efectiva de trabajo dentro de la cual se pueden diseñar los dispositivos (en mm). Los cuatro agujeros en cada esquina (fiduciales) son los puntos de alineación.



**Figura 3.5:**  
Imagen del software CircuitCAM con una de las capas de un dispositivo.

Una vez diseñadas cada una de las capas constituyentes del dispositivo mediante software CAD, se guardan por separado en extensión DXF y se procesan mediante el programa CircuitCAM. A través de este programa se asignan, a los diferentes trazos del diseño, herramientas concretas y tipos de corte que serán requeridas al usuario por el software de control (Board Master) de la microfresadora.

### 3.2 Mecanizado de las capas

A lo largo de este trabajo se han utilizado cerámicas de dos proveedores diferentes, cuyas características más importantes se muestran en la siguiente tabla:

CERÁMICA	CARACTERÍSTICAS
<b>Heraeus HL2000-5.3<sup>1</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grosor de la cerámica verde: <math>133 \pm 5 \mu\text{m}</math></li> <li>Encogimiento en el eje X-Y: <math>0.2 \pm 0.04\%</math></li> <li>Encogimiento en el eje Z: <math>32\%</math></li> <li>Rugosidad superficial: <math>0.7 \mu\text{m}</math> (medidas Tencor)</li> <li>No contienen Pb ni Cd</li> </ul>
<b>Dupont 951AX<sup>2</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grosor de la cerámica verde: <math>254 \pm 13 \mu\text{m}</math></li> <li>Encogimiento en el eje X-Y: <math>12.7 \pm 0.3\%</math></li> <li>Encogimiento en el eje Z: <math>15 \pm 0.5\%</math></li> <li>Rugosidad superficial: <math>&lt; 0.34 \mu\text{m}</math></li> </ul>

**Tabla 3.1:** Cerámicas utilizadas y algunas características destacables.

Aunque en la fase final del trabajo experimental de esta tesis se adquirió un equipo láser (Protolaser<sup>®</sup>), el mecanizado de la mayor parte de los dispositivos construidos se realizó mediante el uso de un equipo CNC (*Computer Numerically Controlled*). Se trata de una fresadora LPKF Protomat<sup>®</sup> C100/HF como la que se muestra en la siguiente fotografía:



**Figura 3.6:**  
Fotografía del equipo  
LPKF Protomat<sup>®</sup>  
C100/HF.





<sup>1</sup> Heraeus, LTCC *datasheet*.

<sup>2</sup> Dupont, LTCC *datasheet*.

Este equipo ha sido especialmente diseñado para realizar circuitos electrónicos para radiofrecuencias, microondas y PWBs (*Printed Wiring Board*). Su cabezal mecánico llega a 100.000 rpm y permite el uso de un amplio rango de herramientas, también enfocadas a las anteriores aplicaciones.

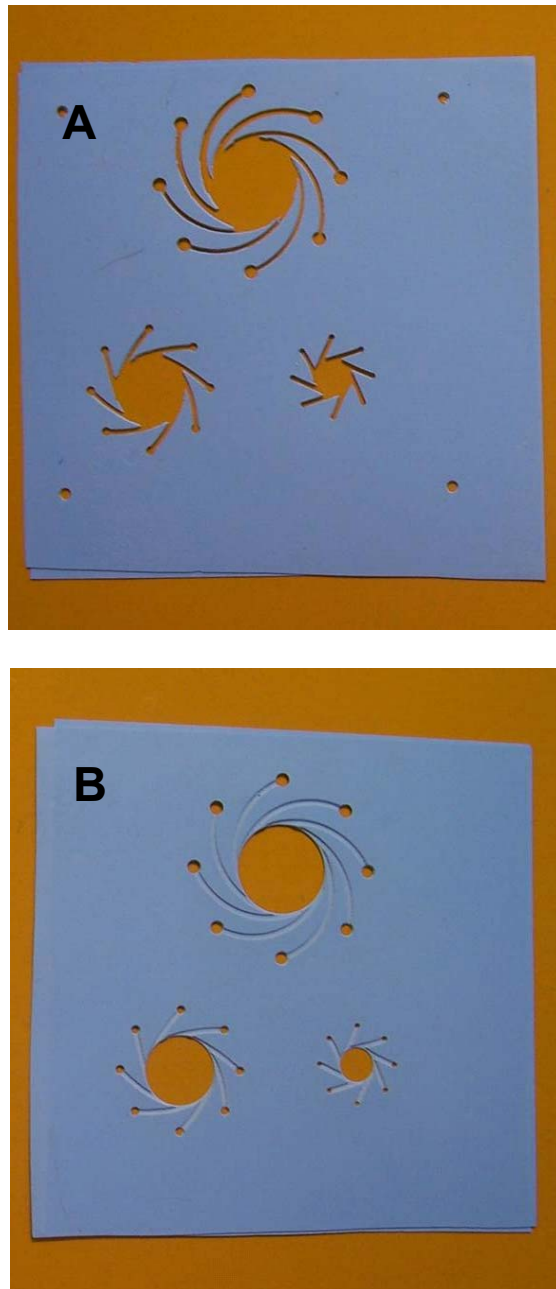
El equipo ProtoMat<sup>®</sup> C100/HF permite ajustar la profundidad del cabezal mediante un colchón de aire sin contacto, así como un micrómetro. Esto facilita el trabajar con sustratos flexibles.

En el Anexo A se da información detallada sobre los diferentes tipos de herramienta que es posible utilizar, el procedimiento específico a seguir para trabajar con ellas e instrucciones básicas de uso del software del equipo (Board Master). En la tabla 3.2 se especifican, a modo de ejemplo, algunas de las brocas y fresas más usadas en esta tesis:

HERRAMIENTA	FORMA	FUNCIÓN
<b>Universal Cutter 0.2mm</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Recortar y retirar totalmente los motivos diseñados del sustrato cerámico.</li> <li>Realizar agujeros de diámetro superior a 0.2 mm</li> </ul>
<b>Contour Router</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Realizar los agujeros fiduciales.</li> <li>Realizar canales en bajorelieve.</li> </ul>
<b>Spiral drill</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Recortar el dispositivo final una vez ha sido laminado.</li> <li>Realizar canales en bajo-relieve.</li> </ul>
<b>End Mill</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Realizar agujeros de diámetro inferior a 0.2 mm.</li> </ul>

**Tabla 3.2:** Herramientas más comunes, forma y función.

Existen dos metodologías de mecanización de motivos en el sustrato cerámico: por corte o por bajo-relieve. En la primera de ellas, el motivo se recorta mediante el uso de fresas tal y como se puede observar en la figura 3.7A. En la segunda, el canal o motivo se realiza retirando parte del sustrato cerámico, sin llegar a atravesar la cerámica completamente. En la figura 3.7B se pueden ver motivos en forma de espiral donde los canales han sido realizados en bajo-relieve y todos los orificios han sido cortados.



**Figura 3.7:**  
**A:** motivos recortados totalmente del sustrato cerámico. **B:** motivos en bajo-relieve (canales) y recortados (orificios).

En general, se utilizará la metodología de bajo-relieve cuando sea necesario realizar canales complejos, es decir, muy juntos entre ellos o rodeados de otros motivos que pueden dar fragilidad a la estructura (tal es el caso de la figura 3.7B). Para trabajar de este modo, es necesario haber laminado previamente dos o más capas de cerámica de manera que se disponga de un sustrato cerámico más rígido y grueso que las capas originales. Posteriormente se grabarán los motivos sobre el laminado.

Las medidas de los motivos que pueden ser construidos mediante el equipo CNC vienen determinadas por el diámetro de la herramienta, el grosor de las capas cerámicas y por el encogimiento causado durante la sinterización.



Así, teniendo en cuenta que se trabaja con herramientas de 0.2 a 2.5 mm de diámetro, las dimensiones de canal mínimas que podríamos conseguir, después del encogimiento, serían de ~0.17 mm de ancho (suponiendo una herramienta de 0.2 mm) y ~0.21 mm de profundo (suponiendo que sólo 1 capa de cerámica de 254  $\mu\text{m}$  hubiera sido mecanizada). Para determinadas aplicaciones, por ejemplo electroforesis capilar,<sup>3</sup> puede ser necesario trabajar con dimensiones más pequeñas, en este caso deberíamos hacer uso de un equipo láser. Tal y como se ha comprobado en nuestro grupo de investigación, mediante el uso de este equipo no sólo se consigue una más rápida fabricación de los dispositivos, sino que permite la realización de estructuras del orden de las 25  $\mu\text{m}$  (diámetro del haz del láser). Es decir, estructuras como las de tipo vórtex, o aún más complejas, pueden fabricarse de una manera rápida y sencilla.

### 3.3 Serigrafía

Una vez mecanizadas cada una de las capas, y antes de superponerlas y laminarlas, puede ser necesario integrar pistas conductoras con diferentes finalidades.

A lo largo de esta tesis se ha trabajado con diferentes pastas conductoras de dos casas comerciales: Dupont y Heraeus.

PROVEEDOR	REF.	FUNCIÓN
DUPONT	6141	Pasta de Ag para rellenar vías.
	6142	Pasta de Ag para capas internas. Si se coloca sobre la superficie de una capa, ésta se deforma durante el proceso de sinterización. Este efecto es mucho más pronunciado en el caso de la pasta 6141, por lo cual se desaconseja su uso si es superficial.
	6146	Pasta de Ag/Pd para colocar en la superficie de la cerámica. Se pueden soldar cables eléctricos sobre ella.
	Q5171	Pasta conductora. Especialmente utilizada en alúmina.
	Q9615	Pasta de vidrio para altas temperaturas (850°C).
	QQ550	Pasta de vidrio para temperaturas moderadas (550°C).
	5739	Pasta de Ag/Au para superficies (serigrafía de electrodos, por ejemplo). Se aconseja la 6146 para este fin.
	5742	Pasta de Au para LTCC (no alúmina).
	QC150	Pasta de Au para alúmina o LTCC ya sinterizada.
	TC0306	Pasta de Ag para la superficie de la cerámica.
HERAEUS	TC0307	Pasta de Ag para capas internas.
	TC0308	Pasta de Ag para rellenar vías.

**Tabla 3.3:** Pastas serigráficas y función de cada una de ellas.

<sup>3</sup> Henry, C. S.; Zhong, M.; Lunte, S. M.; Kim, M.; Bau, H.; Santiago, J. J. *Anal. Commun.*, **1999**, 36, 305.

En la tabla 3.3 se detallan cada una de las pastas utilizadas y su función.

Para obtener unos resultados óptimos, las pastas deberían utilizarse con sus cerámicas verdes correspondientes. En ocasiones, sin embargo, se han combinado pastas y cerámicas de diferentes proveedores. En estos casos, se han observado algunas deformaciones en las pistas serigrafiadas.

El fabricante especifica, para cada tipo de pasta serigráfica, las características de la malla de la pantalla a usar y los tiempos y temperaturas de secado, tanto los referentes al secado que se realiza entre la serigrafía de capas sucesivas, como el previo de las cerámicas, y los del proceso de sinterización. En la siguiente tabla se muestran algunas de las condiciones de trabajo a tener en cuenta:

CERÁMICA	CARACTERÍSTICAS
HERAEUS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preacondicionado de las cerámicas antes de la serigrafía: 10 minutos a 80°C.</li> <li>• Secado de las pistas serigrafiadas: 15 minutos a 80°C.</li> <li>• Se realiza la serigrafía sobre la parte mate de la cerámica, aunque la brillante también puede ser serigrafiada si se requieren pistas por ambos lados de la cerámica.</li> </ul>
DUPONT <sup>4</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se recomienda un preacondicionamiento de las cerámicas de 20-30 minutos a 120°C o bien 24 horas en una atmósfera de nitrógeno.</li> <li>• Secado de las pistas serigrafiadas: 5 minutos a 120°C.</li> <li>• Se recomienda no retirar el Mylar<sup>®</sup> para conferir rigidez a la estructura.</li> </ul>

**Tabla 3.4:** Especificaciones de los fabricantes sobre el proceso de serigrafía

La pantalla serigráfica consiste en un marco metálico o de madera en el cual se ha tensado y colado una malla. Para la mayoría de aplicaciones, esta malla es de poliéster, nylon o acero inoxidable. Para capas gruesas, la malla más empleada es la de acero inoxidable, puesto que tiene una alta resistencia a la tensión y una baja compresibilidad, lo que resulta en unos estampados más exactos y gruesos que los que se obtendrían si se usara poliéster. La característica principal de las mallas es el número de líneas contenidas por centímetro (o pulgada), que puede variar desde 32 (u 80) para pastas soldables y resistoras, y hasta 160 (o 400) para conductores para microondas.

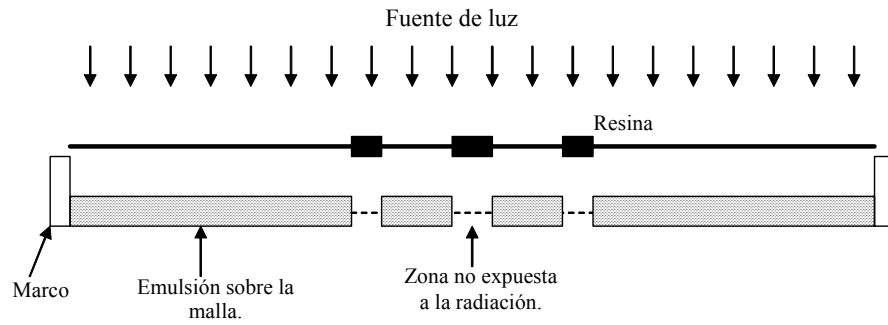
Los motivos a serigrafiar se definen en la malla mediante aperturas producidas fotolitográficamente en una emulsión adherida sobre ella, tal y como se esquematiza en la figura 3.8.<sup>5</sup>

<sup>4</sup> Dupont Green Tape™ Material System Design and Layout Guidelines.

<sup>5</sup> Haskard, M.; Pitt, K. *Thick-film technology and applications*, Electrochemical Publications LTD, Isle of Man, British Isles, 1997.

**Figura 3.8:**

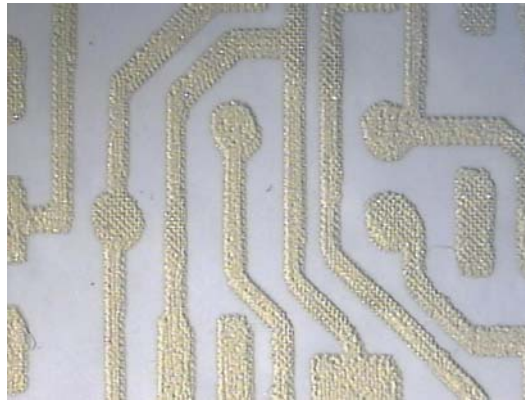
Esquema de una pantalla con emulsión y del proceso fotolitográfico. La escala vertical se ha exagerado expresamente. La fotoresina positiva debería estar en contacto con la malla.



La figura 3.9 muestra la serigrafía de un circuito impreso sobre la cerámica HL2000-5.3 usando la pasta conductora TC0306. La malla utilizada fue de acero inoxidable, con un entramado de 325 y una emulsión de 12  $\mu\text{m}$ , tal y como recomendaba el fabricante de los materiales.

**Figura 3.9:**

Detalle de un circuito impreso generado sobre una capa LTCC. Se puede observar la marca de la malla en las pistas conductoras.



Inicialmente se realizaron pruebas preliminares de compatibilidad entre materiales, así como adherencia. Éstas se llevaron a cabo serigrafiando manualmente pistas conductoras sobre las cerámicas. El serigrafiado de los dispositivos finales, y de los circuitos impresos integrados en estos, fue realizado con mayas de poliéster o de acero inoxidable utilizando un equipo serigráfico DEK 248 o, en ocasiones, manualmente.

### 3.4 Integración de otros componentes

Junto con las pistas conductoras, también puede ser necesaria la integración de otros componentes tanto en el interior de la estructura cerámica como a nivel superficial. La principal condición que han de cumplir estos es que soporten 850°C, temperatura máxima a la que se llega en el proceso de sinterización, sin cambiar sus propiedades químico-físicas o funcionales.

En este trabajo se han integrado dos tipos de materiales: placas de platino como electrodos para llevar a cabo detección amperométrica y rejillas metálicas que ayuden a retener resinas de intercambio iónico en una cavidad diseñada en el interior de un dispositivo cerámico.

De ambos materiales se dará información más detallada en los apartados donde se describen los dispositivos en los que se integran.

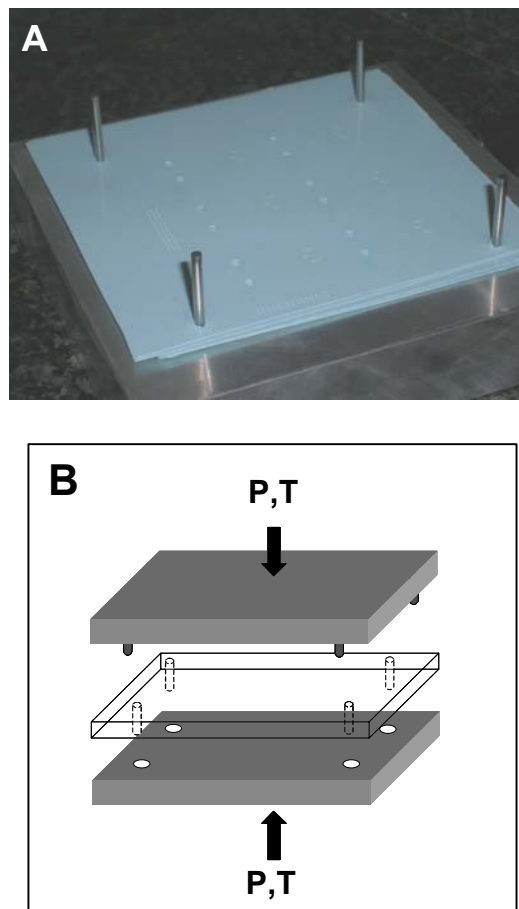
### 3.5 Laminación

La laminación es el proceso más importante dentro de la construcción de dispositivos LTCC. La adecuada realización de esta etapa evita que se produzcan deformaciones en las estructuras internas que podrían provocar pérdidas de líquido, obturaciones, etc. Permite, además, que las capas de cerámica queden perfectamente alineadas y generen un bloque sólido al final del proceso de sinterizado.

A continuación, y aunque existen diferentes procedimientos para llevar a cabo esta etapa, sólo se describirán detalladamente la laminación por termocompresión (aplicación de presión y temperatura) y la laminación a baja temperatura y baja presión.

#### 3.5.1 TERMOCOMPRESIÓN

Es la metodología clásica y consiste en aplicar presión mediante una prensa a la vez que se mantiene una temperatura de entre 70 y 150°C.



**Figura 3.10:**

A: soporte de alineación con un grupo de cerámicas ya mecanizadas.

B: esquema del proceso de laminación.

Utiliza un soporte que permite alinear, en el orden adecuado, las diferentes capas cerámicas. Dicho soporte tiene cuatro pivotes cuya posición coincide con cuatro agujeros de alineación o fiduciales incorporados en el diseño y mecanizado en todas las capas de cerámica (figura 3.4). La fotografía de la figura 3.10 muestra un conjunto de capas cerámicas ya dispuestas en el soporte de alineación y un esquema del proceso.

Tal y como ya se mencionó en el apartado §3.1, entre el soporte y las cerámicas debe colocarse un plástico (Mylar®) para evitar que las capas se queden adheridas sobre el acero. Cuando las capas diseñadas no requieran de una alineación cuidadosa, cabe recordar que se puede prescindir de los soportes de alineación y laminar las capas directamente entre los platos de la laminadora, usando siempre Mylar® para proteger las cerámicas.

El equipo utilizado para llevar a cabo este proceso fue construido expresamente para esta aplicación. Se trata de una prensa hidráulica (Talleres Francisco Camps S.A., Granollers, España) con dos platos calentadores de acero de 250x150 mm, que incorporan termopares para controlar la temperatura. Puede realizar un esfuerzo máximo (para una sección de 77x77 mm) de 420 Kg/cm<sup>2</sup>.

Aunque los fabricantes de cerámica fijan para cada material unas condiciones de laminación bien definidas, esta información es sólo aplicable a la fabricación de circuitos impresos. En general, se aplican presiones elevadas durante un periodo de tiempo de 3-4 minutos.

El uso diferente que en nuestro grupo se le da a las cerámicas, que incluye la integración de estructuras tridimensionales complejas que generan huecos en el interior de éstas (canales, cámaras, componentes cosinterizables, etc.), no permite aplicar directamente dichos parámetros de operación. Por este motivo, y debido a las peculiaridades de los diferentes dispositivos diseñados a lo largo de esta tesis, los parámetros de operación del proceso de laminación se han de adaptar/optimizar para cada uno de ellos.

Cuando sea necesario laminar capas de cerámica que no contengan ningún motivo, es decir, aquellas que se utilicen para realizar estructuras en bajorelieve o para serigrafiar circuitos electrónicos, se puede aplicar una presión de 3000-3500 psi a 100°C durante 2-4 minutos sin peligro de deformación. En el caso de las cerámicas de Heraeus HL2000-5.3, es preferible disminuir la temperatura a unos 70°C, puesto que a 100°C se observa la aparición de protuberancias en la superficie de la cerámica, producto de la evaporación de algunos componentes orgánicos. Sin embargo, si las cerámicas a laminar tienen geometrías complejas, especialmente si se trata de canales anchos (~2 mm) o cavidades grandes (>0.5 mm de diámetro) se ha de realizar el proceso de laminación muy cuidadosamente. Manteniendo siempre la temperatura a 100°C (70°C si son Heraeus), se aplican presiones inferiores (~2000 psi) durante periodos cortos de tiempo (1.5-2 minutos).

Al final de cada periodo se controla el laminado alcanzado, deteniendo el proceso si se considera que se puede producir una deformación irreversible de la estructura interna. En este punto es posible observar cómo los canales se van marcando en la superficie de la cerámica al ir aplicando presión. Es importante que la laminación se realice el máximo de tiempo posible puesto que, si detenemos el proceso demasiado pronto, después de sinterizar podemos observar una falta de unión entre capas y la consiguiente pérdida de líquidos a través de ellas. A parte de la metodología de laminación que se propone en el siguiente apartado, y para evitar posibles deformaciones durante el proceso de termocompresión, se puede hacer uso de lo que se conoce como fases fugitivas. La técnica consiste en el uso de una mezcla de carbono grafito con un disolvente orgánico que le confiera una viscosidad suficiente como para que éste pueda ser insertado en los canales o cavidades para que en la laminación, no se vean tan afectados por la presión. Durante el sinterizado, el carbono se oxida, actuando como fase sacrificial.<sup>6</sup>

### 3.5.2 LAMINACIÓN A BAJA PRESIÓN Y BAJA TEMPERATURA

Aunque la anterior metodología de trabajo es la más utilizada para llevar a cabo la laminación, no está exenta de problemas para determinadas aplicaciones, sobretodo, en dispositivos de fluídica. La técnica de laminación a baja presión y baja temperatura (CLPL: *Cold Low Pressure Lamination*)<sup>7</sup> fue desarrollada por Roosen<sup>7</sup> con la finalidad de dar solución a los anteriores inconvenientes. En esta técnica, se provoca una unión temporal de dos capas de cerámica mediante cintas con adhesivo por ambos lados, de manera que no se requiera de altas presiones ni temperaturas. Según el autor de esta técnica, el mecanismo de unión se debe al hecho de que el polímero del adhesivo funde a temperaturas superiores a las de los componentes orgánicos de las cerámicas. Durante el proceso de fusión, la cinta adhesiva se transforma en líquido y éste favorece la formación de fuerzas capilares que ayudan a mantener unidas a las cerámicas, impulsando la reorganización de partículas de alúmina.

Siguiendo esta aproximación y en colaboración con el Laboratório de Sistemas Integráveis (LSI) de la Universidad de São Paulo (Brasil), se desarrolló una técnica análoga basada en el uso de fluidos orgánicos para unir cerámicas verdes. Inicialmente se observó que una sustancia como la miel, aplicada mediante un rodillo entre las capas a unir y sin necesidad de aplicar posteriormente un proceso de termocompresión entre ellas, tenía las mismas ventajas que las cintas adhesivas usadas por Roosen.

En general, la miel incluye un 31% de glucosa, un 38.5% de fructosa, un 7.2% de maltosa y un 10% sacarosa.

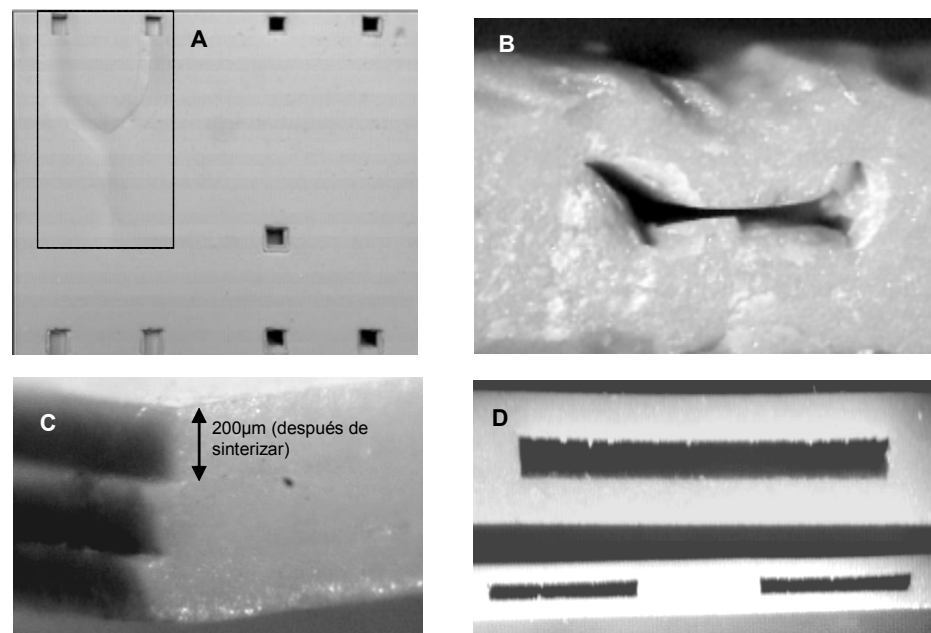
<sup>6</sup> Gongora-Rubio, M.R.; Espinoza-Vallejos, P.; Sola-Laguna, L.; Santiago-Avilés, J.J. *Sens. Actuators A-Phys*, **2001**, *89*, 222.

<sup>7</sup> Roosen, A. *J. European Ceram. Soc.*, **2001**, *21*, 1993.

Para poder utilizar un material de composición controlada, se evaluaron disoluciones de cada uno de los componentes por separado como adhesivos para laminación.

Todas las disoluciones se depositaron entre dos capas de cerámica verde que fueron finalmente sinterizadas. En ningún caso se observó una interfase visible entre capas, lo que indicaba la obtención de una buena laminación. En consecuencia, se estableció que cualquier disolución azucarada que tuviera una temperatura de descomposición entre 100-150°C, temperatura a partir del cual los primeros componentes orgánicos de la cerámica empiezan a volatilizarse, sería útil para mantener ligera y momentáneamente unidas las capas de LTCC favoreciendo así el inicio de la interpenetración particular entre capas.<sup>8</sup>

Comparado con el método de las cintas adhesivas, el uso de fluidos orgánicos presenta ciertas ventajas, como son la deposición espacial selectiva del fluido y la fácil automatización del método. La figura 3.11 recoge algunos ejemplos de laminaciones realizadas mediante ambas metodologías (termocompresión y CLPL). La fotografía 3.11A muestra unos canales de 1 mm de ancho deformados debido a la presión aplicada. La sección transversal de uno de ellos puede observarse en la fotografía 3.11B.



**Figura 3.11:**  
**A:** canales deformados por una presión excesiva (foto tomada con un microscopio convencional). **B:** perfil de un canal deformado por exceso de presión.  
**C:** perfil de tres capas sinterizadas donde no se observa diferencia entre ellas. **D:** perfiles de canales no deformados. (Fotos B, C y D tomadas con SEM: *Scanning Electron Microscopy*).

Las fotografías 3.11C y D corresponden a laminaciones realizadas mediante el uso de fluidos orgánicos. Cuando una laminación se ha realizado correctamente no se pueden diferenciar las capas que, originalmente, conformaban el dispositivo, tal y como sucede en 3.11C.

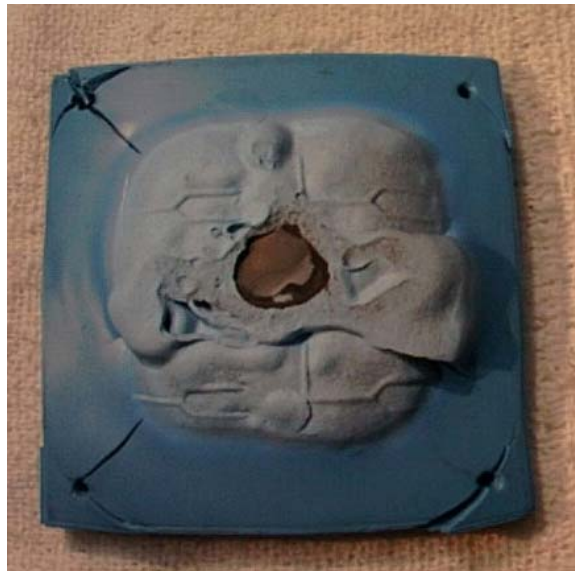
<sup>8</sup> Gongora-Rubio, M.R.; Rocha, Z.; Ibañez-García, N.; Oliveira, N.A.; Matos, J.R. in: *IMAPS Conference and Exhibition on Ceramic Interconnect Technology*, 2004, CD-ROM.

El corte transversal de los canales en 3.11D muestra cómo no han sufrido ninguna deformación, a pesar de ser igualmente anchos.

En general, la laminación ideal es aquella que combina las dos metodologías. Cuando las estructuras internas sean potencialmente deformables, o cuando en el interior del dispositivo se haya integrado algún material no cerámico, se recomienda depositar una pequeña cantidad de fluido orgánico (una disolución saturada de glucosa es suficiente) entre las capas y aplicar posteriormente el proceso de termocompresión, durante menos tiempo y menos presión, controlando en todo momento la progresión de la laminación.

Otro caso en el que resulta interesante combinar ambos métodos es en la fabricación de dispositivos que contengan un número elevado de capas (>12) o que contengan capas que ya hayan sido laminadas previamente (por ejemplo para realizar los canales en bajo relieve). En estos casos, para asegurar una buena adhesión entre capas, suele ser necesario aplicar presión durante bastante tiempo, lo que aumenta el riesgo de provocar deformaciones. Para evitarlo, se recomienda la aplicación de disoluciones orgánicas entre las capas para poder disminuir el tiempo y la presión en la termocompresión.

Esta práctica, sin embargo, también conlleva un riesgo y es el uso de un exceso de fluido orgánico. Si el dispositivo no permite la evacuación de los gases producidos durante el proceso de descomposición del azúcar, en ausencia de oxígeno, se produce la carbonización del mismo. Las consecuencias se pueden observar en la figura 3.12.



**Figura 3.12:**  
Dispositivo de 40 capas con miel entre cada una de ellas. En el centro se observa el carbón generado y la deformación consiguiente.

### 3.6 Sinterización

Antes de proceder a la sinterización, último paso en el proceso de fabricación, es necesario eliminar el exceso de material cerámico para conformar el tamaño final del dispositivo.

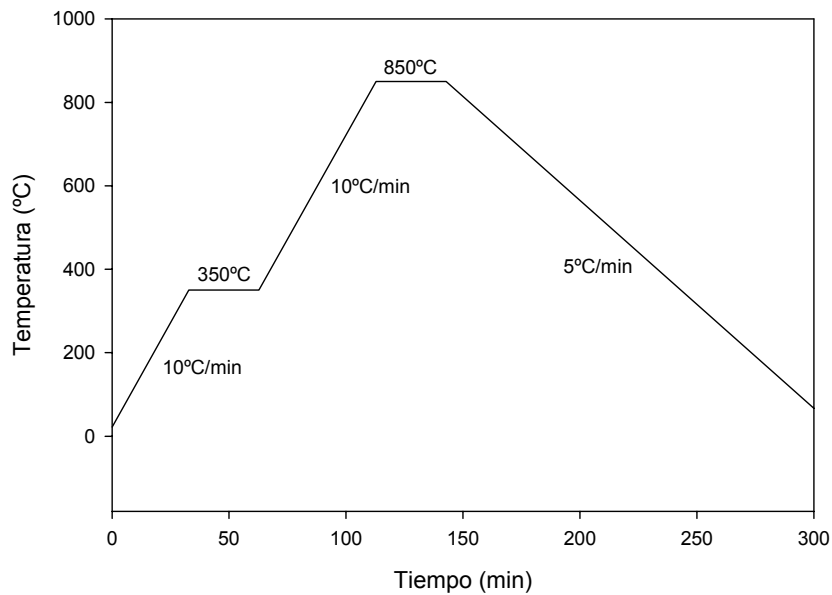


En esta fase, la zona donde se encuentran los agujeros fiduciales puede ser eliminada utilizando una broca de diámetro 0.7-0.9 mm.

Para la sinterización se utiliza un horno CARBOLITE CBCWF11/23P16 (Afora, España) que puede llegar a una temperatura de 1100°C y que trabaja en atmósfera de aire. Adicionalmente, se pueden programar hasta 16 rampas de temperatura.

Una vez más, cada fabricante recomienda un perfil de temperaturas determinado en función de las características de las cerámicas que, normalmente, son serigrafiadas con usos electrónicos.

En la figura 3.13 mostramos la rampa de temperatura utilizada en la fabricación de nuestros dispositivos.

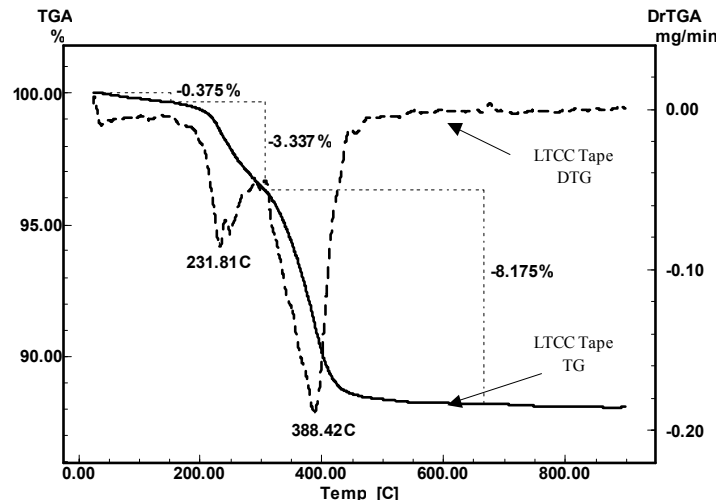


**Figura 3.13:** Perfil de temperaturas seguido en el proceso de sinterización.

La principal característica es la presencia de dos etapas de temperatura constante, de 30 minutos de duración cada una. En la primera, entre 200 y 400°C, tiene lugar la volatilización de la totalidad de los componentes orgánicos.<sup>4</sup> En la segunda, entre 600 y 900°C, se encuentra la temperatura de transición vítrea de la mayoría de vidrios, produciéndose la interpenetración de alúmina entre capas. Tal y como se puede observar en la figura 3.13, la rampa de enfriamiento se ha establecido a 5°C/min, pero podría elevarse a 10°C/min si se quisiera finalizar el ciclo antes.

Respecto a la laminación con fluidos orgánicos, en el caso de utilizar un número de capas elevado, se recomienda utilizar rampas de incremento de temperatura de 6°C/min para ayudar a la evacuación de los gases producidos por la descomposición de la materia orgánica, evitando así posibles deformaciones en la estructura del dispositivo.

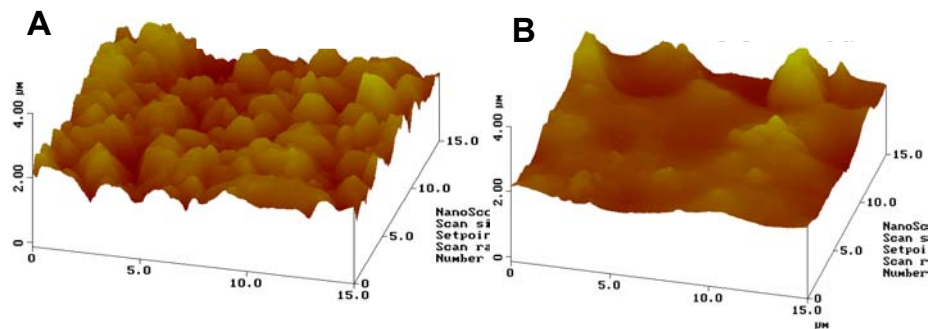
**Figura 3.14:**  
Análisis termogravimétrico donde se puede observar la variación de peso de la cerámica en función de la temperatura durante el proceso de sinterización. También se muestra la derivada (DrTGA).



El análisis termogravimétrico realizado a una capa de cerámica verde, demuestra como hay dos temperaturas críticas: 231.8 y 388.42°C, que indican la pérdida de los disolventes mayoritarios. Posteriormente el peso de la cerámica se estabiliza.

Otro aspecto del proceso de sinterización que es interesante destacar se refiere al cambio respecto a la rugosidad de la superficie de la cerámica. La figura 3.15 muestra imágenes obtenidas por AFM (*Atomic Force Microscopy*) de la cerámica verde y sinterizada. Se puede observar cómo la superficie de la cerámica sinterizada se vuelve menos rugosa debido al efecto de sinterización viscosa.

**Figura 3.15:**  
AFM de la superficie de una capa de cerámica en verde y después de su sinterizado.



Mediante diversas modificaciones del proceso de sinterización también puede compensarse el encogimiento en los ejes X-Y sufrido por las cerámicas cuando se evaporan sus componentes orgánicos. Los más relevantes se explican a continuación:

a) **TOS (*Tape on Substrate*)**: Se consigue eliminar el encogimiento trabajando con sustratos que contengan principalmente  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{BeO}$  o  $\text{AlN}$ . Se realiza la serigrafía sobre ellos y se lamina y sinteriza para después poder volver a serigrafiar más pistas conductoras.

El procedimiento, además de tener un coste y tiempo de procesado elevados, implica trabajar con un número de capas de cerámica limitado.<sup>9,10</sup>

b) **PLAS (*Pressure Assisted Sintering*)**: Se basa en el uso de capas porosas o densas sacrificiales que no encogen en el proceso de sinterización. Estas capas, unidas a las cerámicas verdes, pueden retirarse posteriormente mediante la aplicación de chorros de agua o arena (*sand blasting*).

c) **PAS (*Pressure Assisted Sintering*)**: Se utiliza una presión uniaxial durante la sinterización. El proceso, que normalmente se lleva a cabo al vacío, se combina con el uso de capas sacrificiales.

d) **SCS (*Self Constrained Sintering*) o SCPLAS (*Self Constrained PLAS*)**: Sistema similar al PLAS con la diferencia que el material limitante se integra entre las capas de cerámica y no en la superficie; por lo tanto, no son sacrificiales porque no se retiran después del proceso de sinterización.<sup>11</sup>

Todos estos métodos son especialmente útiles en la fabricación de circuitos electrónicos, donde es muy importante asegurar la densidad y porosidad del material dieléctrico (para evitar cortocircuitos) así como la producción de sustratos de dimensiones perfectamente conocidas.

### 3.7 Dispositivos fabricados

A lo largo de esta tesis se han construido un gran número de prototipos de dispositivos analíticos. En los próximos capítulos aparecen aquellos que aportan información relevante y que, por tanto, son sólo una muestra representativa de todos los prototipos fabricados.

Dado su número, y para no caer en reiteraciones innecesarias, se dará una visión global de cada uno de los analizadores construidos, haciendo especial hincapié en las particularidades que los diferencian: tipo de sistema de detección, etapas de pretratamiento, procesos serigráficos, etc.

De manera adicional, en el Anexo C se incluye información más extensa sobre el diseño CAD de las capas integrantes de los dispositivos y otros datos a tener en cuenta que, junto con los Anexos A y B, pueden resultar de utilidad si en algún momento se intenta reproducir alguno de ellos.

---

<sup>9</sup> Scranton, C.; Lawson, J. **in:** *Proceedings Radioand Wireless Conference (RAWCON)*, **1999**, 194.

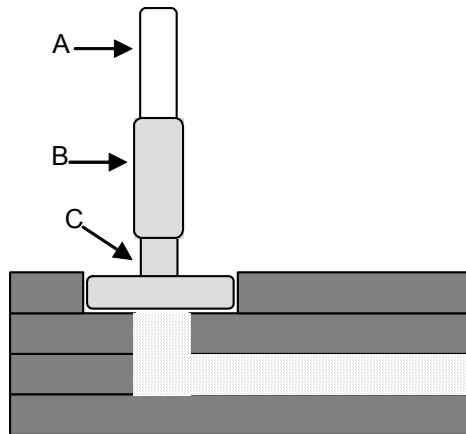
<sup>10</sup> Patterson, F.K.; Gantzhorn, J.E.; Daly, T.P.; Rellick, J.R.; Iwabuchi, M.; Kawasaki, S. **in:** *IEMT Symposium*, **1989**, 147.

<sup>11</sup> Mohanram, A.; Lee, S.H.; Messing, G.L.; Green, D.J. *J. Am. Ceram. Soc.*, **2006**, *89*, 1923.

Para llevar a cabo la descripción de los microanalizadores construidos, se han clasificado en tres grupos en función del sistema de detección empleado: DP (detección potenciométrica), DA (detección amperométrica) y DO (detección óptica). Finalmente también se presenta un cuarto grupo de dispositivos cerámicos sin finalidad estrictamente analítica (grupo D). La información relacionada con cada uno de ellos se ha compilado en un capítulo de la presente tesis. La clasificación resultante se muestra en la tabla 3.5.

Todos los analizadores construidos tienen en común el sistema de conexión de la microfluídica al mundo exterior macro. Se utilizan conectores como los que aparecen en la figura 3.16. Son de latón y se fijan mediante una cola epoxídica en una cavidad diseñada en la superficie de la cerámica.

**Figura 3.16:** Esquema de la colocación de un conector. **A:** tubo de teflón por el cual entran o salen líquidos. **B:** tubo de silicona que ayuda a fijar el de teflón. **C:** conector metálico alrededor del cual se deposita la cola epoxídica para fijarlo a la superficie de la cerámica.



PROTOTIPO DE ANALIZADOR	CARACTERÍSTICAS	SISTEMA DE DETECCIÓN	
		Principio Medida	Nivel Integración
<b>DP1:</b> ión fosfato	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mezclador serpentina.</li> </ul>	Potenciométrico	Monolítica (ISE)
<b>DP2:</b> ión cloruro	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mezclador serpentina.</li> </ul>	Potenciométrico	Monolítica (ISE)
<b>DP3:</b> ión fosfato	<ul style="list-style-type: none"> <li>Etapas de preconcentración mediante resinas de intercambio iónico.</li> </ul>	Potenciométrico	Modular (Híbrido)
<b>DP4:</b> ión amonio	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mezclador serpentina.</li> <li>Etapas de difusión gaseosa.</li> </ul>	Potenciométrico	Modular (Híbrido)
<b>DP5:</b> ión amonio/ ión nitrato	<ul style="list-style-type: none"> <li>Integración de membranas potenciométricas mediante dos metodologías: disco preformado y método preserigráfico.</li> <li>Integración del electrodo de referencia en un canal auxiliar.</li> </ul>	Potenciométrico	Monolítica (ISE y REF)
<b>DP6:</b> iones nitrato y cloruro (biparamétrico)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mezclador bidimensional y serpentina.</li> <li>Integración de un electrodo selectivo basado en membranas poliméricas y de otro basado en un sólido homogéneo cristalino.</li> <li>Integración del electrodo de referencia en un canal auxiliar.</li> </ul>	Potenciométrico	Monolítica (ISE y REF)
<b>DP7:</b> ión nitrato y amonio en suelos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Integración del electrodo de referencia.</li> </ul>	Potenciométrico	Monolítica (ISE y REF)
<b>DA1:</b> pesticidas por inhibición enzimática	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mezclador bidimensional y serpentina.</li> </ul>	Amperométrico	Monolítica (IND, AUX y REF)
<b>DO1:</b> ión nitrito		Óptico	Monolítica
<b>DO2:</b> inhibición quimioluminiscencia	<ul style="list-style-type: none"> <li>Integración de un mezclador vórtex como celda de detección.</li> </ul>	Óptico	Monolítica
<b>D1:</b> electrónica: control y adquisición señales		Potenciométrico	
<b>D2:</b> sistema de control de temperatura			

\* En el caso de los dispositivos con detección óptica (DO), se entiende por “integrado” el hecho de que contengan o no el equivalente a la celda de detección óptica en sistemas de flujo macro.

**Tabla 3.5:** Resumen de los analizadores construidos: **D:** dispositivo; **P:** potenciométrico; **A:** amperométrico; **O:** óptico.

## 4. DISPOSITIVOS POTENCIOMÉTRICOS

Cada uno de los microdispositivos con detección potenciométrica mediante electrodos selectivos a iones diseñados y presentados en este capítulo tiene un precedente macro en nuestro grupo de investigación. El diseño, construcción y evaluación de equipos analizadores automáticos y autónomos para la determinación de parámetros de interés medioambiental es una de las líneas de investigación prioritarias dentro del Grupo de Sensores y Biosensores. Gran parte de los equipos desarrollados han sido transferidos a la empresa Adasa Sistemas del Grupo AGBAR para su fabricación e implantación en estaciones automáticas de control de la calidad de aguas superficiales de la Red SAICA y XACQUA. El principio de funcionamiento de estos analizadores conjuga las ventajas de los sensores (integración del procedimiento analítico) y de los sistemas de flujo continuo (automatización del procedimiento analítico).

Los equipos se basan en el uso de este tipo de sensores, que simplifican notablemente algunas etapas del proceso analítico,<sup>1</sup> y técnicas de flujo continuo como el FIA (*Flow Injection Analysis*), que permiten la automatización de las medidas.<sup>2</sup> En algunos casos suele ser necesaria la integración de determinadas etapas de pretratamiento de muestra para dotar al sistema de sensibilidad y selectividad.

En los siguientes apartados se muestran algunos de los dispositivos construidos fruto del escalado de los analizadores ya existentes. Los analizadores DP1 y DP2 utilizan la misma plataforma fluidica, un mezclador tridimensional en forma de serpentina, lo que permite evaluar la facilidad de construcción de este tipo de estructuras, así como el grado de mezcla conseguido entre los reactivos utilizados. Los dispositivos DP3 y DP4 sirven para evaluar la posibilidad de integración de etapas de pretratamiento de muestra. En concreto, se estudia la implementación de un proceso de preconcentración y una etapa de difusión gaseosa. A continuación se presentan dos analizadores (DP5 y DP6) representativos de todos los prototipos construidos y evaluados, que integran en diferente grado el sistema de detección. Finalmente, y apartándonos del análisis de aguas, se presenta la sonda DP7, diseñada para el análisis de nutrientes en suelos y que utiliza algunos de los aspectos estudiados en los anteriores prototipos, aunque el ámbito de aplicación sea totalmente diferente.

---

<sup>1</sup> Alegret, S.; Alonso, J.; Bartolí, J.; Paulis, J.M.; Lima, J.L.F.C.; Machado, A.A.S.C. *Anal. Chim. Acta*, **1984**, *164*, 147.

<sup>2</sup> Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; *Anal. Chim. Acta*, **1975**, *78*, 145.

### 4.1 Analizador de ión fosfato con mezclador serpentina (DP1)

El punto de partida para el diseño de este dispositivo es el analizador de fosfato desarrollado en nuestro grupo de investigación y comercializado como Aquafos<sup>®</sup>.<sup>3</sup> En él, se lleva a cabo la determinación de fosfatos en aguas superficiales mediante un electrodo selectivo a esta especie, constituido por una placa de cobalto metálico.<sup>4,5</sup> El límite de detección de este sensor es del orden de 5.5 ppm de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Este valor es demasiado alto si se tiene en cuenta que se pretende monitorizar el proceso de eutrofización que tiene lugar en lagos y ríos y que empieza a hacerse evidente a concentraciones de orto-fosfatos superiores a 0.1 ppm. Por este motivo, para ayudar a mejorar el límite de detección del sistema, el analizador incorpora una etapa de preconcentración mediante el uso de resinas de intercambio iónico.

En el microanalizador que se describe a continuación no se pretende evaluar la etapa de preconcentración (ver el dispositivo DP3), sino la posibilidad de construir plataformas fluidicas tridimensionales complejas mediante el uso de la tecnología LTCC. En particular, se pretende integrar un mezclador en forma de serpentina así como el electrodo selectivo. En la figura 4.1 se muestran dos fotografías de uno de los dispositivos construidos así como un dibujo esquemático obtenido por CAD. Se pueden observar tanto los serpentines de mezcla como la cavidad para el alojamiento del disco de cobalto, que es de diámetro ligeramente superior a éste y bajo la cual circula el líquido.

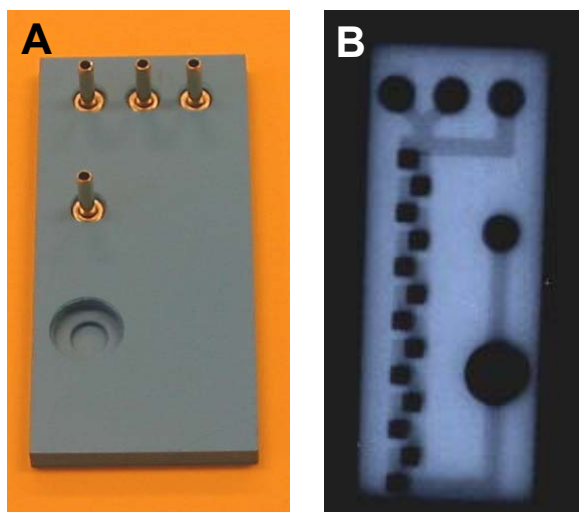
La unidad básica de la geometría de este microanalizador es una sección en forma de L que hace girar el fluido 90° en el mismo plano, haciéndolo bajar o subir a capas de diferente nivel, también mediante un giro de 90°. Todo ello conforma un mezclador tridimensional en forma de serpentina con 12 unidades L (ver apartado §1.5.1). Al entrar al dispositivo, los líquidos se encuentran en una unión en forma de Y y después son dirigidos hasta el mezclador serpentina. Antes de llegar al detector, el canal experimenta un ensanchamiento diseñado para aumentar el área de contacto entre el líquido y la superficie del disco sensor. Aunque tal y como se puede observar en la figura 4.1, el diseño original contenía tres entradas, durante los experimentos realizados tan sólo se utilizaron dos de ellas.

---

<sup>3</sup> Ramon, M. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, **2004**.

<sup>4</sup> Ibañez-García, N. *Trabajo de investigación*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, **2003**.

<sup>5</sup> Chen, Z.L.; De Marco, R.; Alexander, P.W. *Anal. Commun.*, **1997**, *34*, 93.



**Figura 4.1:**

**A:** Fotografía del dispositivo.

**B:** Imagen en rayos X.

**C:** dimensiones del dispositivo después de sinterizado:

**a, b, c** (entradas)= 4.1 mm de diámetro,

**d** (salida)= 4.1 mm de diámetro,

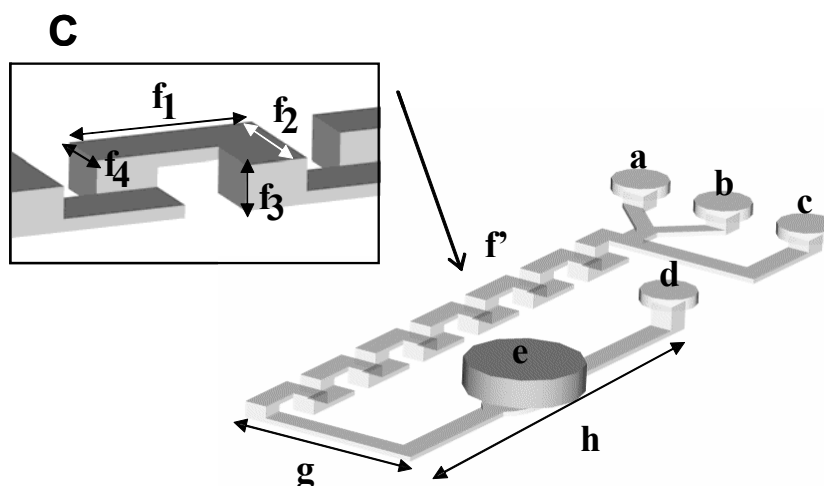
**e** (cavidad para el ESI)= 4.9 mm de diámetro,

**f'**= 12 bucles,

**g**= 13.6 mm, **h**= 34 mm,

**f<sub>1</sub>**= 5.1 mm, **f<sub>2</sub>**= 3.4 mm,

**f<sub>3</sub>**= 1.7 mm, **f<sub>4</sub>**= 0.6 mm.



Respecto al sistema de detección, inicialmente se intentó sinterizar el disco sensor conjuntamente con el dispositivo LTCC. Aunque la formación de una película de óxido de cobalto es necesaria para explicar el complicado mecanismo de respuesta del electrodo,<sup>6-9</sup> la gruesa capa de óxido formada debido a la presencia de aire en el horno durante el proceso de sinterización anulaba las propiedades sensoras del electrodo (figura 4.2). Finalmente, se optó por integrar el sensor después de haber sinterizado el dispositivo. Esta alternativa presentó como principal ventaja el poder reemplazar el sensor por otro nuevo cuando su funcionamiento empeoraba con el tiempo.

El conexionado del disco sensor con la electrónica de medida se realizó pegando, en la parte externa de este, una pequeña lámina de cobre.

<sup>6</sup> Chen, Z.; De Marco, R.; Alexander P.W. *Anal. Comm.* **1997**, *34*, 93.

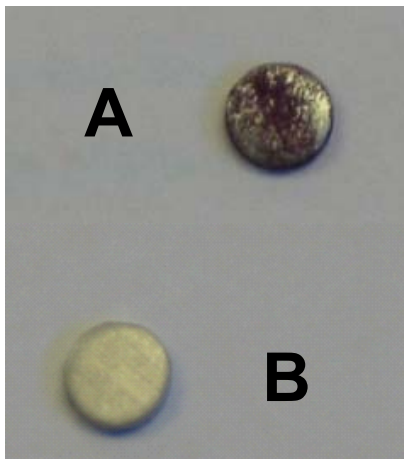
<sup>7</sup> De Marco, R.; Phan, C. *Talanta*, **2003**, *60*, 1215.

<sup>8</sup> Xiao, D.; Yuan, H.; Li, J.; Yu, R. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 288.

<sup>9</sup> Beer, P.D. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 71.



Para ello se utilizó una cola conductora de plata que se curó a 40°C durante 24h. Posteriormente, se soldó un cable conductor sobre la pista de cobre. El electrodo se insertó en la cavidad diseñada con esta finalidad y se fijó a ella mediante silicona.



**Figura 4.2:**  
A: disco de cobalto con capa de óxido. B: disco de cobalto normal.

#### 4.1.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Todos los microdispositivos que aparecen en este capítulo incorporan sistemas de detección potenciométricos. Los equipos instrumentales y accesorios utilizados para su caracterización y evaluación se relacionan en la siguiente tabla:

EQUIPO	CASA COMERCIAL
Bomba peristáltica Minipuls 3	Gilson (Wisconsin, USA)
Válvula inyectora de 6 vías	Hamilton MVP (Reno, USA)
Potenciómetro	TMI (Barcelona, España)
Electrodo de referencia 900200	Thermo (Whaltman, USA)
Tubos de silicona (d.i: 1.02 mm)	Ismatec (Zurich, Suiza)
Tubos de teflón (d.i.: 0.8 mm)	Scharlab (Cambridge, UK)

**Tabla 4.1:** Listado general de los equipos utilizados.

Para la evaluación del analizador DP1 se trabaja con dos series de patrones: una contiene sólo el analito y la otra incluye, además, diferentes fondos de iones interferentes. Todas las disoluciones se preparan por dilución a partir de una solución madre obtenida por pesada.

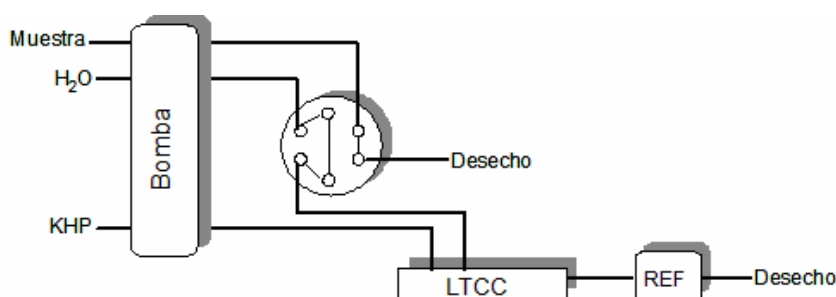
REACTIVO	CASA COMERCIAL
Cloruro de potasio	Fluka
Sulfato de potasio	Fluka
Nitrato de potasio	Fluka
Dihidrógenofosfato de potasio	Fluka
Hidrógenocarbonato de sodio	Fluka
Hidrógenoftalato de potasio	Fluka

**Tabla 4.2:** Reactivos utilizados en la evaluación del dispositivo DP1.

Como solución acondicionadora se utiliza hidrógenofalato potásico (KHP).

#### 4.1.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

El montaje experimental utilizado se muestra en la figura 4.3. Incorpora una válvula de 6 vías que, mediante un bucle de volumen determinado, permite inyectar los patrones de analito en el microsistema. El potencial de línea base se define con la disolución resultante de la mezcla del canal de KHP y agua. La muestra se inyecta en el canal de agua y se transporta hacia el detector donde genera una señal transitoria (pico). Tras el paso de la muestra, la señal retorna al potencial de línea base. Se trabaja con un sistema bicanal para evitar problemas ocasionados por un ajuste deficiente de la fuerza iónica.



**Figura 4.3:** Esquema del sistema de flujo empleado para la evaluación del dispositivo DP1.

#### 4.1.3 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA

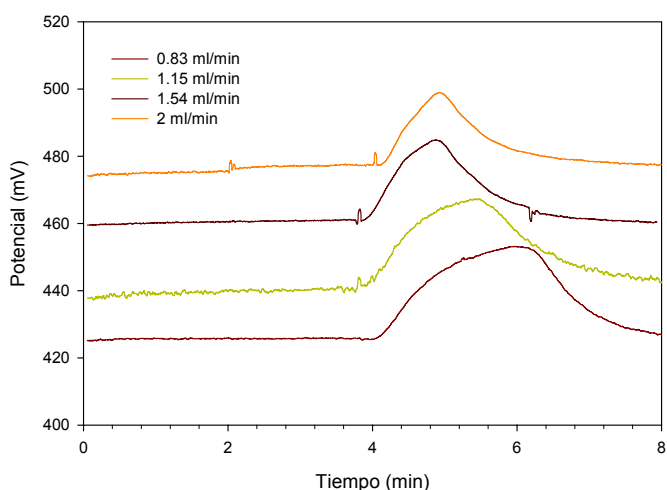
##### 4.1.3.1 Caudal

Para el estudio del efecto del caudal en la señal obtenida se utiliza una solución acondicionadora de KHP 0.05 M y se inyectan 1.5 ml de un patrón de 10 ppm de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (ver Figura 4.4). Se observa que a caudales bajos se obtiene una mayor altura de pico, hecho asociado al mayor tiempo de contacto entre la muestra y la placa de cobalto. No obstante, este mayor tiempo de contacto lleva asociado también un mayor tiempo de análisis. Como situación de compromiso, se decide trabajar con un caudal de 1.15 ml/min.

En la gráfica 4.4 también se puede observar el efecto provocado por el denominado potencial de corriente ( $E_s$ , *streaming potential*). Cuando los ESI se utilizan en sistemas de flujo continuo, al potencial medido por la celda electroquímica, constituida por el electrodo indicador y el de referencia, se le une el potencial de corriente. Cuando un fluido circula por un tubo, entre los dos extremos de éste aparece una diferencia de potencial cuya magnitud depende de diferentes factores de acuerdo con la siguiente expresión:

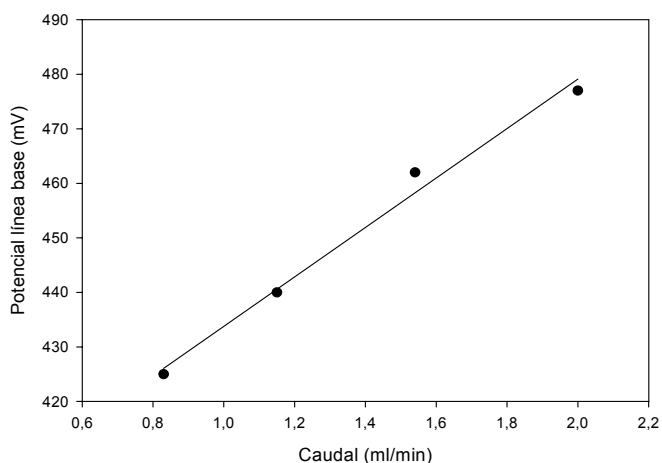
$$E_s = \frac{2dDl\zeta}{\pi^2 r^4 \lambda}$$

donde  $d$  es el caudal,  $D$  la constante dieléctrica,  $\zeta$  el potencial electrocinético,  $l$  la separación entre los dos puntos del tubo entre los que se mide  $E_s$  (en este caso entre el ESI y el electrodo de referencia),  $r$  el radio del tubo y  $\lambda$  la conductividad.<sup>10,11</sup> En la figura 4.4 se puede observar como, manteniendo todos los parámetros constantes, a medida que el flujo aumenta, aumenta  $E_s$  y, en consecuencia, el potencial de línea base registrado.



**Figura 4.4:**  
Evolución de los picos FIA obtenidos en función del caudal utilizado.

Representando el potencial de línea base obtenido para cada caudal se observa que existe, tal y como prevé la ecuación anterior, una relación lineal entre ambos ( $E = 388.42 + 45.35 \cdot \text{Caudal}$ ;  $r^2 = 0.9875$ ).



**Figura 4.5:**  
Relación lineal entre el potencial de corriente generado y el caudal.

Este fenómeno no representa ningún problema ya que, una vez fijado el caudal, el potencial de corriente se mantendrá constante. Sin embargo, hay otros factores en la expresión que pueden ser más difíciles de controlar.

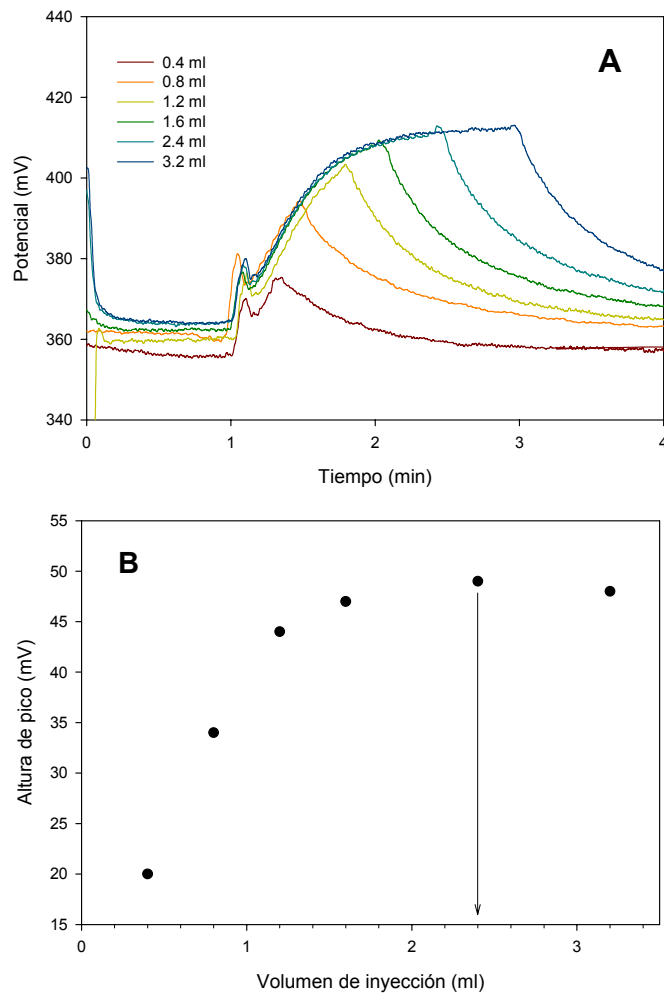
<sup>10</sup> Christopoulos, T.K.; Diamandis, E.P.; *Analyst* **1987**, *112*, 1293.

<sup>11</sup> Van den Winkel, P.; Mertens, J.; Massart, D.L.; *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 1765.

Así,  $E_s$  también depende de la conductividad de la disolución. Si las muestras inyectadas presentan fuerte variaciones en su contenido iónico es imprescindible que la disolución acondicionadora sea capaz de ajustar esta carga iónica después del punto de confluencia entre esta disolución y la muestra.

#### 4.1.3.2 Volumen de inyección

Para el estudio del efecto del volumen de inyección en la señal obtenida se inyecta un patrón de 10 ppm de  $H_2PO_4^-$ . En este caso se utiliza también una solución acondicionadora de KHP 0.05M y se fija el caudal en 1.15 ml/min.

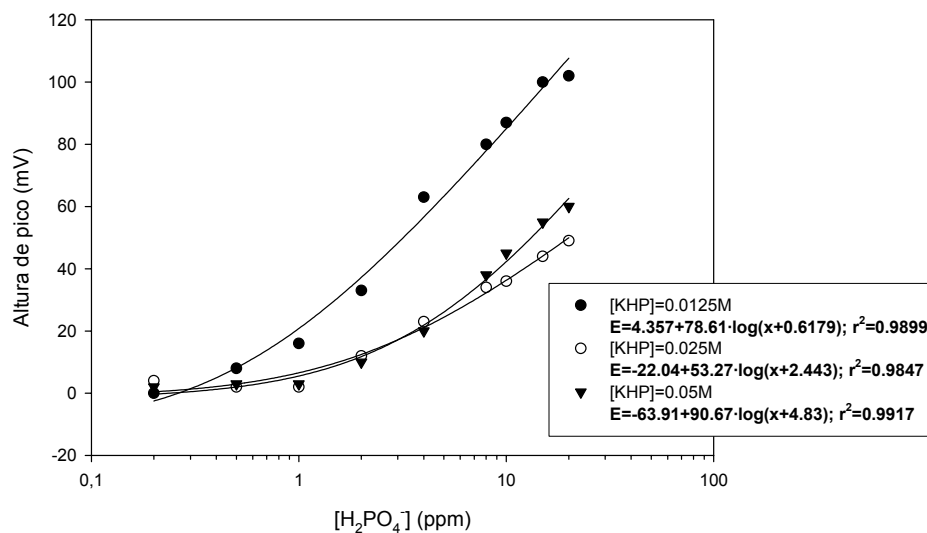


**Figuras 4.6:**  
**A:** registro de los picos FIA obtenidos.  
**B:** alturas de pico frente al volumen de inyección.

Se escoge un volumen de inyección de 2.4 ml ya que volúmenes superiores no implican un incremento importante en la altura de pico obtenida, pero sí un aumento considerable en el tiempo de análisis.

### 4.1.3.3 Concentración de la solución acondicionadora

Fijadas las variables hidrodinámicas del microsistema de flujo, se estudia el efecto de la variación de la concentración de KHP en la respuesta del electrodo (ver Figura 4.7):

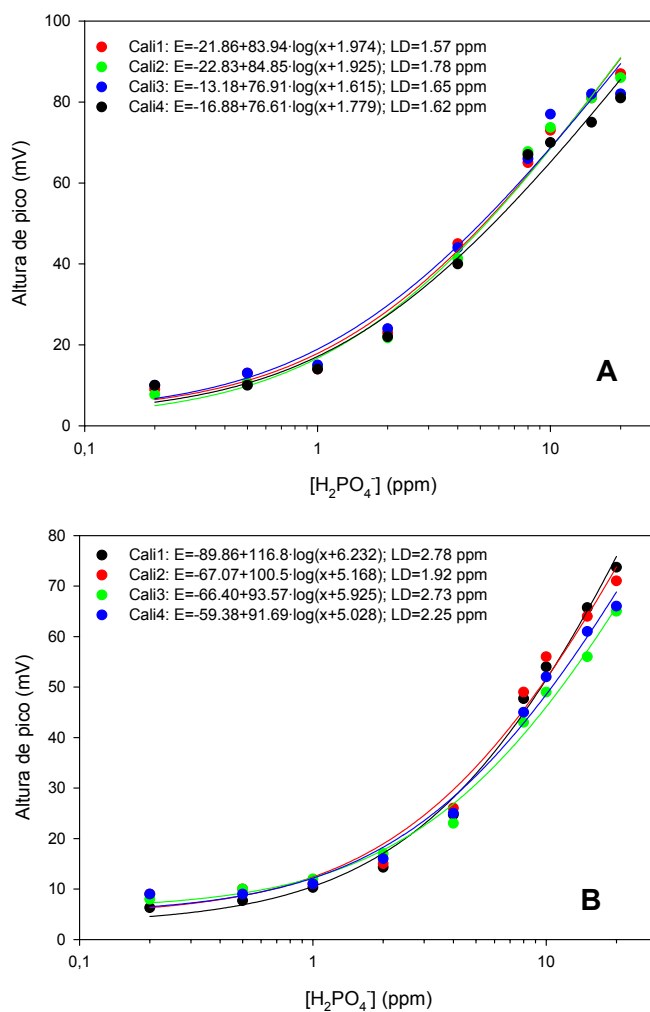


El ión hidrógenofталato es un interferente conocido de este electrodo. Efectuando un calibrado del sensor frente a este ión se obtiene una sensibilidad de unos 19 mV/déc,<sup>3</sup> aunque el límite de detección es muy alto. Dado que su presencia es imprescindible para que el sensor suministre una respuesta frente al ión  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  es necesario fijar un nivel de concentración que no comprometa la funcionalidad del sensor.

Se ensayan tres niveles de concentración de KHP como solución acondicionadora: 0.0125, 0.025 y 0.05 M (ver Figura 4.7). La recta de calibrado obtenida con la concentración de 0.0125 M presenta la mejor sensibilidad y límite de detección de todas las ensayadas, pero presenta un nivel de ruido que hace difícil la medida de las señales. Al incrementar el nivel de concentración de KHP disminuye considerablemente la altura de los picos, tal y como se puede observar en los calibrados correspondientes a las concentraciones de 0.025 y 0.05 M, y con ello aumenta el límite de detección. No obstante, para ambas disoluciones el ruido desaparece prácticamente. Para seleccionar la concentración más adecuada de las dos, se realizan calibrados repetidos con ambas. En las figuras 4.8 se ha realizado un ajuste de tipo no lineal, que sirve para definir la totalidad de las curvas y que parte de la ecuación general de Nikolskii-Eisenman:

$$E = A + B \cdot \log[a_x + c], \text{ donde } c = LD_{ap} + \sum K_{X,Y}^{pot} \cdot (a_Y)^{\frac{n_x}{n_Y}}$$

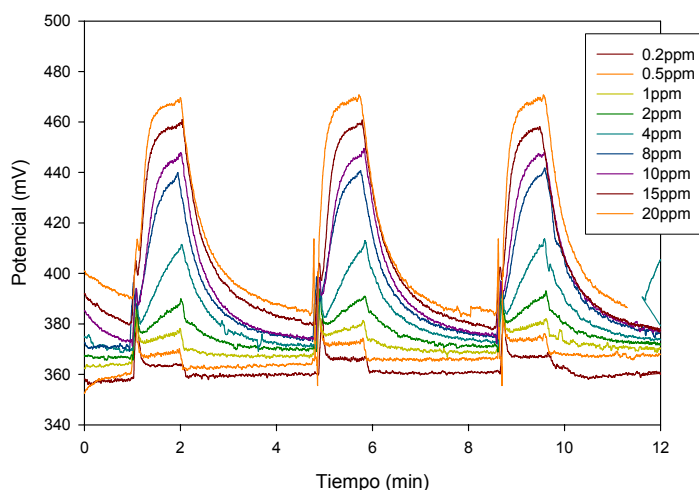
El límite de detección se calcula como la actividad correspondiente al punto de intersección entre la recta ajustada para la zona lineal y recta la horizontal (zona de respuesta constante), en la cual el potencial es independiente de la concentración del analito.<sup>12</sup> Así, cuando se utiliza  $[\text{KHP}]=0.025 \text{ M}$ , se obtiene una pendiente de  $73\pm 2 \text{ mV/déc}$  y un límite de detección de  $1.8\pm 0.3 \text{ ppm}$  ( $n=4$ , 95%) y en el caso de  $[\text{KHP}]=0.05 \text{ M}$ , una pendiente de  $62\pm 5 \text{ mV/déc}$  y un límite de detección de  $2\pm 1 \text{ ppm}$  ( $n=4$ , 95%). Para obtener las pendientes de las rectas de calibrado en la zona lineal se ha introducido como restricción:  $r^2 > 0.995$ .



Utilizando patrones puros, la solución de KHP 0.025 M suministra límites de detección ligeramente mejores. En la figura 4.9 se muestra el registro de los picos FIA obtenidos durante calibrados sucesivos observándose la excelente repetitividad de los resultados.

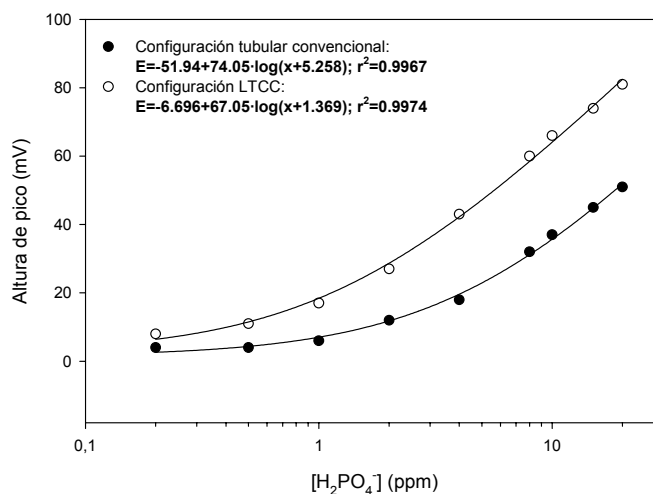
<sup>12</sup> I.U.P.A.C., Compendium of analytical nomenclature, Definitive rules, 1997. Oxford, Pergamon Press (1997), cap. 8.

**Figura 4.9:**  
Registro de un calibrado por triplicado obtenido con las condiciones experimentales optimizadas y patrones puros.



Los resultados del microsistema se comparan con los obtenidos utilizando un electrodo de cobalto de configuración tubular integrado en un sistema de flujo convencional (ver figura 4.10). Como puede observarse, la integración del sensor de forma tangencial al flujo suministra mejores resultados especialmente en relación al límite de detección.

**Figura 4.10:**  
Comparativa de dos calibrados obtenidos con la configuración tubular convencional y el electrodo integrado en el dispositivo LTCC.



Para estudiar la estabilidad y reproducibilidad del sistema se realizan 8 calibrados a lo largo de 19 días obteniéndose los siguientes resultados (intervalo de confianza 95%):

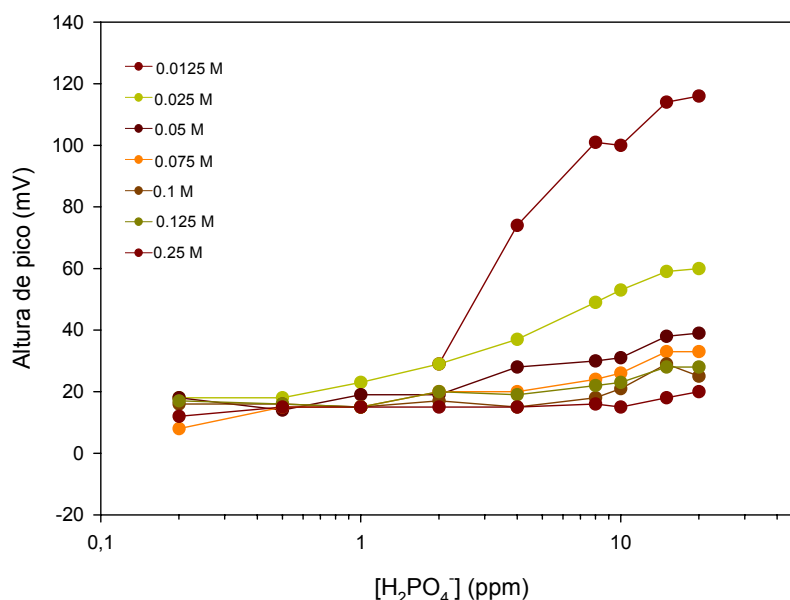
Ajuste no lineal:  $E = -5(\pm 8) + 73(\pm 11) \cdot \log[X + 0.9(\pm 0.3)]$   
 Ajuste lineal (rango lineal 2-20 ppm):  $E = 9(\pm 5) + 63(\pm 9) \cdot \log X$   
 Límite de detección de  $0.8(\pm 0.1)$  ppm

#### 4.1.3.4 Efecto de las interferencias

Para conocer la aplicabilidad práctica de estos sistemas en muestras reales, se ha de tener en cuenta el efecto de potenciales iones interferentes.

En este caso se trabaja con patrones que incorporan un fondo de iones interferentes correspondientes al nivel de concentración en que se encuentran en el agua del río Llobregat: 15 ppm  $\text{NO}_3^-$ , 400 ppm  $\text{Cl}^-$ , 100 ppm  $\text{SO}_4^{2-}$  y 250 ppm  $\text{HCO}_3^-$ . Este fondo varía sustancialmente la fuerza iónica de los nuevos patrones, además de modificar el pH debido a la presencia de  $\text{HCO}_3^-$ . Por este motivo, es necesario volver a optimizar la concentración de KHP. Se observa que cuando se utilizan concentraciones inferiores o iguales a 0.0125 M, no se produce un óptimo ajuste de la fuerza iónica y se observa la aparición de una señal negativa previa al pico analítico. También se evalúa el uso de concentraciones de KHP superiores a 0.05 M, pero en estos casos, el límite de detección obtenido se encuentra cercano a 7 ppm, por lo que se descarta trabajar a estos niveles de concentración.

**Figura 4.11:** Calibrados obtenidos al variar la concentración de KHP. Patrones con interferencias tipo Llobregat. En el caso de  $[\text{KHP}] = 0.0125\text{M}$ , no se pudieron cuantificar los picos correspondientes a concentraciones inferiores a 4 ppm.



Una vez más, se escoge como óptima la concentración de KHP de 0.025 M y se realizan estudios de repetitividad durante 7 días. Para garantizar el ajuste del pH de las muestras, se trabaja con diferentes caudales: 1.54 ml/min para la solución de KHP y 1.2 ml/min para la muestra. Los resultados obtenidos son los siguientes (95% confianza):

$$\text{Ajuste no lineal: } E = -2(\pm 13) + 55(\pm 12) \cdot \log[X + 2(\pm 1)]$$

$$\text{Ajuste lineal (rango lineal 2-20 ppm): } E = 20(\pm 3) + 38(\pm 6) \cdot \log X$$

$$\text{Límite de detección de } 1.2(\pm 0.3) \text{ ppm}$$

Tal y como era previsible, en presencia de interferencias, el límite de detección obtenido es ligeramente superior al obtenido con patrones puros.



#### 4.1.4 CONCLUSIONES

La integración de electrodos selectivos a iones del tipo sólido cristalino homogéneo, mediante su inserción en una cavidad especialmente diseñada para ello presenta ciertas ventajas. Por ejemplo su fácil sustitución cuando las características de respuesta del sensor disminuyen. Además, la configuración tangencial de la celda de medida parece incrementar la respuesta del sensor a bajas concentraciones, mejorando el límite de detección respecto a la configuración tubular convencional. Aunque una de las principales ventajas de la tecnología LTCC es la posibilidad de integrar monolíticamente en el seno del material cerámico diferentes componentes, en este caso, la oxidación de la placa metálica de cobalto durante la sinterización lo hace inviable, tal y como se explicó en el apartado §4.1.

#### 4.2 Analizador de ión cloruro con mezclador serpentina (DP2)

Nuevamente, el punto de partida para el diseño de este dispositivo es un analizador convencional que mide simultáneamente iones nitrato y cloruro (ver también apartado §4.6), desarrollado en nuestro grupo de investigación y comercializado como AquaNitra<sup>®</sup>.<sup>13</sup> En él, la determinación de ión cloruro se realiza mediante un electrodo selectivo constituido por un disco vitrificado de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{AgCl}$ ,<sup>14</sup> obtenido a alta presión a partir de una mezcla equimolar de ambos sólidos.

**Figura 4.12:**

Efecto del proceso de sinterización sobre un disco de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{AgCl}$  pegado a una pista conductora de Ag serigrafiada sobre una lámina de LTCC. Se observa el óxido formado en la superficie de la membrana sensora.



De manera análoga al caso anterior, se utiliza el dispositivo DP1 y, como primera aproximación, se evalúa también la sinterización conjunta del dispositivo y el electrodo. Sin embargo, tal y como se observa en la figura 4.12, el proceso de sinterización provoca nuevamente la oxidación del disco sensor, lo que hace desaparecer la respuesta potenciométrica.

<sup>13</sup> Barquero Cáceres, E. J. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, **2001**.

<sup>14</sup> Lima, J.L.F.C.; Rocha, L.S.M. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1990**, *38*, 127.

Por este motivo, se decide integrar el electrodo después del proceso de sinterización. Se sigue la misma estrategia que en el dispositivo anterior y se utiliza una la placa de cobre como conductor intermedio entre el cable y el disco.

#### 4.2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

A parte de los equipos descritos en la tabla 4.1, los reactivos utilizados en este subapartado se recogen en la siguiente tabla:

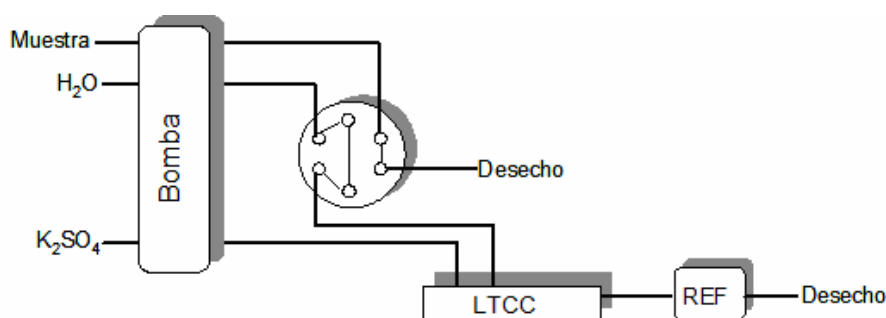
REACTIVO	CASA COMERCIAL
Cloruro de potasio	Fluka
Sulfato de potasio	Fluka
Nitrato de potasio	Fluka
Dihidrógenofosfato de potasio	Fluka
Hidrógenocarbonato de sodio	Fluka

Tabla 4.3: Reactivos utilizados en la evaluación del dispositivo DP2.

#### 4.2.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

El montaje es similar al empleado en la evaluación del dispositivo DP1:

Figura 4.13:  
Esquema del sistema de flujo empleado para la evaluación del dispositivo DP2.



#### 4.2.3 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA

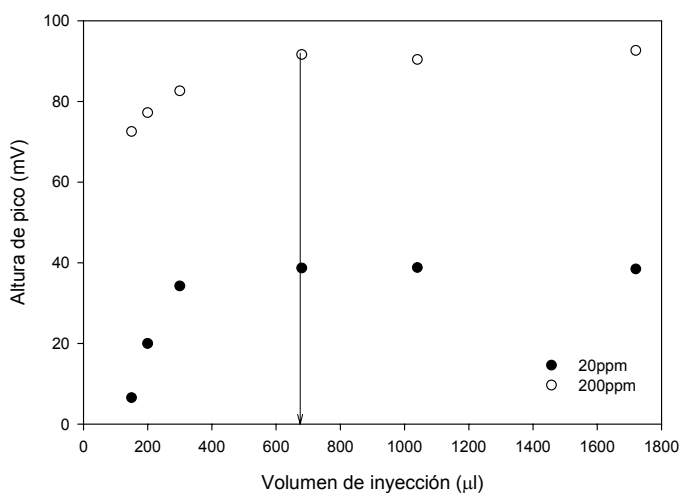
En este apartado, para la discusión de los resultados, se seguirá el mismo orden utilizado en el caso del anterior dispositivo.<sup>15</sup> Para observar el efecto de las variables estudiadas a bajas y altas concentraciones se analizan dos patrones de cloruros de concentraciones diferentes (20 y 200 ppm).

##### 4.2.3.1 Volumen de inyección

En la optimización de esta variable se utiliza  $K_2SO_4$  0.1 M como solución transportadora y se escoge un caudal arbitrario de 1.5 ml/min.

<sup>15</sup> Ibañez-García, N.; Machado Gonçalves, R.D.; Mendes da Rocha, Z.; Góngora-Rubio, M.R.; Seabra, A.C.; Alonso Chamarro, J. *Sens. Actuator B-Chem.*, **2006**, *118*, 67.

**Figura 4.14:**  
Optimización del volumen de inyección para dos concentraciones de analito.

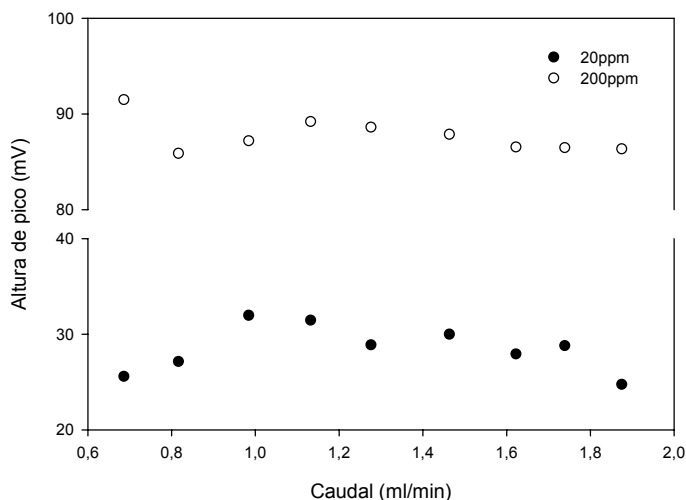


Como punto de compromiso entre una altura de pico adecuada y una frecuencia de análisis alta, se escoge un volumen de inyección de 680 µl como valor óptimo. Volúmenes mayores a éste, no comportan un aumento significativo de la señal, por la saturación del electrodo.

#### 4.2.3.2 Caudal

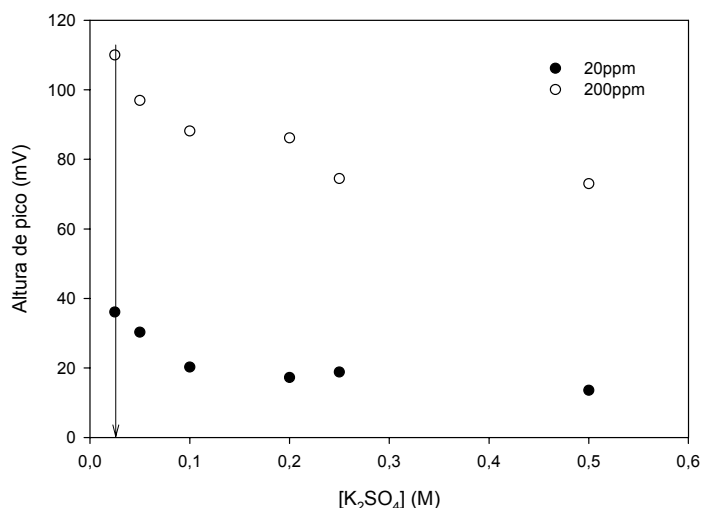
La optimización del caudal se realiza con el anterior volumen de inyección. La variación del caudal apenas afecta en la altura del pico. Sin embargo, se escoge un caudal de 1.13 ml/min ya que concentraciones de cloruro inferiores a 5 ppm son difíciles de detectar a caudales superiores. La menor velocidad de respuesta del electrodo a bajas concentraciones junto con el menor tiempo de contacto entre la muestra y la membrana provoca este efecto. Los resultados del ensayo se muestran en la figura 4.15:

**Figura 4.15:**  
Efecto del caudal en las alturas de pico de los dos patrones de cloruros.



#### 4.2.3.3 Concentración de la solución acondicionadora

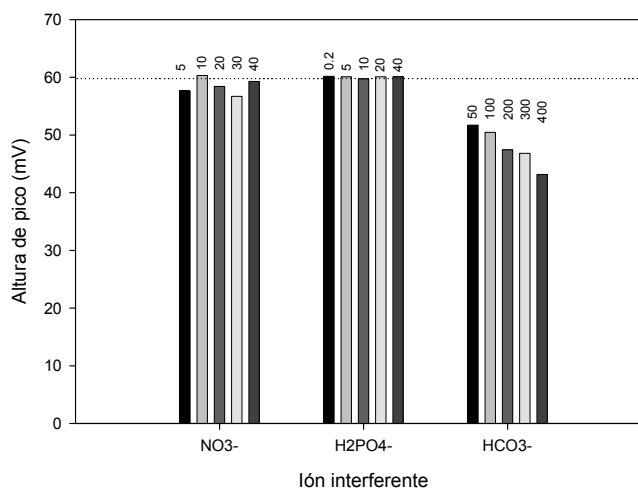
El efecto de la solución acondicionadora fue estudiado con patrones puros en ausencia de iones interferentes. Los resultados obtenidos señalan que las mayores alturas de pico se obtienen cuando se trabajaba con la concentración de  $K_2SO_4$  más baja (0.025 M). Aunque es poco interferente, el anión  $SO_4^{2-}$  hace disminuir ligeramente la altura de pico obtenida, especialmente cuando se trabaja a concentraciones elevadas. Los resultados se muestran en la gráfica 4.16.



**Figura 4.16:**  
Efecto de la concentración de  $K_2SO_4$  en la respuesta del electrodo.

#### 4.2.3.4 Efecto de las interferencias

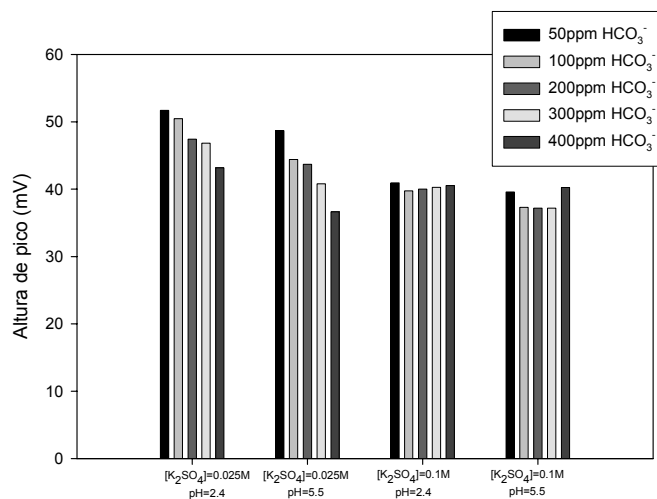
Se estudia el efecto que algunos iones ejercen sobre la respuesta del electrodo. Para ello, se preparan patrones que contienen un fondo fijo de 50 ppm de  $Cl^-$  al cual se le añaden diferentes concentraciones de ión interferente: 5-40 ppm  $NO_3^-$ , 0.2-40 ppm  $H_2PO_4^-$  y 50-400 ppm  $HCO_3^-$ . En la gráfica 4.17, la línea punteada corresponde al potencial que proporciona un patrón de 50 ppm de  $Cl^-$  sin interferentes. El valor obtenido ( $n=7$ , 95%) es de  $59.7 \pm 0.8$  mV.



**Figura 4.17:**  
Efecto de varias concentraciones de iones interferentes sobre la respuesta del electrodo. Condiciones empleadas: volumen de inyección de 680  $\mu$ l,  $[K_2SO_4]=0.025$  M y caudal de 1.13 ml/min

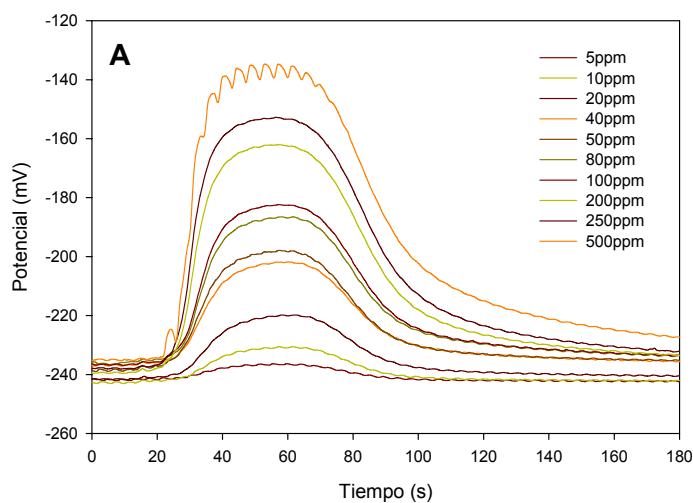
Tan sólo el ión hidrógenocarbonato ( $pka_1=6.35$ ,  $pka_2=10.33$ ) crea una interferencia significativa en la respuesta del electrodo, debido a las variaciones de pH asociadas al cambio en su concentración. Para evitar este fenómeno, se realiza una nueva optimización de la composición de la solución acondicionadora teniendo en cuenta, tanto la concentración de  $K_2SO_4$  como el pH de ésta.

**Figura 4.18:**  
Efecto de la variación de la concentración de  $K_2SO_4$  de la solución acondicionadora y de su pH sobre la respuesta del electrodo al analizar patrones de 50 ppm de  $Cl^-$  con diferentes concentraciones de  $HCO_3^-$ .



A pesar de que un incremento en la concentración de  $K_2SO_4$  implica una disminución en las alturas de pico obtenidas, conviene trabajar con un valor de 0.1 M porqué evita las diferencias ocasionadas por la concentración de  $HCO_3^-$  presente en el medio. Se escoge además tamponar a un valor de pH de 2.4 para asegurar que la mayor parte de  $HCO_3^-$  se encuentre en forma de  $H_2CO_3$ .

Con estas condiciones experimentales optimizadas, se realizan calibrados periódicos tales como los que aparecen en las siguientes figuras:



**Figuras 4.19:**

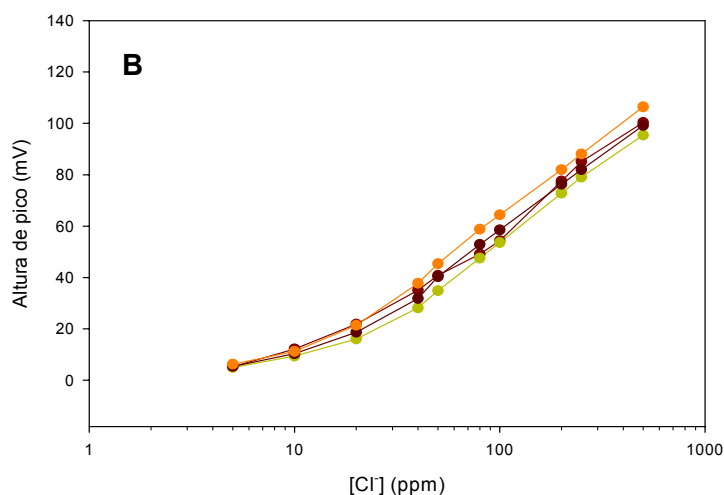
**A:** Picos FIA obtenidos durante un proceso de calibración.

**B:** Secuencia de calibrados.

[K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]=0.1 M; pH=2.4

V<sub>iny</sub>=680 µl;

Caudal=1.13 ml/min



Algunas de las características analíticas destacables son (para n=4, 95%): pendiente =  $59 \pm 2$  mV/déc ( $r^2 > 0.99$ ); límite de detección =  $6 \pm 3$  ppm. Para un patrón de 50 ppm de Cl<sup>-</sup> (n=7, 95%) se obtuvo una RSD de 1.44%.

#### 4.2.3.5 Análisis de muestras reales

Para comprobar la aplicabilidad del sistema, se analizan 6 tipos de aguas minerales embotelladas (con y sin gas). Las muestras que contenían gas se pretrataron en un baño de ultrasonidos durante 60 minutos para eliminar el ácido carbónico. Se analizan las muestras que aparecen en la tabla 4.4 (el contenido nominal es el declarado por la empresa propietaria).

Las muestras se analizan por triplicado y los resultados se comparan con los obtenidos mediante electroforesis capilar (EC), tal y como se muestra en la tabla 4.4. Ni la prueba t por parejas ( $t_{\text{calc}} = 1.065 < t_{\text{tab}} = 2.571$ ), ni la regresión lineal de ambos métodos (ordenada al origen =  $3 \pm 3$ ; pendiente =  $0.99 \pm 0.01$ ;  $r^2 = 0.9999$ ) muestran diferencias significativas entre los resultados obtenidos por el dispositivo LTCC y el método de comparación.

MARCA	[Cl <sup>-</sup> ] (ppm)			[HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] nominal (ppm)
	Nominal	LTCC (n=3, 95%)	EC	
Fontvella	6.9	16±2	12	135
Fonter	12.7	11.5±0.8	7	107
Font Agudes	17.2	17±2	14	252.2
Perrier	23	26±2	22.8	420
Primavera	39.7	31.2±0.8	33.2	295.3
Vichy	584	599±70	603	2081

**Tabla 4.4:** Muestras de agua analizadas y contenido en cloruros e hidrógenocarbonato declarado.

#### 4.2.4 CONCLUSIONES

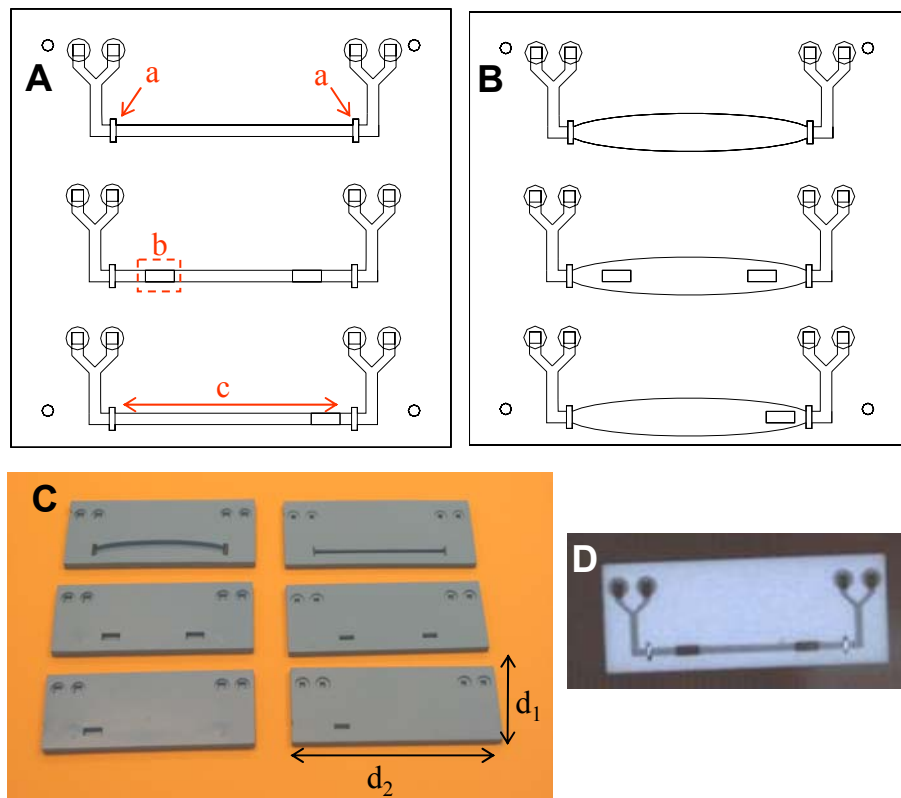
Al igual que sucediera con el dispositivo DP1, el electrodo selectivo a iones no pudo ser integrado durante el proceso de sinterización porque la oxidación de su superficie anulaba sus propiedades sensoras. Sin embargo, el carácter modular del sistema permitió el recambio del electrodo cuando su funcionamiento no fue el óptimo.

Como en el caso anterior, se ha podido comprobar la efectividad del mezclador pasivo en forma de serpentina tridimensional para conseguir una perfecta mezcla entre reactivos. En este dispositivo, ha permitido ajustar la fuerza iónica y el pH de las muestras evitando así anomalías en la forma del pico.

### 4.3 Analizador de ión fosfato con etapa de preconcentración (DP3)

Una de las etapas críticas del procedimiento analítico es la relacionada con el tratamiento previo de muestra antes de la medida. Una de las operaciones unitarias que podríamos agrupar dentro del concepto de pretratamiento es la preconcentración sobre material absorbente para mejorar el límite de detección del sistema de detección o eliminar interferencias de matriz. El presente apartado tiene como objetivo principal demostrar la viabilidad de integrar monolíticamente este tipo de pretratamiento en estructuras de microfluídica fabricadas con la tecnología LTCC.

**Figuras 4.20:**  
**A y B:** capas CAD superpuestas. La diferencia entre los dos tipos de dispositivos se encuentra en la forma de la cavidad donde se introduce la resina preconcentradora.  
**a:** cavidades donde se introduce la rejilla metálica verticalmente;  
**b:** uno de los puntos de carga de la resina;  
**c:** columna preconcentradora.  
**C:** fotografías de los dispositivos construidos:  $d_1=2\text{ cm}$ ;  $d_2=5.3\text{ cm}$ .  
**D:** imagen en rayos X.

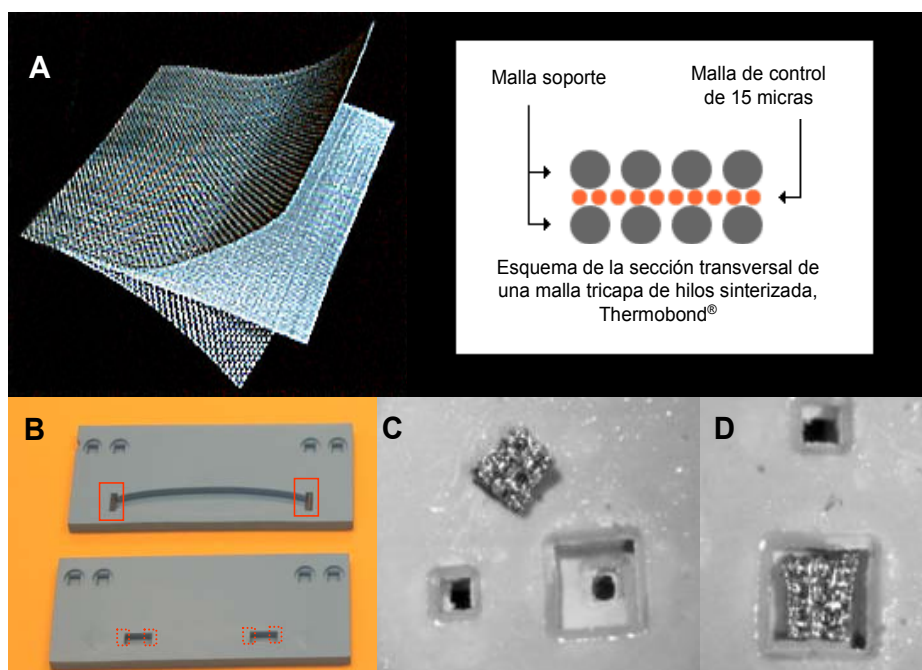


En la figura 4.20 se muestran los diferentes dispositivos cerámicos contruidos con este fin. Con ellos se pretende resolver las demandas de este tipo de pretratamiento que presentan algunos de los analizadores convencionales.

Con la finalidad de confinar la resina dentro de su compartimiento, se emplearon unas rejillas de acero sinterizado denominas Thermobond® MIC15T3 de área 1.5x3 cm (ver Figura 4.21). Estos filtros contienen una malla de control de 15 micras de diámetro de poro. El material, que puede soportar temperaturas de más de 900°C, podía ser sinterizado conjuntamente con el resto de cerámica.

**Figura 4.21:**

**A:** rejilla de acero sinterizado y esquema de la sección transversal.  
**B:** dispositivos cerámicos que integran una cavidad para insertar una resina de intercambio iónico. En rojo, las zonas donde se ha integrado la rejilla.  
**C:** cavidad donde la rejilla ha de ser insertada (cerámicas en estado verde).  
**D:** rejilla insertada.



Cuando se inserta un material rígido en una cavidad interna de un dispositivo cerámico se ha de tener en cuenta, durante la fase del diseño, el encogimiento que sufre la cerámica en el proceso de sinterización. Para asegurar que el material quedará perfectamente sellado por la cerámica, se puede utilizar, además, una pasta de vidrio (Dupont Q9615) que se coloca alrededor del elemento no cerámico. Durante la sinterización, el vidrio encapsula el material en la cerámica y ayuda a evitar posibles problemas de pérdidas de líquidos. En la figura 4.21C y 4.21D se puede observar cómo la cavidad donde se aloja la rejilla es ligeramente superior al área del metal. En la zona entre la rejilla y la cerámica se coloca la pasta de vidrio. Se evaluaron diferentes configuraciones tanto de cavidades contenedoras de resina como de aperturas para la carga de ésta (figuras 4.19A y 4.19B).

La resina seca se introdujo en la cavidad después de haber sinterizado el dispositivo.



En alguno de los prototipos se utilizó una tapa transparente para el sellado, de modo que la cavidad quedara visible. En otros se realizaron pequeñas aperturas en la superficie de la última capa de cerámica, marcadas como *b* en la figura 4.19A, para facilitar el llenado de la cavidad. Todas las aperturas, independientemente de su área, se sellaron con un área equivalente de Mylar<sup>®</sup> que se unió a la superficie de la cerámica mediante cola epoxy. Esto facilitó la recarga de la cavidad.

#### 4.3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

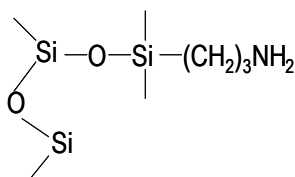
A parte de los equipos descritos en la tabla 4.1, para la evaluación de este dispositivo, en particular, se utilizan los reactivos especificados en la tabla 4.5. Los patrones se preparan por pesada, disolución y dilución de sus correspondientes sales.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Nitrato de potasio	Merck
Hidrógenocarbonato de sodio	Panreac
Dihidrógenofosfato de potasio	Fluka
Sulfato de potasio	Fluka
Cloruro de potasio	Merck
Hidrógenoftalato de potasio	Panreac
Lichrolut-NH <sub>2</sub> <sup>®</sup>	Merck

**Tabla 4.5:** Reactivos utilizados en la evaluación del dispositivo DP3.

En la evaluación del dispositivo se utilizan patrones mixtos, que contienen a parte del analito (ortofosfato), un fondo de iones interferentes. En concreto, el fondo incorpora iones presentes en el agua del río Ter al nivel de concentración normal: 10 ppm de nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 80 ppm de cloruros (Cl<sup>-</sup>), 80 ppm de sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) y 110 ppm de hidrógenocarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La concentración de analito es variable.

La resina utilizada, Lichrolut-NH<sub>2</sub><sup>®</sup> (Merck), fue evaluada previamente en nuestro grupo de investigación.<sup>3,4</sup> Se presenta en forma de perlas de color blanco de diámetro comprendido entre 40 y 63 μm. Tiene una capacidad nominal de 0.6 meq/g. Se trata de una resina de intercambio aniónico débil, donde el grupo funcional es un grupo aminopropil (amina primaria) unido covalentemente a la superficie de una partícula de sílice (ver Figura 4.22). Su grado de ionización depende fuertemente del pH.



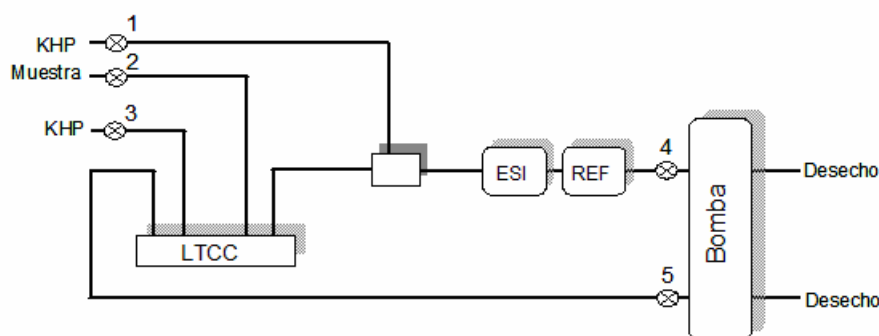
**Figura 4.22:** Grupo funcional de la resina Lichrolut-NH<sub>2</sub><sup>®</sup>.

El pKa de la amina primaria se encuentra alrededor de 9.8. Para dotar al material de propiedades intercambiadoras, es necesario que la muestra se encuentre, por lo menos, 2 unidades de pH por debajo del pKa, para conseguir la máxima protonación de los grupos funcionales básicos de la resina.<sup>16,17</sup> En consecuencia, las resinas básicas débiles presentan su capacidad máxima de intercambio a un pH alrededor de 7.0.<sup>18</sup>

### 4.3.2 Montaje experimental

La figura 4.23 muestra el montaje experimental empleado para la evaluación del dispositivo.

**Figura 4.23:** Esquema del sistema de flujo empleado para la evaluación del dispositivo DP3. En números, las válvulas solenoides.



En esta ocasión, a diferencia de lo que suele ser habitual, los líquidos se impulsan a través del circuito hidráulico por aspiración utilizando una bomba peristáltica. La activación de las válvulas solenoides determina el orden del flujo.

En este dispositivo, el sistema de detección no está integrado en el cuerpo cerámico. El disco sensor (un disco de cobalto de 1 mm de grosor y 5 mm de diámetro, de Goodfellow) se inserta en un cuerpo cilíndrico de metacrilato, agujereado axialmente en un punto central del cilindro. Por dicho agujero se introduce el conector eléctrico que se pega al disco sensor mediante una pasta conductora de plata (EPO-Tek E410, Epoxy Technology, Inc.). Se deja curar durante 24 horas a 40°C. Finalmente, para aislar el disco sensor, se recubren ambas caras con resina epoxy y se dejan 24 horas más en la estufa. El último paso consiste en agujerear el electrodo y el cilindro longitudinalmente con una broca de 1 mm, definiendo así una configuración tubular a través de la cual pasa el fluido (figura 4.24).

Cuando el electrodo de referencia no está integrado en el propio dispositivo LTCC, como en este caso, se usa un electrodo de referencia de doble unión (DJRE, *Double Junction Reference Electrode*) de la casa comercial Thermo (modelo 900200).

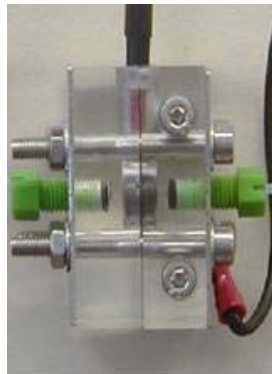
<sup>16</sup> Mckelvie, I.D.; Peat, D.M.W.; Worsfold, P.J. *Analytical Proceedings Including Analytical Communications*, **1995**, 32, 437.

<sup>17</sup> Standard Methods. 4500-P Phosphorus. 1995

<sup>18</sup> <http://www.remco.com> (Febrero 2007)

Al igual que el resto de los dispositivos con sistema de detección potenciométrico, la adquisición de señales se lleva a cabo mediante un potenciómetro con software de adquisición y registro de datos (fabricado por TMI, Barcelona).

**Figura 4.24:**  
Configuración del electrodo tubular en una celda de metacrilato. Se pueden observar la entrada y salida de líquido (conectores verdes).



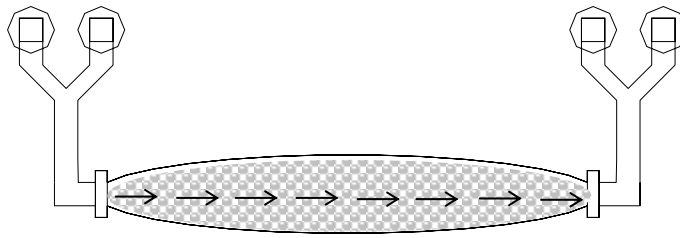
Con la finalidad de minimizar la compactación de la resina, se trabaja a contracorriente. Es decir, preconcentración y elución se realizan con direcciones de flujo de líquido contrapuestas. La muestra entra en el dispositivo abriendo las válvulas 2 y 5. Al mismo tiempo se lleva a cabo la estabilización de la línea base del electrodo selectivo a iones mediante un flujo de solución portadora, que actúa también como eluyente (KHP),<sup>3</sup> mediante la apertura de las válvulas 1 y 4. Cuando el volumen de muestra deseado ya ha sido preconcentrado, se cierran las válvulas 2 y 5 y se abre 3 para eluir el contenido de la resina en sentido opuesto. El flujo sigue obligatoriamente la dirección que marca la válvula 4, es decir, se mezcla con KHP en la pieza de metacrilato en forma de T y luego pasa por los electrodos selectivos a iones y de referencia. Para realizar algunas etapas de limpieza, se sustituye la muestra por agua.

### **4.3.3 EVALUACIÓN DE LA ETAPA DE PRECONCENTRACIÓN**

#### **4.3.3.1 Efecto de la configuración del dispositivo**

Tal y como se ha explicado en el apartado §4.3, se construyeron 6 tipos de dispositivos, la mitad con la cavidad de forma recta y la otra mitad de forma abombada. Así mismo, para observar el comportamiento de las partículas de resina durante su confinamiento, en dos de los dispositivos se colocaron tapas transparentes que dejaban totalmente visible tanto la cavidad como las rejillas metálicas (ver Figura 4.20). A pesar de ser éstas las configuraciones que permiten la introducción de la resina en seco más fácilmente, resultan problemáticas ya que parte del material se pierde a través de la zona de contacto rejilla-Mylar® (recordar que se utilizaba este polímero u otro similar para sellar la cavidad). Además se observa que la geometría de la columna abombada no facilita el paso del flujo por toda su área sino que éste penetra por la zona central, generando un camino preferente y dejando gran parte de la resina sin interactuar, tal y como se esquematiza en la figura 4.25:

**Figura 4.25:**  
Creación de un camino preferente al pasar el flujo a través de la resina.



Por este motivo, se opta por la configuración de cavidad recta. Respecto al número y posición de las entradas de resina, se escoge el dispositivo que tiene una sola entrada porque resulta suficientemente cómoda para introducir el material intercambiador y sólo es necesario sellar una apertura después.

#### 4.3.3.2 Evaluación del material preconcentrador

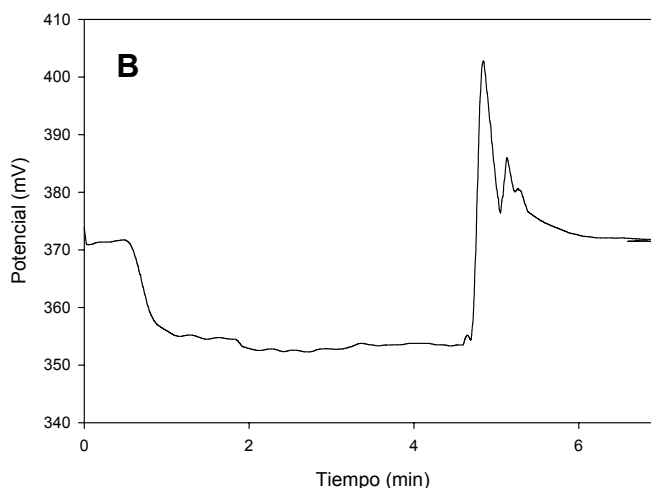
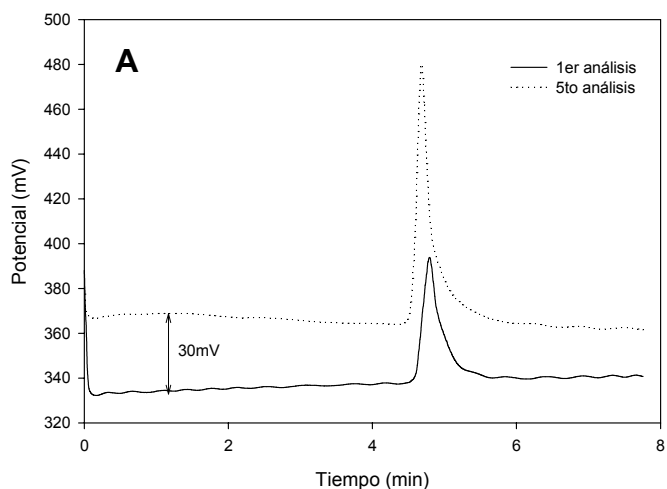
El objetivo fundamental de la evaluación es demostrar la viabilidad de incorporar material preconcentrador en este tipo de dispositivos asegurando su confinamiento estable en la cavidad diseñada.

Para conocer la cantidad de resina utilizada, se tara el dispositivo y se vuelve a pesar después de haber introducido el material. La cantidad promedio utilizada es de  $38 \pm 3$  mg ( $n=7$ , 95% confianza).

Para evitar la obturación de los filtros metálicos, la resina se tamiza con un cedazo de  $50 \mu\text{m}$ , despreciando aquellas partículas de diámetro inferior. Se comprueba que el uso de cantidades de resina superiores a 40 mg provoca problemas de sobrepresión ya que la resina seca, después de entrar en contacto con líquido se hincha, pudiendo dificultar el paso de flujo a través suyo.

La sobrepresión parece ser la responsable de diferentes alteraciones observadas en la señal obtenida y que se muestran en las figuras 4.26A y 4.26B. Los efectos más significativos son los siguientes:

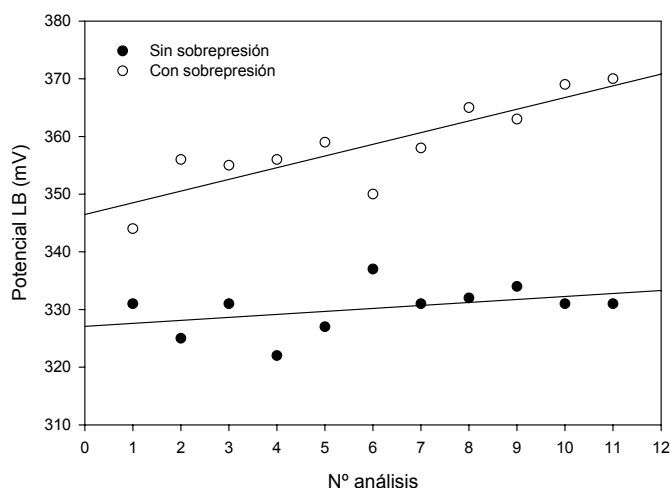
- deriva creciente de la línea base (figura 4.26A),
- irrepetitividad de los picos (figura 4.26A),
- no recuperación de la línea base después de un pico (figura 4.26B),
- aparición de dobles picos (figura 4.26B).



**Figuras 4.26:** Registros obtenidos para un patrón de fosfatos de 0.2 ppm con interferencias:  
**A:** Variación en la altura y la línea base.  
**B:** Aparición de dobles picos y no recuperación de la línea base.

En la figura 4.27 se muestra la evolución de la línea base a lo largo de una serie de análisis, durante un período aproximado de 3 horas y media. La sobrepresión se genera expresamente introduciendo una cantidad de resina superior a 40 mg. Para el sistema sin sobrepresión se obtiene un potencial de línea base de  $330 \pm 2$  mV con una RSD del 1.25%. En el sistema con sobrepresión, el valor de potencial es de  $359 \pm 5$  mV con una RSD de 2.18%. Para evitar problemas asociados a la compactación del material intercambiador, se pueden seguir tres estrategias: a) no utilizar una cantidad de resina superior a los 35 mg; b) introducir el dispositivo en un baño de ultrasonidos al observar alguna de las anomalías previamente explicadas; y c) realizar secuencias de descompactación, es decir, varios ciclos consecutivos de cambio de sentido en el flujo.

**Figura 4.27:**  
Evolución de la línea base a lo largo de 11 análisis en un sistema con y sin sobrepresión.



#### 4.3.3.3 Secuencia de análisis

El objetivo de la optimización de la secuencia de análisis es fijar un conjunto de variables operacionales que permitan alcanzar un límite de detección inferior al obtenido con el electrodo selectivo a ión fosfato (ver Figura 4.10) y en todo caso del orden de 0.1 ppm o inferior. Este límite de detección permitiría garantizar la detección en su inicio más temprano del proceso de eutrofización.

La secuencia inicial de análisis, a partir de la cual se realizan modificaciones sucesivas, se basa en las condiciones experimentales optimizadas para el equipo Aquafos<sup>®</sup>, que se resumen en la siguiente tabla (todos los pasos en contracorriente para evitar compactaciones):

SECUENCIA 1	
ORDEN	TIEMPO (min)
Limpieza de la resina con H <sub>2</sub> O	2
Preconcentración de muestra	3
Elución con KHP 0.07 M	3
Regeneración de la resina con H <sub>2</sub> O	1

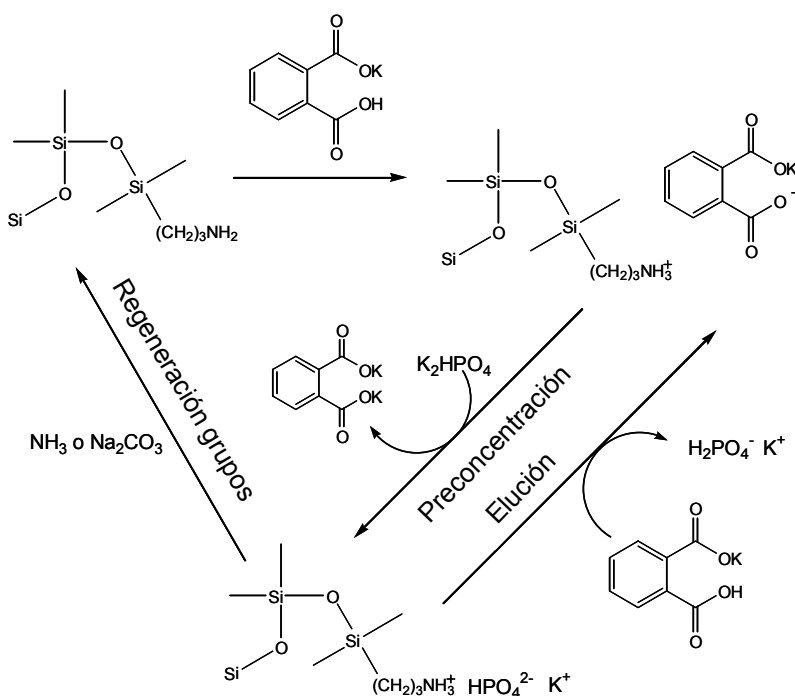
**Tabla 4.7:** Secuencia inicial de análisis. Todos los caudales son de 1.6 ml/min.

El mecanismo de respuesta del electrodo selectivo utilizado (la placa de cobalto) es muy complejo. Algunos autores sugieren que, en contacto con el KHP, se forman óxidos de cobalto sobre la superficie del metal que son responsables del reconocimiento del analito; otros autores consideran que es la especie  $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$  la que permite obtener una respuesta selectiva al ión ortofosfato.<sup>19,20</sup> Se utiliza KHP en el proceso de preconcentración por ser esta especie indispensable en la determinación potenciométrica. Al acondicionar la resina con KHP, los grupos amina de la resina se protonan.

<sup>19</sup> Chen, Z. *Anal. Commun.*, **1997**, 34, 93.

<sup>20</sup> Chen, Z. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 363, 191.

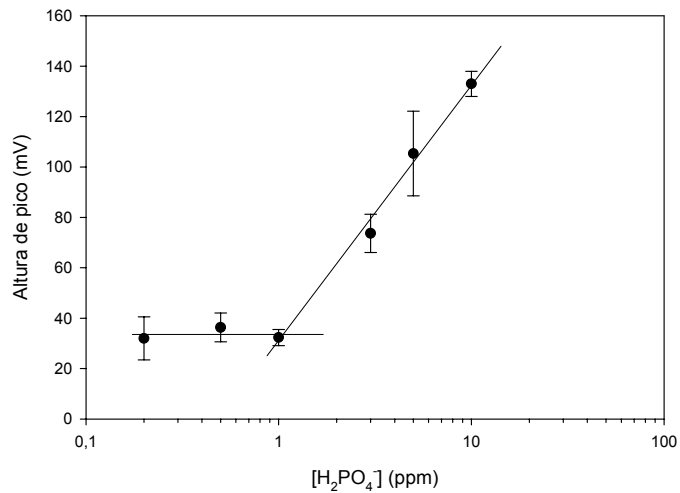
Cuando a continuación se pasa la muestra (cuyo pH se encuentra alrededor de 8.5-9 debido a los componentes de la matriz), la doble carga negativa del ión hidrógenofosfato permite su retención en la resina desplazando al ión hidrógenoftalato. Existen dos maneras de provocar la elución. Utilizando una base (amoníaco o carbonato sódico) o con el propio KHP. En el primer caso se provoca la desprotonación de la amina del grupo funcional, con lo que al desaparecer las fuerzas electroestáticas, el analito es eluído. En el segundo caso, el pH del KHP (alrededor de 4) ayuda a protonar la especie  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ( $\text{p}K_{a1}=2.15$ ,  $\text{p}K_{a2}=7.21$ ,  $\text{p}K_{a3}=12.34$ ), con lo que tiene tendencia a eluirse por dos motivos: la disminución de las fuerzas electroestáticas y el exceso de anión hidrógenoftalato, con quien el analito ha de competir por los lugares de intercambio. El siguiente esquema muestra el proceso descrito:



**Figura 4.28:**  
Esquema del proceso de preconcentración/elución del analito y regeneración de los grupos funcionales.

Bajo las condiciones experimentales de la anterior tabla se obtiene un límite de detección<sup>12</sup> de  $0.6 \pm 0.3$  ppm ( $n=3$ , 95%) y pendientes super-nernstianas ( $111 \pm 11$  mV/déc) en un rango lineal de 3 a 10 ppm. A pesar de significar una gran mejora respecto al límite de detección obtenido por el electrodo selectivo sin etapa de preconcentración ( $\sim 5.5$  ppm), no se puede diferenciar entre los patrones de más interés: 0.2 y 0.5 ppm.

**Figura 4.29:**  
Calibrado realizado utilizando patrones con interferencias y bajo las condiciones experimentales de la tabla 4.7.



Para asegurar una preconcentración más eficaz, se disminuye el caudal de entrada de muestra. Asimismo, se incrementaron los tiempos de preconcentración y elución. También se evalúan dos concentraciones diferentes de KHP.

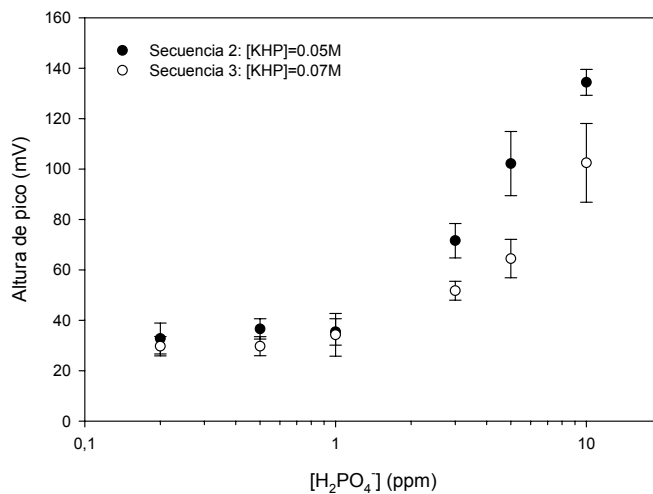
#### SECUENCIAS 2 y 3

ORDEN	TIEMPO (min)
Limpieza de la resina con H <sub>2</sub> O	2
Acondicionamiento de la resina con KHP*	2
Preconcentración de muestra	5 (1.2 ml/min)
Elución de muestra con KHP*	5

\*En la secuencia 2 se utiliza [KHP]=0.05 M y en la 3 [KHP]=0.07 M.

**Tabla 4.8:** Segunda y tercera secuencia de análisis. Los caudales son de 1.6 ml/min, excepto el de preconcentración de muestra.

**Figura 4.30:**  
Curvas de calibrado obtenidas para la secuencia 2 y 3.





En el caso del uso de KHP 0.05 M se obtiene un límite de detección de  $0.7 \pm 0.2$  ppm y una pendiente de  $100 \pm 23$  mV/déc ( $n=5$ , 95%); en el caso de KHP 0.07M los valores obtenidos son  $1.0 \pm 0.2$  ppm y  $118 \pm 11$  mV/déc ( $n=4$ , 95%), respectivamente.

Trabajar con concentraciones de KHP elevadas resulta problemático porque el ión hidrógenoftalato es un interferente en la respuesta del electrodo selectivo de fosfatos. Sin embargo, para asegurar una buena regeneración de los grupos funcionales de la resina, es interesante que el eluyente contenga una concentración alta de KHP para poder desplazar la totalidad de iones hidrógenofosfato. Por ello se estudia el efecto de una nueva secuencia de análisis que combine dos concentraciones de KHP: una diluida para eluir y acondicionar y otra más concentrada para limpiar la resina.

<b>SECUENCIA 4</b>	
ORDEN (caudal)	TIEMPO (min)
Preconcentración de muestra (1.2 ml/min)	4
Elución de muestra con KHP 0.025 M (1.2 ml/min)	4
Limpieza de la resina con KHP 0.05 M (1.6 ml/min)	3
Acondicionamiento de la resina con KHP 0.025 M (1.6 ml/min)	3

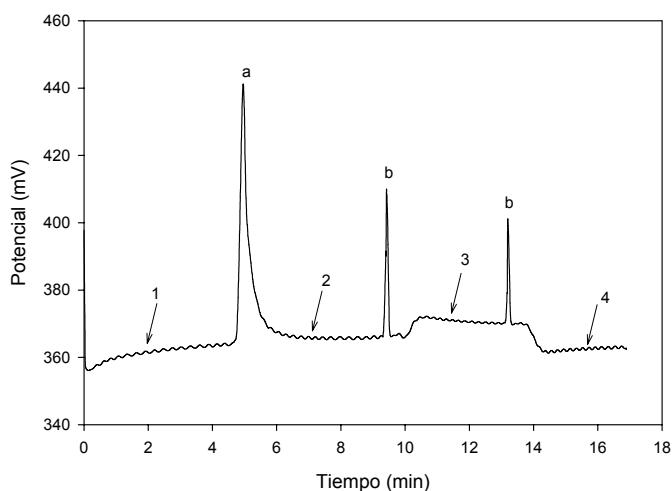
**Tabla 4.9:** Cuarta secuencia de análisis. Caudales entre paréntesis.

A partir de este momento se decide trabajar con los patrones de concentración más baja (0.2, 0.5 y 1 ppm) y optimizar las condiciones de trabajo (tiempos de contacto y caudales) para conseguir diferenciar claramente entre las alturas de sus respectivos picos, independientemente de lo que le suceda a las señales de patrones más concentrados.

En la figura 4.31 se pueden observar cómo varía el potencial en cada una de las siguientes etapas:

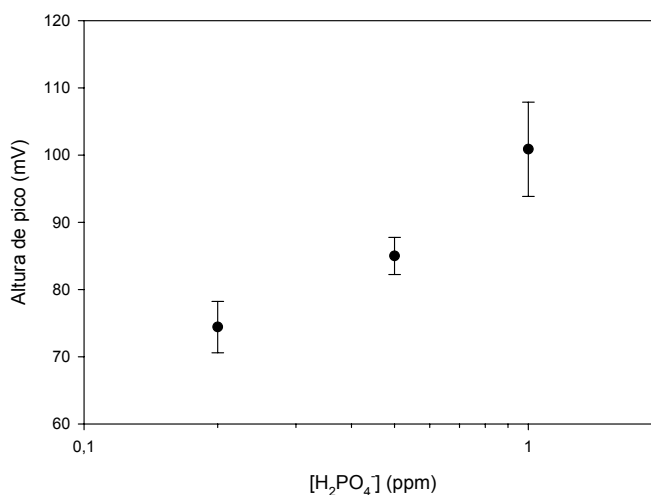
- 1:** preconcentración de la muestra y, simultáneamente, estabilización de la línea base con KHP 0.025 M,
- 2:** elución del analito y estabilización de la línea base con KHP 0.025M,
- 3:** limpieza de la resina con  $[KHP]=0.05$  M,
- 4:** acondicionamiento de la resina con  $[KHP]=0.025$  M,
- a:** pico analítico (corresponde a un patrón de 0.2 ppm con interferencias),
- b:** paradas del sistema para cambiar reactivos.

**Figura 4.31:**  
Evolución del potencial a lo largo de la secuencia 4.



Se realizan análisis de los tres patrones anteriores a lo largo de diferentes días. Siempre se utiliza una cantidad de resina de aproximadamente 35 mg. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 4.32. Se obtiene una pendiente de  $37 \pm 9$  mV/déc ( $n=6$ , 95%) y una buena diferenciación entre los 3 patrones de interés. Respecto al bajo valor de sensibilidad, se asocia al bajo nivel de concentraciones con el que se trabaja (fuera del rango de respuesta lineal).

**Figura 4.32:**  
Alturas de pico para los patrones de 0.2, 0.5 y 1 ppm bajo las condiciones de la secuencia 4.



#### 4.3.4 CONCLUSIONES

La integración de las rejillas de acero sinterizado como filtros ha demostrado ser una adecuada alternativa para la retención de partículas como las de las resinas de intercambio iónico. Escogiendo la configuración de dispositivo correcta, no se observan pérdidas de material y la compactación, que suele ser un problema común en equipos que utilizan esta etapa de pretratamiento, se puede prever y evitar mediante diversas fórmulas.

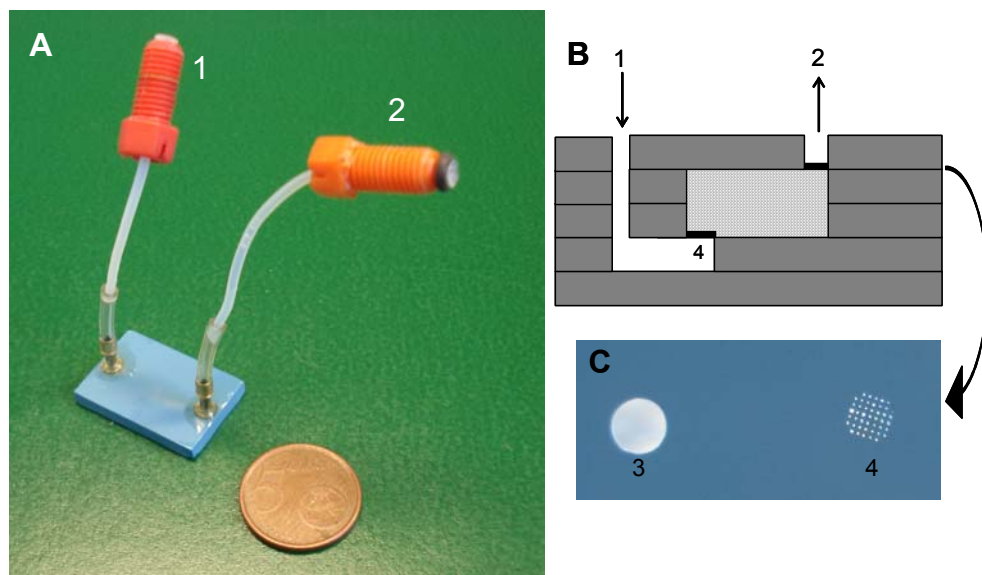
Aunque este prototipo ha permitido la diferenciación entre concentraciones de analito bajas y próximas entre ellas, incluso en presencia de iones interferentes, para futuros trabajos se proponen las siguientes alternativas:

- a) la fabricación de filtros mediante la perforación de cerámica verde con el equipo láser (cuyo diámetro de haz de luz es de 25  $\mu\text{m}$ ), para poder conseguir una mayor estanqueidad y facilitar el proceso de construcción,
- b) trabajar con zeolitas intercambiadoras de iones, dado que muchos de estos materiales soportan temperaturas muy elevadas y podrían ser integradas en el dispositivo antes de ser sinterizado.

Últimamente, gracias a la adquisición del equipo láser, se ha avanzado significativamente en el campo de la construcción de filtros para contener partículas de diferente naturaleza. Concretamente, se han fabricado dispositivos preconcentradores (como los que aparecen en la figura 4.33) en los que el material intercambiador (zeolitas naturales) ha sido introducido en la cavidad cerámica antes del sinterizado. Los filtros han sido fabricados mediante la realización de agujeros de 50 $\mu\text{m}$  (figura 4.33C) que impiden la pérdida de material preconcentrador a través suyo. La robustez de estos dispositivos, que han sido concebidos como filtros desechables, está totalmente garantizada gracias a la integración monolítica de tanto la zeolita como los filtros.

**Figura 4.33:**

**A:** fotografía de un dispositivo preconcentrador, donde **1:** entrada de líquido, **2:** salida. **B:** esquema lateral de la geometría del dispositivo, donde **4:** filtro cerámico. **C:** capa cerámica que contiene el canal para la entrada de líquido **3** ( $\text{Ø}=4\text{ mm}$ ) y el filtro ( $\text{Ø}=50\ \mu\text{m}$ ).



#### 4.4 Analizador de ión amonio con difusión gaseosa (DP4)

El precedente macro de este dispositivo es un analizador desarrollado para llevar a cabo la determinación de ión amonio en aguas de río y embalses: Aquamonía<sup>® 13</sup>.

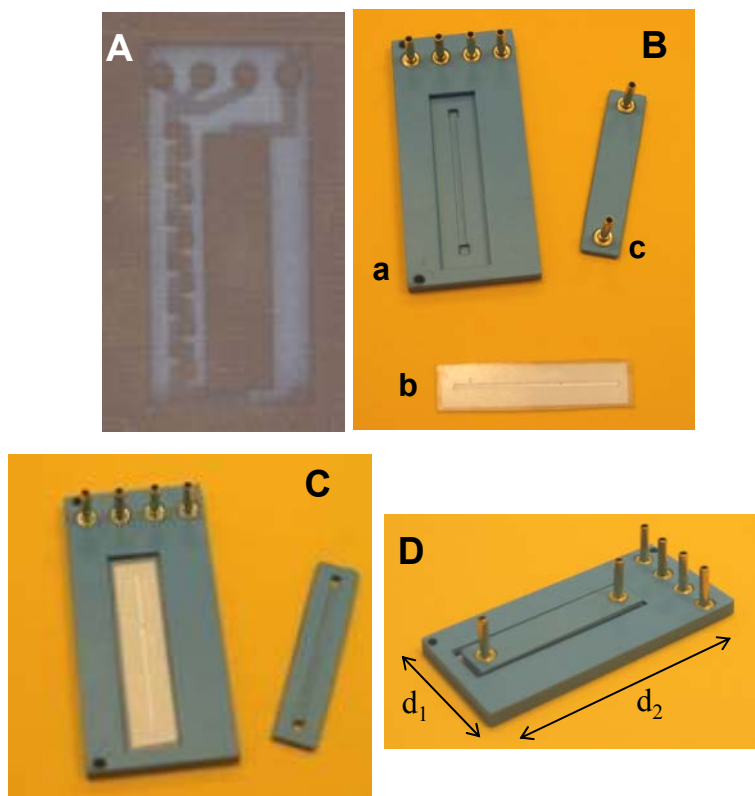
Este equipo integra una etapa de difusión gaseosa necesaria para aislar el analito de interés (el ión amonio) del resto de la matriz, que podría causar interferencias en el electrodo selectivo a iones utilizado.

Previo a la etapa de difusión, se transforma el ión amonio en amoníaco gas basificando la muestra con hidróxido de sodio. El gas generado difunde a través de la membrana y es recogido por la solución aceptora. Esta última es una solución de TRIS a pH 7.2 que convierte de nuevo el amoníaco gas en amonio. Este proceso de separación permite eliminar la interferencia del sodio o potasio presentes en la matriz. Si el caudal de la solución aceptora es inferior al caudal de la solución donadora, se consigue, además, un efecto preconcentrador.

La etapa de difusión gaseosa del sistema miniaturizado se realiza escalando adecuadamente tanto la configuración como el tamaño y tipo de membrana utilizada (polifluoruro de vinilideno, PVDF). En el equipo macro, esta membrana se coloca en medio de un soporte de metacrilato especialmente diseñado para ello, que también contiene las entradas y salidas de flujo.

**Figura 4.34:**

**A:** imagen en rayos X.  
**B, C y D:** fotografías secuenciales del dispositivo; en el bloque **a** tiene lugar la transformación de amonio a amoníaco que atraviesa la membrana difusora (**b**) y es recogido en el bloque **c**, donde vuelve a ser transformado en amoníaco.  $d_1=27$  mm;  $d_2= 58$  mm.



En el dispositivo LTCC, tanto el soporte de metacrilato como los conectores son reemplazados por bloques cerámicos que contienen los canales portadores y aceptores, tal y como se observa en las figuras 4.34. Los tres bloques constituyentes del sistema (reactor para la generación del gas, membrana difusora y bloque aceptor del gas) se disponen y sellan mediante una pinza que ejerce presión sobre ellos.

Como mezclador se escoge el de configuración en forma de serpentina para, dadas unas condiciones experimentales, conseguir la máxima conversión del amonio de la muestra o patrón a amoniaco gas, en el menor tiempo posible.

El sistema de detección empleado consiste en un electrodo tubular selectivo a ión amonio basado en el uso de membranas poliméricas, desarrollado en nuestro grupo de investigación.<sup>21</sup> En este caso, el sistema de detección no ha sido integrado monolíticamente en la cerámica.

El objetivo de este analizador es el de comprobar si el método de integración de una etapa de difusión gaseosa como el que se propone con este dispositivo, es o no efectivo para su implantación en analizadores de muestras medioambientales.

#### 4.4.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Además de los descritos en la tabla 4.1, los reactivos utilizados en este apartado se resumen en la siguiente tabla:

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Hidróxido de sodio	Panreac
Trishidroximetilaminometano (TRIS)	Baker
Cloruro de amonio	Fluka
Nonactina	Fluka
Adipato de bis(1-butilpentilo) (BBPA)	Fluka
PVC	Fluka
Tetrahidrofurano (THF)	Merck

**Tabla 4.10:** Reactivos utilizados en la evaluación del dispositivo DP4.

La preparación de membrana se realiza pesando (% en peso): 1% de nonactina (ionóforo), 65.5% de BBPA (plastificante o disolvente mediador) y 33.5% de PVC (matriz polimérica). Los componentes se disuelven en THF (0.05 ml/mg PVC).<sup>21</sup> La membrana se deposita gota a gota en un electrodo de epoxy-grafito *all-solid-state* de configuración tubular.

En base al conocimiento existente,<sup>13</sup> se preparan soluciones de NaOH 0.1 M y de TRIS 0.01 M, ajustando su pH a 7.4 con HCl diluido. Los patrones (entre 0.2-20 ppm) se preparan por pesada y dilución a partir de la sal correspondiente.

#### 4.4.2 Montaje experimental

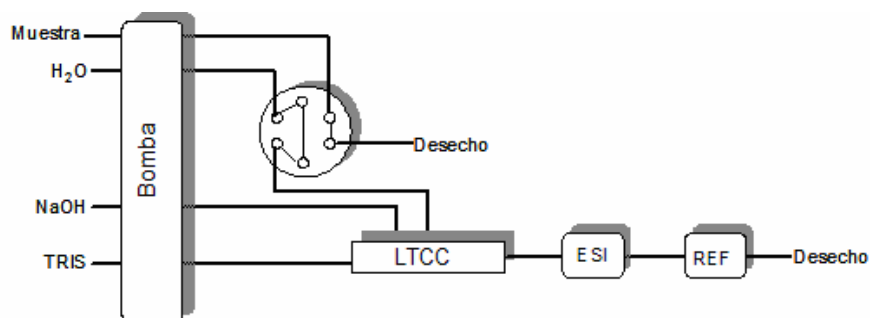
Tal y como se ha comentado con anterioridad, este dispositivo no integra el sistema de detección. En este caso, tanto el electrodo selectivo a iones como el de referencia son de configuración macro convencional y externos al dispositivo de microfluídica.

<sup>21</sup> Alegret, S.; Alonso, J.; Bartroli, J.; Martinez-Fabregas, E. *Analyst*, **1989**, *114*, 1443.

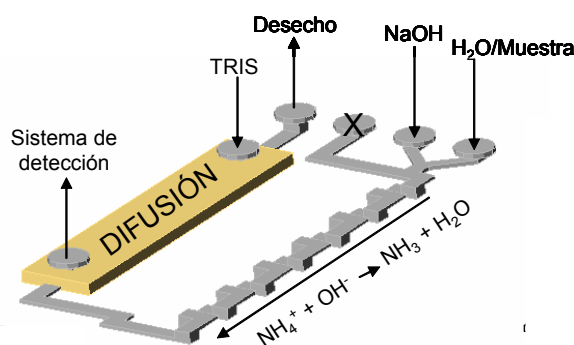
El sistema de flujo empleado aparece en la figura 4.35.

El dispositivo dispone de cuatro entradas, tal y como se puede observar en las figuras 4.34 y 4.36, pero dado que trabajamos con una válvula inyectora, sólo se utilizan tres. El agua y la muestra entran en esta configuración por el mismo canal.

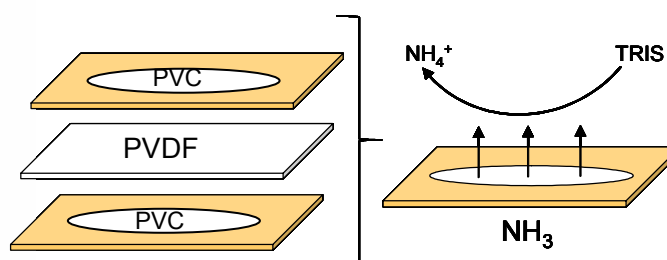
**Figura 4.35:**  
Esquema del sistema de flujo empleado para la evaluación del dispositivo DP4.



El esquema de funcionamiento de la etapa de difusión se muestra en la siguiente figura:



**Figura 4.36:**  
Funcionamiento de la etapa de difusión gaseosa y esquema del montaje de la membrana de difusión.



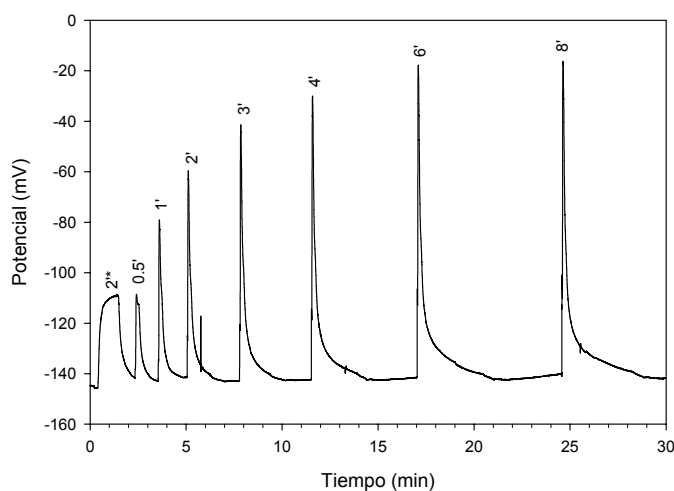
Gracias al mezclador en forma de espiral se consigue una buena mezcla entre el patrón/muestra (que contiene ión amonio) y la solución de NaOH para conseguir su transformación total en amonio gas. Este gas difunde a través de la membrana de PVDF y es recogido al otro lado por una solución aceptora de TRIS a pH=7.4, donde el amoníaco se transforma en amonio y es transportado hacia el sistema de detección.

Las disoluciones donadora y aceptora circulan a contracorriente respecto a la cámara de difusión para favorecer la transferencia del gas y limitar la presión sobre la membrana de difusión gaseosa.

#### 4.4.3 EVALUACIÓN DE LA ETAPA DE SEPARACIÓN

##### 4.4.3.1 Caudal y tiempo de acumulación

Por analogía con el analizador macro que se pretende escalar (Aquamonia<sup>®</sup>),<sup>13</sup> los primeros experimentos se realizan con un caudal de solución aceptora (TRIS) inferior al de la solución donadora. La relación de caudales fijada es de 0.83:1.16. Se obtienen señales con mucho ruido provocadas probablemente por la existencia de un diferencial de presión entre un lado y otro de la membrana. Para evitar este problema se iguala el caudal de las soluciones aceptora y donadora a 1.2 ml/min. En estas condiciones experimentales, además de no observarse pérdida de líquidos en la interfase LTCC-membrana-LTCC, se obtienen señales reproducibles sin ruido. Para aumentar la altura de las señales obtenidas se decide utilizar la estrategia de la acumulación. Es decir, durante un tiempo determinado se detiene el flujo de solución aceptora mientras, por el otro lado de la membrana, se deja fluir la solución con el amoníaco gas disuelto. Para poder realizar estos experimentos, se prescinde de la válvula de 6 vías y se inyectan los patrones por tiempo y no por volumen. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica:



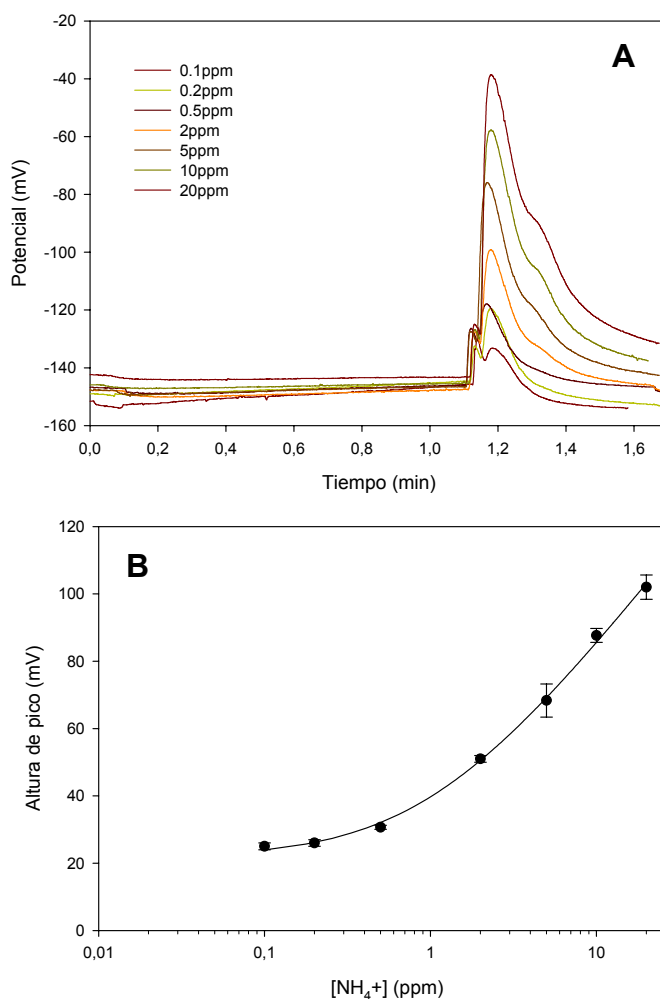
**Figura 4.37:** Altura de pico en función del tiempo de acumulación de la solución portadora. 2\*\* corresponde a un pico sin acumulación. Patrón de 5 ppm.

El primer pico corresponde al registro de potencial obtenido cuando se hace pasar en continuo tanto la solución donadora (mezcla continua de patrón y NaOH) como la aceptora durante 2 minutos. Comparando esta señal con la que se obtiene cuando se deja un tiempo de acumulación equivalente (2 minutos), se puede observar como la señal es casi el doble que la primera. Mayores tiempos de acumulación incrementan la señal ligeramente hasta alcanzar un valor a partir del cual la altura de pico se mantiene constante.

Esta observación es debida tanto al hecho de que se verifica la saturación de la disolución aceptora en contacto con la membrana de difusión, como del propio diseño de la celda de difusión. También se puede ver como el tiempo de recuperación de línea base (limpieza) aumenta con la altura del pico.

Como situación de compromiso entre la sensibilidad y el tiempo de análisis, se escoge un tiempo de acumulación de 2 minutos como valor óptimo.

Bajo estas condiciones experimentales, se realizan calibrados repetidos del microsistema. En la figura siguiente se muestran algunos de ellos.



**Figuras 4.38:**

**A:** Registro de picos obtenidos en un calibrado del dispositivo.

**B:** Curva de calibración.

Las características analíticas de la respuesta del microsistema obtenidas a partir de los calibrados realizados fueron (n=3, 95% confianza):

$$\text{Ajuste no lineal: } E=20(\pm 2)+62(\pm 2)\cdot\log[X+1.05(\pm 0.06)]$$

$$\text{Ajuste lineal (rango lineal 2-20 ppm): } E= 35(\pm 6)+55(\pm 5)\cdot\log X$$

Límite de detección de  $1.1(\pm 0.4)$  ppm



#### 4.4.4 CONCLUSIONES

La metodología de integración de la membrana difusora de gases propuesta es viable pero no es la óptima. La existencia de dos elementos cerámicos separados entre los cuales se sitúa la membrana de difusión gaseosa genera en ocasiones problemas de estanqueidad, que hacen el sistema poco robusto. Este hecho es inevitable debido a la imposibilidad de integrar monolíticamente la membrana plástica, ya que no soporta las temperaturas a que se somete a las cerámicas durante el proceso de sinterización (850°C). En estas condiciones, aunque se consigue difundir analito a través de la membrana, no se alcanzan los límites de detección obtenidos con el analizador convencional (0.1 ppm).

En el futuro y para solventar estos problemas, se proponen diferentes alternativas:

- a) integrar el electrodo selectivo a ión amonio en el propio dispositivo cerámico con la finalidad de disminuir al máximo la dispersión/dilución sufrida por la muestra entre la etapa de difusión y su detección,
- b) integrar la membrana difusora de gases en el seno del dispositivo para evitar problemas de estanqueidad.

Para conseguir esto sería necesario utilizar una membrana porosa a gases basada en aluminosilicatos que soportara altas temperaturas (por lo menos 850°C). Una membrana de estas características podría ser ocluida en la estructura multicapa obteniéndose una estructura monolítica que integraría completamente la celda de difusión gaseosa. Además, sería interesante aumentar la superficie de contacto entre la membrana y las disoluciones donadora y aceptora mediante la fabricación de una celda de difusión de configuración en espiral.

#### 4.5 Analizador de ión amonio/nitrato: integración monolítica de ESI y electrodo de referencia sobre estructuras de microfluídica (DP5)

Como etapa indispensable en la consecución de un microsistema total de análisis, en este subapartado se presenta la integración monolítica del sistema de detección potenciométrico completo (tanto el ESI como el electrodo de referencia). Se pretende establecer una metodología general para la implementación de membranas selectivas poliméricas. Se aprovechará el conocimiento acumulado en el grupo de investigación respecto al diseño de ionóforos y cromoionóforos para la formulación de membranas selectivas, tanto potenciométricas como ópticas, y su implementación en sensores químicos susceptibles de ser aplicados como detectores en microsistemas. Con el propósito de demostrar la viabilidad de la metodología de fabricación y su carácter general, se construirán dispositivos utilizando dos membranas diferentes: una selectiva a ión amonio y otra a ión nitrato.<sup>22</sup>

---

<sup>22</sup> Ibañez-García, N.; Mercader, M.B.; da Rocha, Z.M.; Seabra, C.A.; Gongora-Rubio, M.R.; Chamarro, J.A., *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 2985.

Por ser estos los primeros dispositivos presentados que integran pistas conductoras serigrafiadas, se dará una descripción más detallada de las diferentes capas integrantes del diseño.

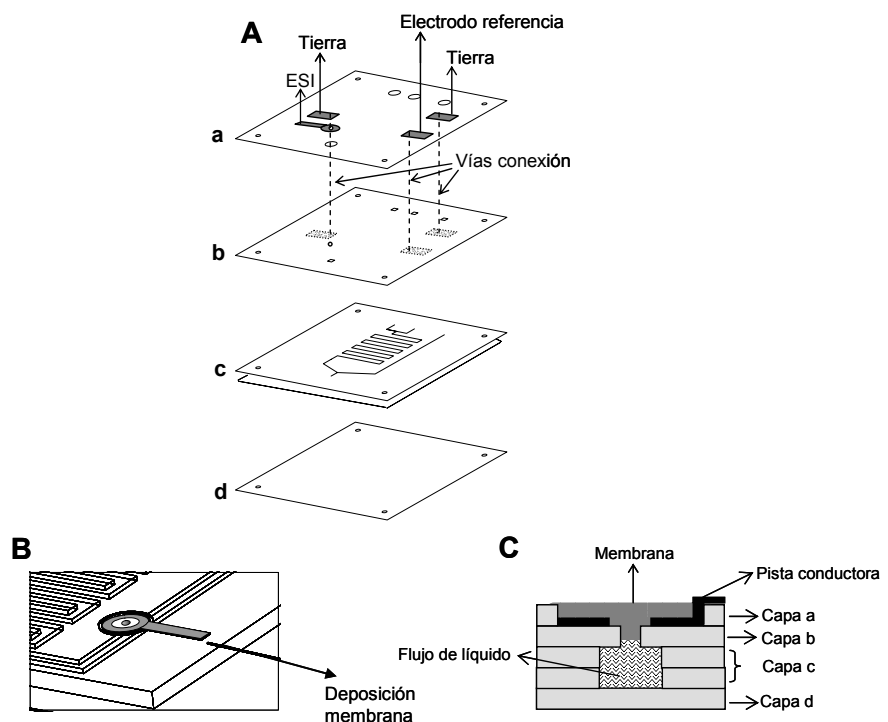
La figura 4.39 muestra el diagrama esquemático del dispositivo, así como de alguno de los elementos principales que lo componen. El ancho de los canales, realizados en bajorelieve, queda prefijado por el diámetro de la herramienta utilizada en su fabricación (Contour Router de 1.3 mm de diámetro) y por el número de capas empleadas, dos en este caso. Las dimensiones de los canales en estado verde fueron 1.3 mm de ancho y 580  $\mu\text{m}$  ( $2 \times 254 \mu\text{m}$  cada capa) de profundidad. Después del proceso de sinterizado, las dimensiones se redujeron a  $\sim 1.1$  mm y  $\sim 431 \mu\text{m}$ , debido al encogimiento del  $\sim 15\%$  en X, Y y Z.

En el dorso de la capa b (figura 4.39A) se depositaron pistas conductoras (TC0307) de  $1 \times 0.5$  cm de área que actuaban como electrodo de referencia y tomas de tierra. Estas pistas se conectaron al exterior mediante vías o agujeros contenidos en las capas superiores y rellenos de pasta conductora (TC0308). En la superficie, dichas vías se conectaron con nuevas pistas conductoras serigrafiadas (TC0306) a las cuales se soldaron los cables de conexión a la electrónica de medida externa.

**Figura 4.39:**

**A:** capas componentes del dispositivo: **a:** capa superior (contiene las conexiones para el sistema de medida externo y la cavidad para depositar la membrana); **b:** capa intermedia (contiene pistas conductoras serigrafiadas); **c:** capa fluidica (contiene los canales); **d:** capa inferior soporte.

**B:** detalle de la zona de deposición de membrana. **C:** esquema de la sección transversal del dispositivo donde se deposita la membrana.

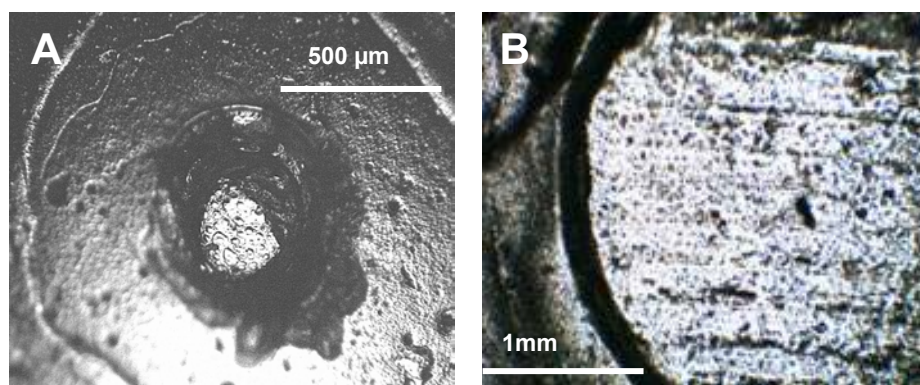


La integración de la membrana polimérica se ha de realizar tras el proceso de sinterización de la cerámica ya que no soporta las temperaturas aplicadas. Para su integración en el dispositivo se evaluaron dos estrategias. Las diferencias entre ellas empiezan ya en el proceso de preparación del cóctel sensor:

a) **Metodología preserigráfica:** se usa la mínima cantidad de THF para disolver los componentes de la membrana (2-3 ml). La mezcla se deja evaporar hasta ~1 ml, momento en el que la viscosidad del cóctel sea suficientemente elevada como para que éste pueda ser depositado sobre el orificio asignado para ello, de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro (ver figura 4.39C) sin que la membrana caiga a través de él, obturando el canal inferior. Tan sólo es necesario depositar 2-5 gotas de cóctel y expandirlas mediante el uso de una lámina de cristal o un objeto similar.

b) **Metodología de disco preformado:** en este caso, se utilizan 4 ml de THF (0.05 ml/mg PVC) para disolver los componentes. Seguidamente, se introduce el cóctel sensor en un contenedor de teflón cubierto con un filtro de papel. Se deja evaporar el disolvente durante 24 horas. Pasado este tiempo se corta la membrana, ya sólida, en forma circular ( $\sim\varnothing=7$  mm) y se adhiere sobre la cavidad creada en el microdispositivo de cerámica con este fin utilizando una cola de PVC y THF. El diámetro de la cavidad preformada en la cerámica encima del microcanal es de 8 mm y el diámetro de la zona de contacto membrana-líquido de 4 mm.

La figura 4.40A muestra una fotografía realizada mediante un microscopio de transmisión de luz de la membrana depositada siguiendo el método preserigráfico, una vez había sido retirada del dispositivo. La figura 4.40B muestra una fotografía del disco preformado, tras despegarlo de la cavidad donde se aloja en el microdispositivo. Se pueden observar las diferencias entre ambas metodologías en cuanto al tamaño de la zona de contacto membrana-líquido.



**Figura 4.40:**  
A: membrana depositada mediante el método preserigráfico.  
B: membrana depositada mediante el método del disco preformado.

Con el objetivo de conseguir la integración monolítica de un sistema de detección potenciométrico, el siguiente paso a realizar es la miniaturización del electrodo de referencia. La estrategia utilizada es integrar un electrodo de segunda especie basado en el par Ag/AgCl situado en un canal auxiliar.

Previo a la integración de los electrodos de referencia dentro de los dispositivos LTCC, se realizan diversas experiencias en discontinuo para estudiar el comportamiento de este tipo de electrodos. Los resultados obtenidos se detallarán más adelante.

La figura 4.41 muestra el dispositivo (metodología preserigráfica) una vez acabado, así como sus medidas. Se puede observar cómo el electrodo de referencia se sitúa en un canal auxiliar. Por este canal, que posteriormente confluye con el canal principal, se hace circular una solución 0.1M de KCl a bajo caudal para mantener constante el potencial suministrado por el electrodo de referencia. Los posibles problemas de contaminación entre esta solución y la muestra se solucionan conectando ambos canales en un punto situado más allá del electrodo selectivo a iones (figura 4.41B), conectando así eléctricamente los dos electrodos mediante una unión líquida de difusión libre.

**Figura 4.41:**

Fotografías del dispositivo para la metodología de deposición preserigráfica.

**A:** **a:** entrada de solución de Cl<sup>-</sup>; **b:** entrada de agua/muestra; **c:** entrada de solución acondicionadora;

**d:** conexión toma tierra; **e:** electrodo de referencia; **f:** pista conductora sobre la cual se deposita la membrana; **w:** desguace (salida fluidos).

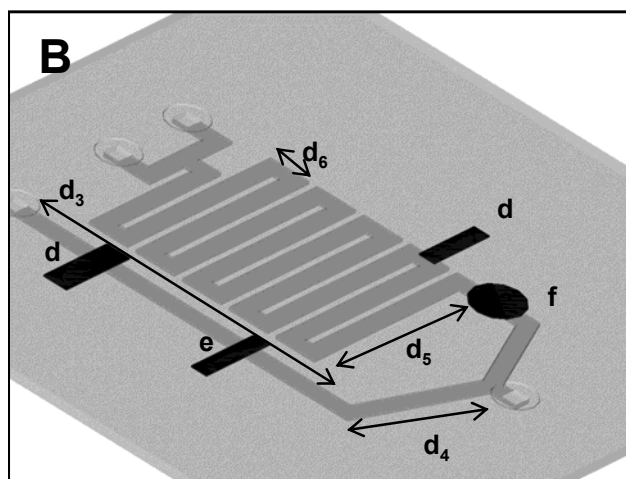
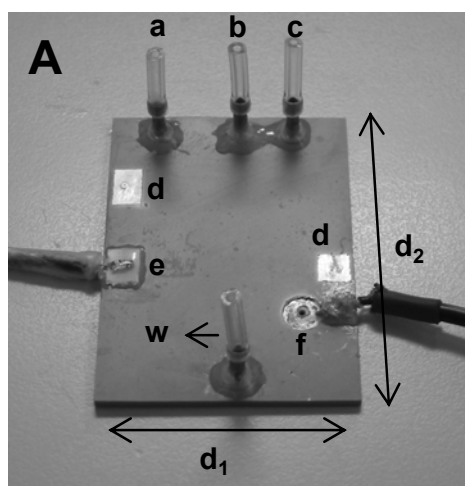
**d**<sub>1</sub>: 3.9 cm. **d**<sub>2</sub>: 5.3 cm.

**B:** arquitectura interna del dispositivo:

**d**<sub>3</sub>: 3.9 cm; **d**<sub>4</sub>: 1.4 cm;

**d**<sub>5</sub>: 18.4 mm;

**d**<sub>6</sub>: 2.7 mm.



### 4.5.1 MATERIALES Y REACTIVOS

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Sulfato de potasio	Panreac
TRIS	Baker
Cloruro de amonio	Fluka
Nitrato de potasio	Merck
Nitrato de tridodecilamonio	Fluka
Nonactina	Fluka
Fosfato de tris(2-etilhexilo) (TEHP)	Fluka
BBPA	Fluka
Ftalato de dibutilo (DBP)	Fluka
PVC	Fluka
THF	Merck

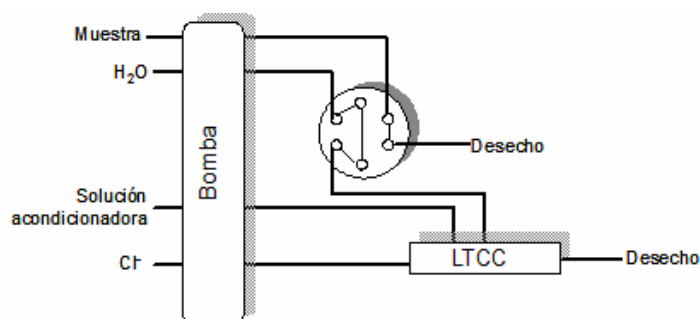
**Tabla 4.11:** Reactivos utilizados en la evaluación del dispositivo DP5.

La preparación de la membrana de amonio se realiza de acuerdo con lo descrito anteriormente en el proceso de construcción del dispositivo DP4 (§4.4.1).

En el caso del cóctel sensor de nitrato,<sup>1,23,24</sup> tal y como se verá más adelante, debido a ciertos problemas de adherencia de la membrana sobre la pista conductora, se realiza un estudio de la influencia de la viscosidad del plastificante utilizado sobre la adhesión de la membrana. Finalmente, la composición encontrada como óptima es (% en peso): 6% de nitrato de tridodecilamonio ( $[(C_{12}H_{25})_3(CH_3)N]^+NO_3^-$ ), 65 % TEHP y 29% PVC. Los componentes de las dos membranas se disuelven en diferentes volúmenes de THF, en función de la metodología de deposición escogida de entre las descritas anteriormente.

### 4.5.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

Dado que el dispositivo DP5 integra tanto el electrodo selectivo a iones como el de referencia, el sistema de flujo es más simple que los anteriormente explicados. El diagrama esquemático se muestra en la siguiente figura:



**Figura 4.42:** Esquema del sistema de flujo empleado para la evaluación del dispositivo DP5.

<sup>23</sup> Alegret, S.; Alonso, J.; Bartroli, J.; Lima, J. L. F. C.; Machado, A. A. S. C.; Paulis, J. M. *Anal. Lett.*, **1985**, *18*, 2291.

<sup>24</sup> Knoll, M.; Cammann, K.; Dumschat, C.; Eshold, J.; Sundermeier, C. *Sens. Actuator B-Chem.*, **1994**, *21*, 71.

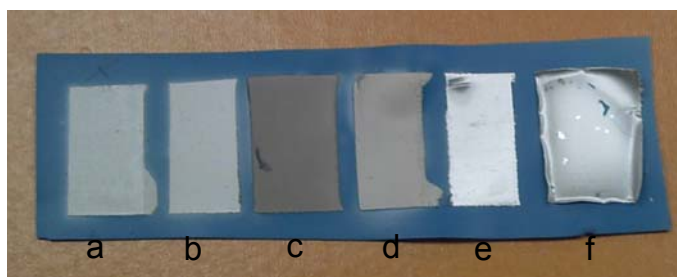
### 4.5.3 EVALUACIÓN DEL ELECTRODO DE REFERENCIA FABRICADO CON TECNOLOGÍA LTCC

Salvo alguna excepción, todos los dispositivos cerámicos han sido contruidos con cerámica LTCC de la serie 951AX de Dupont, por lo que es preferible trabajar también con pastas conductoras, casi todas basadas en plata, del mismo fabricante para asegurar una buena compatibilidad entre materiales. En algunos casos, sin embargo, se ha observado que es posible mezclar materiales de diferentes fabricantes sin que ello suponga una incompatibilidad estructural. Con la finalidad de escoger la pasta conductora más apta para realizar la serigrafía de las pistas conductoras que actuarían como electrodos de referencia (basados en el par Ag/AgCl) en los futuros dispositivos, se realiza la experiencia que se describe a continuación. Sobre dos hojas de cerámica previamente laminadas se serigrafian pistas de las diferentes pastas conductoras disponibles (ver figura 4.43):

**Figura 4.43:**

Pistas conductoras serigrafiadas.

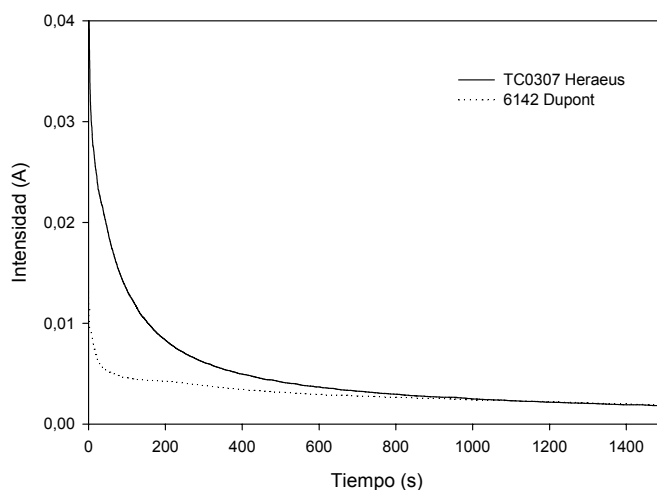
- a: 6141 (Dupont);
- b: 6142 (Dupont);
- c: 6146 (Dupont);
- d: TC0308 (Heraeus);
- e: TC0307 (Heraeus);
- f: TC0306 (Heraeus).



Para pistas conductoras realizadas en capas internas, siempre es preferible trabajar con las pastas que tengan esta finalidad (6142 de Dupont y TC0307 de Heraeus). Tal y como se puede observar en la anterior figura, tan sólo la pasta TC0306 de Heraeus (del tipo soldable) sufre deformaciones laterales al ser sinterizada.

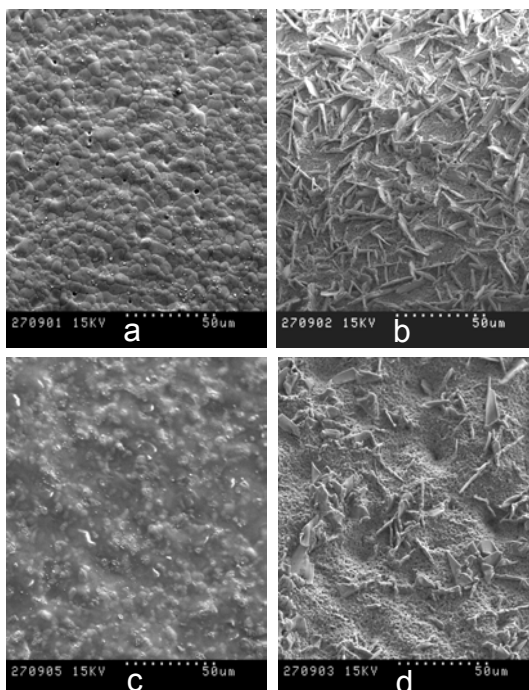
Para elegir cuál de las dos pastas de serigrafía interna es la más adecuada, se realizan cronoamperometrías para ver su comportamiento frente a la oxidación. Las pistas son serigrafiadas de nuevo en trozos individuales de cerámica. Después de sinterizadas se introducen en una solución 0.2 M de cloruro potásico con agitación y protegida de la luz. Se aplica un potencial de oxidación de 1.1 V y se registra la intensidad en función del tiempo.

En la figura 4.44 se puede observar como el comportamiento inicial de la pasta Heraeus es ligeramente diferente. Se produce una disminución de la intensidad más brusca que en el caso de la pasta Dupont, probablemente debido a la formación de la doble capa, eliminación de impurezas y a la propia oxidación de la plata. En ambos casos se observa que llegados a los 20 minutos de oxidación, la intensidad se mantiene igual de constante. Al no observar diferencias significativas entre ambas pastas, esta experiencia no nos sirve para decidir cuál de ellas puede ser la más adecuada pero sí para determinar un protocolo de oxidación aproximado: un potencial de 0.8-1.1 V durante unos 20 minutos.



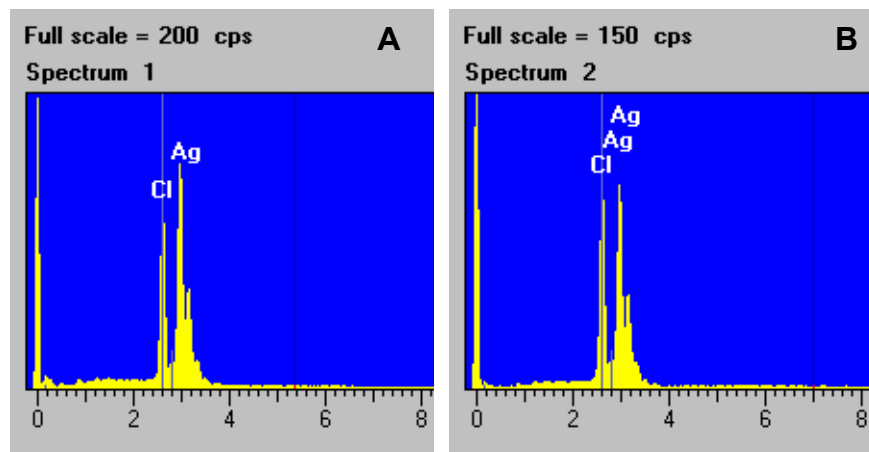
**Figura 4.44:**  
Cronoamperometría de las dos pastas conductoras internas.  
Potencial: 1.1 V.  
Medio: 0.2 M KCl.

El estudio de la morfología de la superficie de las pistas antes y después de la oxidación se realiza mediante SEM (*Scanning Electron Microscopy*) y XPS (*X-ray photoelectrons spectroscopy*). Se puede observar cómo, después de la oxidación de la plata, la superficie de la pasta 6142 de Dupont presenta un aspecto mucho más granular que en el caso de Heraeus, donde se aprecia la aparición de agujas (figura 4.45). Para comprobar que ambas morfologías corresponden a la formación de AgCl se realiza un XPS de la pista TC0307 (Heraeus) tanto en la zona granulada como en la zona en forma de agujas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.46. En la zona de agujas la relación de átomos Ag:Cl es del 40:60% y en el caso de la zona granulada 50:50%.



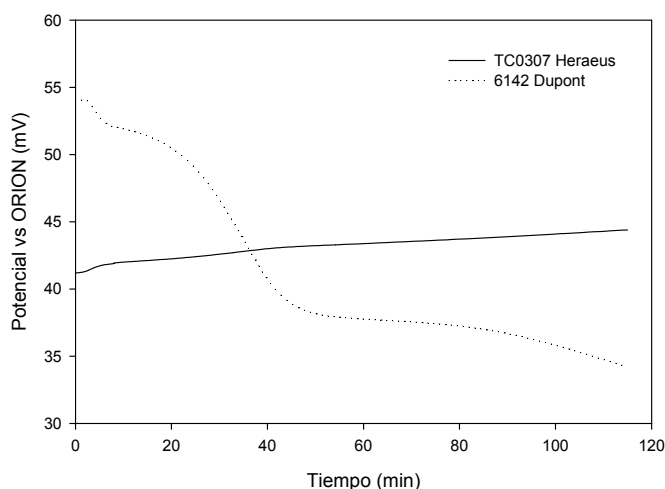
**Figura 4.45:**  
Fotos SEM de las pistas antes y después de la oxidación  
**a:** TC0307 (Ag);  
**b:** TC0307 (AgCl);  
**c:** 6142 (Ag);  
**d:** 6142 (AgCl).

**Figura 4.46:**  
XPS de la pista TC0307  
de Heraeus después de  
la oxidación.  
A: zona en forma de  
agujas;  
B: zona granulada.



En general, se sugiere que la deposición de AgCl sobre Ag se realice de la manera más homogénea y lenta posible para evitar, el desprendimiento del AgCl debido a una mala adhesión sobre la superficie metálica. La morfología superficial de la pasta Dupont es más homogénea que la de Heraeus, por lo que se podría considerar ésta más adecuada para nuestros propósitos. Para comprobar este hecho se realizan estudios de estabilidad del potencial de referencia en función del tiempo, frente a un electrodo de referencia convencional (ORION). Se introdujeron ambas pistas anodizadas en una solución 0.1 M KCl con agitación constante y protegida de la luz.

**Figura 4.47:**  
Evolución del potencial  
en función del tiempo,  
en un fondo 0.1 M KCl,  
agitación y oscuridad.



En el caso de la pista conductora 6142, se necesita de un tiempo de estabilización del potencial de alrededor de 40 minutos, a partir del cual se obtiene una deriva de 0.087 mV/min. La deriva de la pista TC0307 se puede calcular desde el inicio del experimento (un total de 2 horas), ya que el potencial es más estable, siendo de 0.027 mV/min.

El dispositivo DP5, tanto el que se muestra en esta tesis como todos los prototipos de esta familia que fueron también evaluados, se han construido utilizando pastas Heraeus para las pistas conductoras internas y externas.

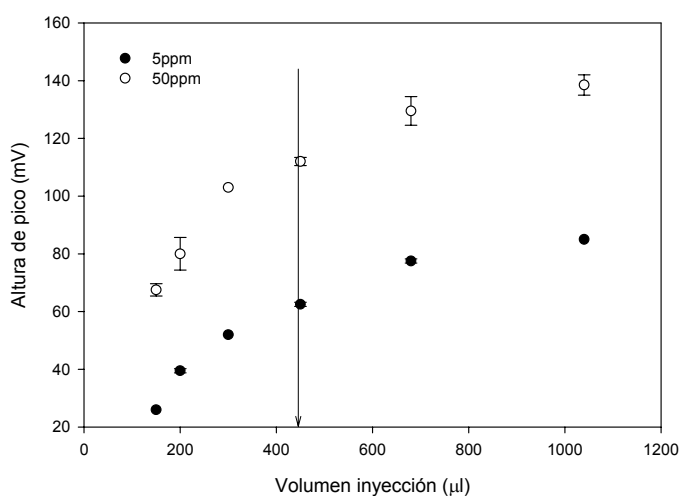


También se evalúa la estabilidad del potencial del electrodo de referencia una vez integrado en el dispositivo fluidoico. En este caso, la salida del dispositivo (indicada como w en la figura 4.41A) se conecta al electrodo ORION. Se hace fluir una solución de KCl 0.1 M por el canal que contiene la pista serigrafiada del electrodo de referencia a una velocidad de 0.5 ml/min. La deriva obtenida a lo largo de las 2 horas de experimento es de 0.042 mV/min, algo superior a la obtenida en los experimentos en discontinuo, pero suficientemente estable tal y como se podrá observar en los posteriores resultados obtenidos.

#### 4.5.4 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA DE AMONIO

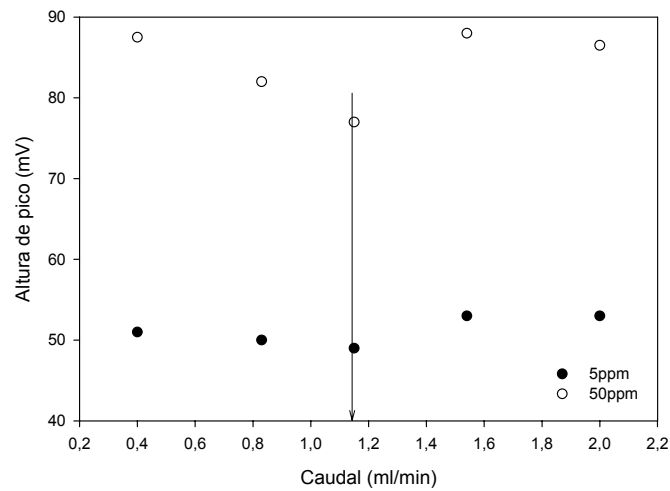
Las variables experimentales son optimizadas con el microanalizador de ión amonio desarrollado utilizando la metodología de deposición de membrana preserigráfica. Una vez determinadas las condiciones óptimas de trabajo, éstas son adaptadas al microanalizador de amonio con membrana de disco preformado para poder comparar ambas metodologías de deposición. Como solución acondicionadora se utiliza TRIS a pH = 7.4 ajustado con HCl (a este pH, la concentración de amoníaco es despreciable). A través del canal que contiene el electrodo de referencia, se hace fluir constantemente una solución de KCl 0.1 M a 0.5 ml/min. La membrana preserigráfica se acondiciona durante 75 minutos con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.1 M a un caudal de 0.1 ml/min y después se lava con agua bidestilada durante 90 minutos para evitar una posible saturación de la membrana.

Las gráficas 4.48, 4.49 y 4.50 muestran los resultados obtenidos en la optimización del volumen de inyección, el caudal y la concentración de TRIS. Se escogen valores de 450  $\mu\text{l}$ , 1.15 ml/min y 0.005 M, respectivamente, como situación de compromiso entre la máxima señal posible y una adecuada frecuencia de análisis.

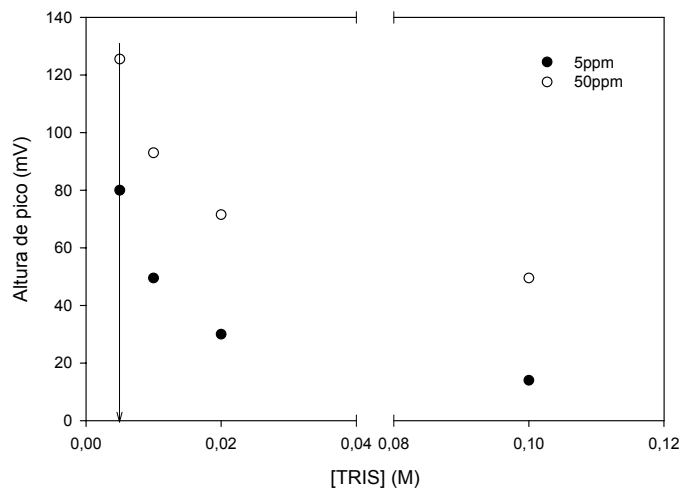


**Figura 4.48:**  
Optimización del volumen de inyección. [TRIS]=0.01 M y caudal de 1.13 ml/min.

**Figura 4.49:**  
Optimización del  
caudal. [TRIS]=0.01M y  
volumen de inyección  
450  $\mu$ l.



**Figura 4.50:**  
Optimización de la  
concentración de TRIS.  
Caudal 1.15 ml/min y  
volumen de inyección  
450  $\mu$ l.



Con estas condiciones experimentales se realizan calibrados repetidos del dispositivo. Se utiliza tanto el electrodo de referencia integrado como el convencional ORION para descartar la influencia del tipo de electrodo de referencia en los resultados del electrodo selectivo a iones  $\text{NH}_4^+$  y, simultáneamente, validar el funcionamiento del electrodo de referencia integrado.

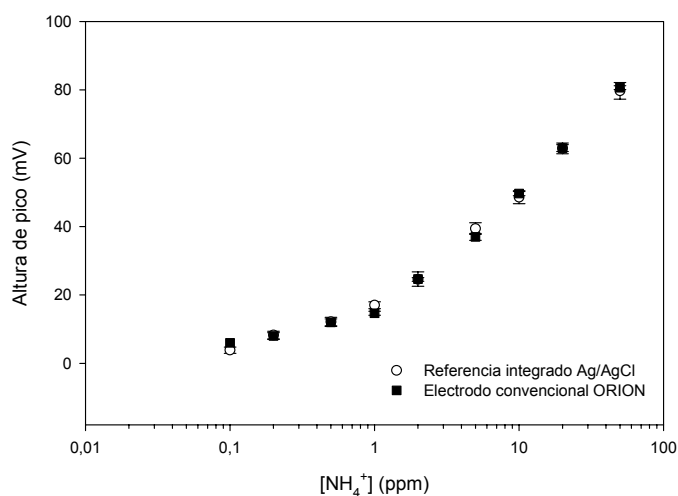
ELECTRODO DE REFERENCIA	RECTA DE CALIBRADO	RANGO LINEAL	L.D. <sup>12</sup>
Integrado	$E=2(\pm 5)+46(\pm 3)\cdot\log[\text{NH}_4^+]$ (n=5, 95%); $r^2>0.995$	2-50 ppm	$0.48\pm 0.04$ ppm (n=7)
ORION	$E=5(\pm 6)+44(\pm 4)\cdot\log[\text{NH}_4^+]$ (n=3, 95%); $r^2>0.995$	2-50 ppm	$0.47\pm 0.04$ ppm (n=3)

**Tabla 4.12:** Comparación de los resultados obtenidos con ambos electrodos de referencia.

No se observan diferencias significativas (al 95% de confianza) entre los calibrados obtenidos utilizando los dos electrodos de referencia. No se analizan concentraciones superiores a 50 ppm.

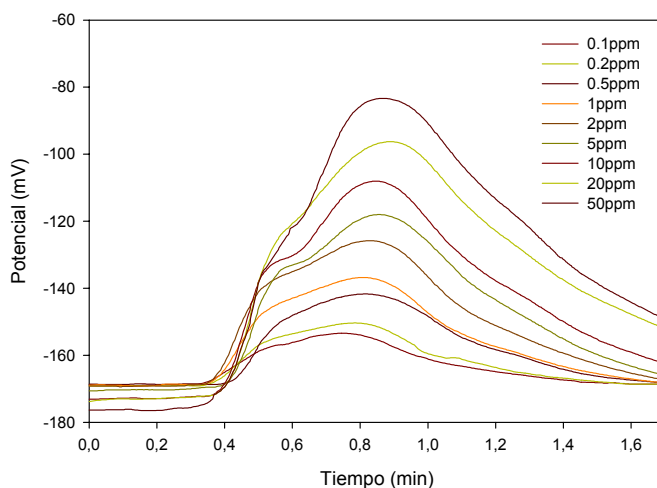
Se realizan estudios de repetitividad, inyectando sucesivamente un patrón de 0.5 ppm de  $\text{NH}_4^+$ . Cuando se utiliza el electrodo de referencia integrado, se obtiene una altura de  $12 \pm 1$  mV y una RSD=11.08% (n=7, 95%); en el caso del ORION, se obtiene  $12 \pm 1$  mV y una RSD=8.33% (n=7, 95%). En la figura 4.51 aparece una comparación de los resultados obtenidos mediante el uso de ambos electrodos de referencia.

**Figura 4.51:** Comparación de varios calibrados obtenidos con el dispositivo de amonio y los dos tipos de electrodos de referencia empleados.



La gráfica 4.52 muestra uno de los calibrados obtenidos con el dispositivo de amonio y membrana depositada con la metodología preserigráfica.

**Figura 4.52:** Registro obtenido con el microsistema donde se depositó la membrana utilizando la metodología de deposición preserigráfica bajo las condiciones experimentales optimizadas.



Las mismas condiciones de trabajo son aplicadas al dispositivo con membrana de disco preformado. Se observan varias desventajas que finalmente nos hacen optar por el uso de la metodología preserigráfica:

- El método de preparación de la membrana es más lento y laborioso que el preserigráfico porque es necesaria la evaporación de todo el disolvente, recortar el diámetro deseado y pegar el disco con cola de PVC sobre su pista conductora, con lo que resulta difícilmente automatizable.
- Las membranas de disco preformado son más frágiles y vulnerables a la presencia de sobrepresiones en el microsistema, pudiéndose despegar y provocar pérdidas de líquido.

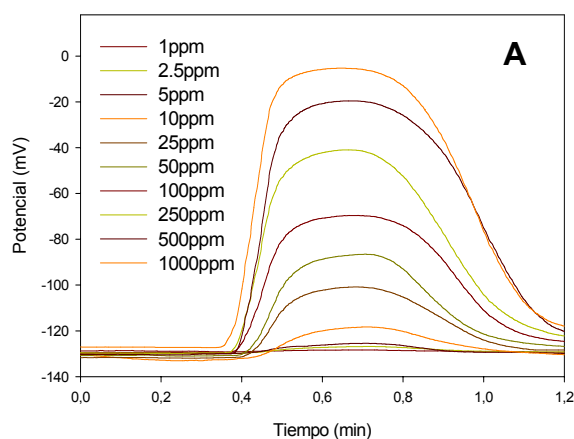
#### 4.5.5 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA DE NITRATO

La optimización de las variables experimentales implicadas en este microanalizador se realiza utilizando únicamente el electrodo de referencia integrado y el método de deposición de membrana preserigráfica. En la siguiente tabla se muestran los rangos estudiados así como los valores de las variables seleccionados como óptimos, que se escogen como situación de compromiso entre una máxima altura de pico y un mínimo tiempo de análisis.

VARIABLE	RANGO ESTUDIADO	VALOR ÓPTIMO
Caudal (ml/min)	0.69-1.87	1.15
Volumen de inyección (μL)	150-1720	680
[K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (M)	0.025-0.5	0.1
pH del K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.4 y 5.5	2.4

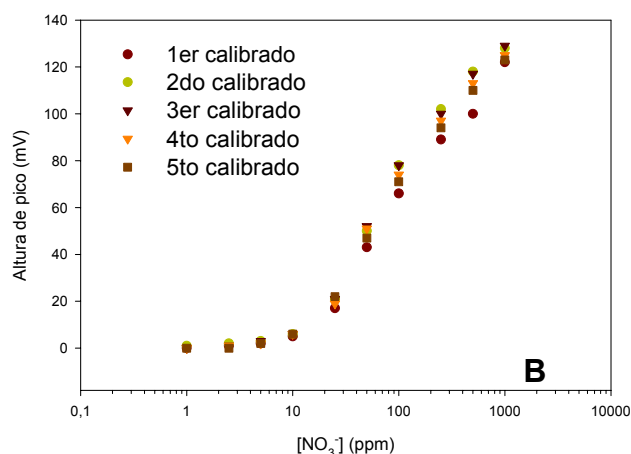
**Tabla 4.13:** Variables experimentales, rangos estudiados y valores óptimos.

Fijadas estas condiciones de trabajo se realizan diversos calibrados, tal y como se observa en las figuras 4.53. Se obtienen los siguientes resultados:  $E = -57(\pm 3) + 63(\pm 3) \cdot \log[\text{NO}_3^-]$  (n=5, 95%); rango lineal: 10-500 ppm y L.D. =  $7.9 \pm 0.2$  ppm.



**Figura 4.53:**

**A:** registro de picos obtenidos en un calibrado; **B:** secuencia de cinco calibrados.



Con este dispositivo se estudia la reproducibilidad del proceso de deposición de las membranas. Para ello, se depositan tres membranas que se calibran sucesivamente a lo largo de tres semanas. Los valores de pendiente obtenidos son:  $66.60 \pm 0.07$  mV/déc ( $n=2$ );  $58 \pm 4$  mV/déc ( $n=3$ ) y  $63 \pm 3$  mV/déc ( $n=5$ ). Se analizaron estadísticamente los resultados realizando un ANOVA de un sólo factor ( $F_{\text{exp}}=3.93 < F_{\text{tab}}=4.74$ ) no observándose diferencias significativas entre las diferentes membranas. Estos resultados permiten comprobar la reproducibilidad del proceso de deposición.

#### 4.5.6 CONCLUSIONES

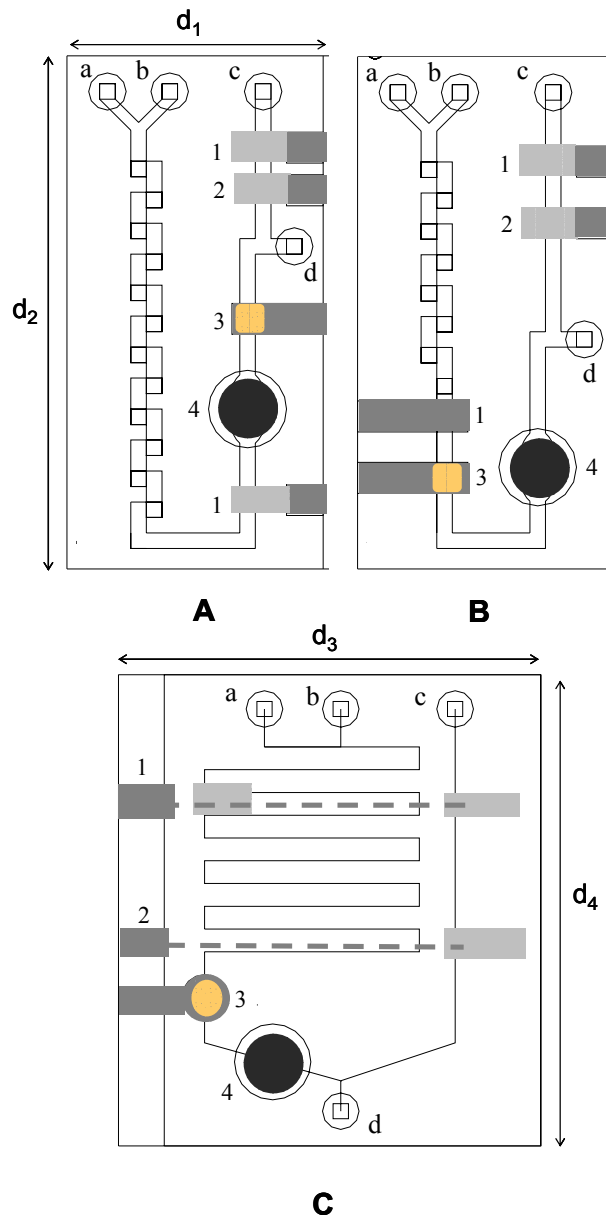
Se ha desarrollado una metodología de deposición de membranas poliméricas que permite integrarlas fácilmente en los dispositivos miniaturizados. Las características de respuesta de éstas no se ven alteradas respecto a las obtenidas con electrodos de configuración convencional. Para demostrar que el procedimiento de integración es generalizable a cualquier tipo de membrana polimérica selectiva de iones se han evaluado membranas selectivas a iones nitrato y amonio obteniéndose resultados satisfactorios en ambos casos. No obstante, trabajos paralelos realizados en nuestro grupo de investigación han permitido observar que algunas membranas, como las selectivas a ión plomo, requieren de un pretratamiento de la superficie de la pista conductora de plata, basado en la electrodeposición de una capa de cobre sobre ésta, para garantizar una respuesta adecuada.

Por otro lado, se ha conseguido la integración monolítica de un electrodo de referencia basado en el par Ag/AgCl que suministra un potencial suficientemente estable y constante comparable al suministrado por un electrodo de referencia convencional. Gracias a su ubicación en un canal auxiliar que confluye aguas abajo con el canal principal, en un punto alejado del electrodo indicador, se asegura el contacto eléctrico sin necesidad de puente salino y dispositivos para albergar la solución de referencia interna.

## 4.6 Analizador biparamétrico de ión nitrato y cloruro: integración monolítica de ESIs y electrodo de referencia (DP6)

La futura aplicación de los microanalizadores en la monitorización *in-situ* de parámetros de interés medioambiental en un entorno real hace necesario prever la existencia en la muestra, junto al analito, de un conjunto de potenciales especies interferentes. Aprovechando la versatilidad que proporciona la tecnología LTCC, en este apartado, se propone la fabricación de dispositivos multiparamétricos. Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que el ión cloruro es el principal interferente en la respuesta de los electrodos selectivos a nitrato. Este efecto es especialmente importante si se tiene en cuenta que la concentración del interferente puede doblar la del analito en aguas naturales.<sup>13</sup>

**Figura 4.54:**  
**A:** prototipo 1;  
**B:** prototipo 2;  
**C:** prototipo 3. Para todos ellos:  
**a:** entrada de solución acondicionadora;  
**b:** entrada de muestra/patrón;  
**c:** entrada de solución de cloruros para estabilizar el potencial de referencia;  
**d:** salida o desguace;  
**1:** tomas de tierra;  
**2:** electrodo de referencia;  
**3:** pista conductora sobre la que se deposita la membrana selectiva a nitratos depositada;  
**4:** disco sólido sensor de cloruros, sin pista conductora;  $d_1=28$  mm;  $d_2=56$  mm;  $d_3=47$  mm;  $d_4=53$  mm.



Por este motivo, en vista de los óptimos resultados obtenidos con los analizadores de ión nitrato (DP5) y cloruro (DP2), se diseña un dispositivo biparamétrico para poder realizar el análisis simultáneo de los dos iones. De esta manera, tal y como sucede con el equipo comercial desarrollado por el GSB en colaboración con Adasa Sistemas (Aquanitra<sup>®</sup>), la obtención de la concentración de cloruros en el medio nos ayuda a corregir la concentración de nitratos determinada por el electrodo selectivo a esta especie.

En la figura 4.54 se muestran tres de las diversas versiones construidas del analizador biparamétrico. En los tres dispositivos se han sombreado las zonas correspondientes a la ubicación de las pistas conductoras serigrafiadas. Las zonas gris claro simbolizan las pistas conductoras internas que están en contacto directo con los líquidos que circulan por los canales que se encuentran bajo ellas. Las pistas internas, como se ha descrito con anterioridad, se ponen en contacto con las externas o superficiales (simbolizadas con regiones gris oscuro) mediante unos pequeños agujeros o vías rellenas con pasta conductora. El dispositivo 4.54C es algo más complicado puesto que las pistas internas y las superficiales no se ponen en contacto sólo mediante una vía de conexión. Entre ellas existe una capa de cerámica con otra pista conductora y es ésta la que pone en contacto a las pistas conductoras internas con las superficiales. Esto permite evitar que una misma pista interna estuviera en contacto simultáneamente con la muestra y la solución de cloruros estabilizadora del potencial de referencia.

A parte de lo referente a la serigrafía, las principales diferencias entre los dispositivos se deben a los mezcladores. Los prototipos 1 y 2 contienen mezcladores serpentina, el segundo más corto que el primero, de manera que se consigue alejar a los electrodos selectivos del canal del electrodo de referencia. El mezclador del prototipo 3 se construye utilizando la técnica de bajo relieve.

Para la integración del sistema de detección (tanto la membrana polimérica, como el disco sólido policristalino y el electrodo de referencia) se siguen las metodologías utilizadas en el caso de los dispositivos DP2 y DP5 (§4.2 y §4.5).

#### **4.6.1 MATERIALES Y REACTIVOS**

Se utilizaron los mismos reactivos que para la evaluación de los dispositivos DP2 (§4.2.1) y DP5 (§4.5.1) (analizador de ión nitrato).

La evaluación de los dispositivos se realizó calibrando cada uno de los electrodos selectivos por separado y luego preparando patrones mixtos.

#### **4.6.2 MONTAJE EXPERIMENTAL**

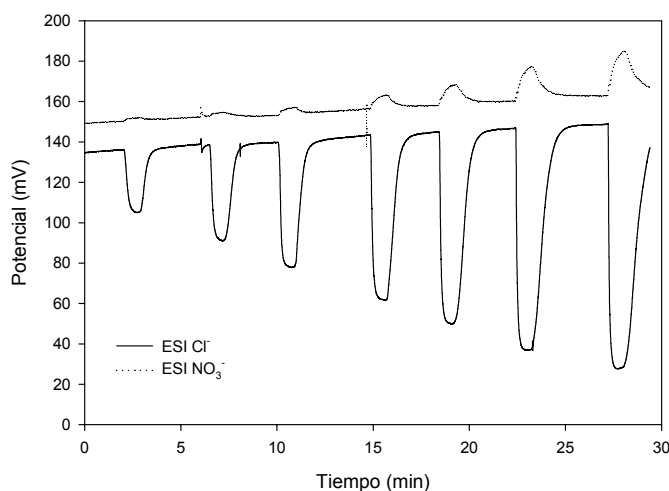
El mismo utilizado en la evaluación del dispositivo DP5 (§4.5.2), donde la solución acondicionadora es  $K_2SO_4$  0.1 M ajustado a  $pH = 2.4$  con  $H_2SO_4$ .

Se trabaja con un caudal de 1.15 ml/min, una solución estabilizadora del potencial de referencia de KCl 0.1 M y un volumen de inyección de 680  $\mu\text{l}$  (dado que es el volumen optimizado en el caso del dispositivo DP2).

#### 4.6.3 EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS Y QUÍMICAS EN LA RESPUESTA DEL MICROSISTEMA BIPARAMÉTRICO

Para la evaluación del prototipo 1, se preparan patrones de 1-500 ppm  $\text{NO}_3^-$  y 5-500 ppm  $\text{Cl}^-$  y se calibran los dos electrodos por separado. El electrodo de  $\text{Cl}^-$  no presenta interferencias respecto al  $\text{NO}_3^-$ , pero sí sucede lo contrario, por lo que se espera que, al calibrar el sistema con patrones de  $\text{Cl}^-$ , el electrodo selectivo a  $\text{NO}_3^-$  genere una señal debida a la presencia de ión cloruro como interferente.

Al realizar el calibrado con patrones de cloruro, el electrodo selectivo este ión responde correctamente al analito:  $\Delta E = -2.5136 + 53.544 \cdot \log[\text{Cl}^-]$ ,  $r^2 = 0.9916$  (rango lineal 5-500 ppm). Tal y como se observa en la figura 4.55, la señal de electrodo de nitrato se ve afectada por la inyección del patrón de cloruro.



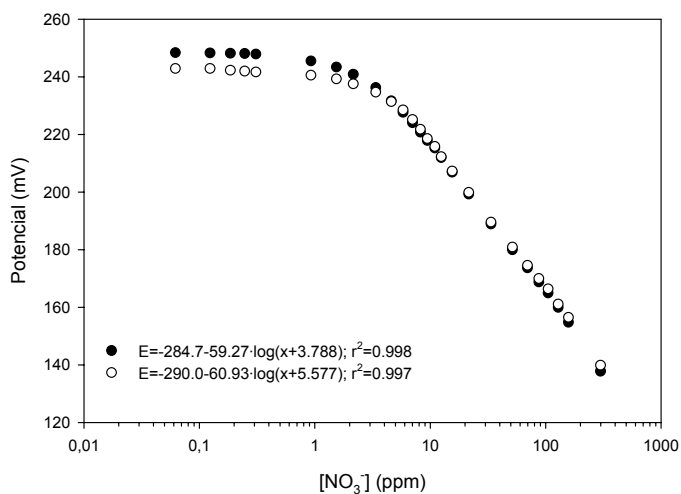
**Figura 4.55:**  
Respuesta de ambos electrodos selectivos al calibrarlos con patrones de  $\text{Cl}^-$  puros.

Sin embargo, la respuesta suministrada por el electrodo de nitrato es anómala ya que el potencial medido aumenta con la concentración de ión cloruro. Inicialmente, este hecho se atribuye a dos factores probablemente complementarios: por un lado la cinética de extracción del cloruro desde la solución hacia la membrana es más rápida que la cinética del ión nitrato. Eso justificaría un rápido desplazamiento del nitrato presente en la membrana por parte del cloruro con el consiguiente incremento del potencial medido.<sup>25</sup> Por otro lado, aunque en menor grado de importancia, la inyección de muestra puede provocar algunas variaciones en la fuerza iónica de la solución que afecten al potencial suministrado por el electrodo de nitrato.

<sup>25</sup> Hansen, E.H.; Ghose, A.K.; Ruzicka, J. *J. Analyst*, **1977**, *102*, 705.



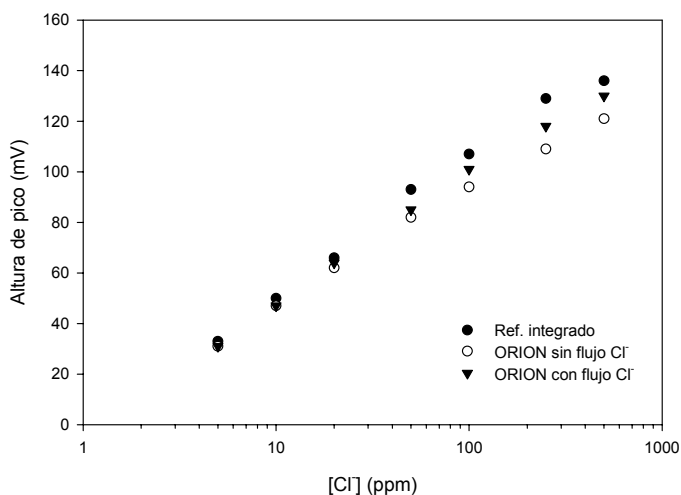
Para asegurar el adecuado funcionamiento de las membranas preparadas, se calibraron en discontinuo en un fondo de  $K_2SO_4$  0.1 M (pH=2.4). Los resultados se muestran en la figura 4.56.



**Figura 4.56:** Calibrado en discontinuo de dos membranas selectivas a  $NO_3^-$ .

Verificado el buen funcionamiento de la membrana, se procede a analizar la proximidad existente entre el lugar de deposición de la membrana de nitrato y el canal auxiliar del electrodo de referencia (por el que confluye una solución 0.1 M de KCl) que podría alterar la respuesta del sensor de nitrato.

Para comprobar esta posibilidad se realizan calibrados del electrodo de  $Cl^-$ , que también debería verse afectado por el flujo del canal auxiliar, en diferentes condiciones experimentales. Se compara un calibrado obtenido utilizando como referencia el electrodo de Ag/AgCl integrado, haciendo fluir la solución 0.1M KCl constantemente, con otros dos calibrados realizados con el referencia comercial ORION. Uno de ellos se realiza haciendo fluir agua por el canal auxiliar y el otro haciendo fluir la solución de cloruros. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.57.



**Figura 4.57:** Comparación de calibrados del electrodo de  $Cl^-$  en diferentes condiciones del electrodo de referencia.

Las pendientes obtenidas son (siguiendo el orden de la leyenda en la figura): 53.544, 44.816 y 50.093 mV/déc, por lo que se descarta la contaminación proveniente del canal auxiliar y se afianza el buen funcionamiento del electrodo de referencia integrado.

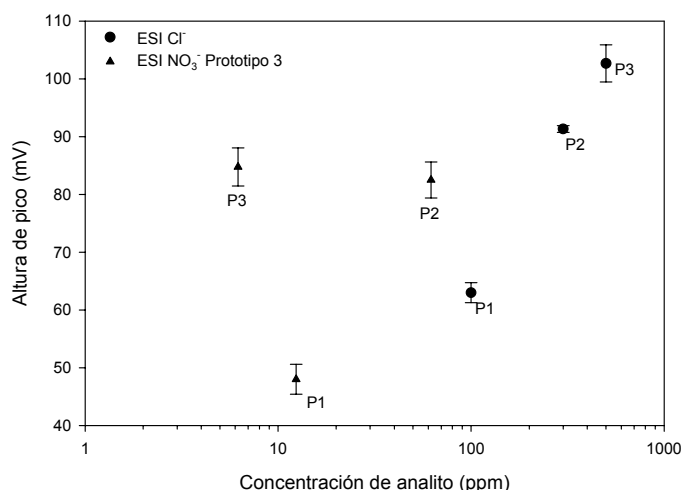
Como alternativa a la configuración del primer prototipo, se construye el segundo. En él se alejan entre sí los dos electrodos selectivos y se sitúa el de  $\text{NO}_3^-$  lo más alejado posible del punto de confluencia entre el canal de muestra y el auxiliar.

Se prepara una nueva membrana de  $\text{NO}_3^-$  y se calibra en discontinuo mediante el uso de un electrodo convencional en forma de lápiz, para comprobar su funcionamiento ( $E=259(\pm 22)-52(\pm 2)\cdot\log[\text{NO}_3^-]$ ;  $r^2>0.99$ ;  $n=3$ , 95%). Se aprovecha el mismo electrodo de  $\text{Cl}^-$  del dispositivo anterior, puliendo su superficie y calibrándolo en discontinuo ( $\Delta E=-43.61+57.135\cdot\log[\text{Cl}^-]$ ;  $r^2=0.9994$ ).

A continuación se preparan patrones mixtos para evaluar el funcionamiento de la combinación de ambos electrodos: P<sub>1</sub>: 100 ppm  $\text{Cl}^-$  + 8 ppm  $\text{NO}_3^-$ ; P<sub>2</sub>: 300 ppm  $\text{Cl}^-$  + 50 ppm  $\text{NO}_3^-$  y P<sub>3</sub>: 600 ppm  $\text{Cl}^-$  + 5 ppm  $\text{NO}_3^-$ . Nuevamente, la evaluación del sistema muestra un funcionamiento anómalo del electrodo de  $\text{NO}_3^-$ .

Dado el buen funcionamiento de la membrana de  $\text{NO}_3^-$  en configuraciones como la DP5 o en electrodos tipo lápiz, se podría concluir que la diferente geometría intrínseca del dispositivo DP6 sería la responsable de la falta de respuesta del electrodo. En este último dispositivo se integra un mezclador tridimensional en forma de serpiente. Hasta ahora, no se había ensayado la combinación de estructuras complejas cerámicas con pistas internas conductoras. En los dispositivos cerámicos son habituales los casos de estrés generados en el proceso de sinterización en presencia de geometrías complejas que, en última instancia, pueden afectar severamente a las pistas metálicas integradas y, como en este caso, a las membranas poliméricas depositadas sobre ellas. Teniendo en cuenta esta hipótesis se construye un último prototipo. Tal y como se puede observar en la figura 4.54, la principal diferencia de este dispositivo respecto a los otros se encuentra en la forma de los canales. En él, se prescinde del mezclador en forma de serpiente para intentar evitar episodios de estrés y saber si es éste el motivo por el cual no funciona el electrodo de  $\text{NO}_3^-$ .

Para la caracterización del sistema, se preparan nuevos patrones mixtos, de concentraciones ligeramente diferentes a las utilizadas en las otras ocasiones (P<sub>1</sub>: 100 ppm  $\text{Cl}^-$  + 12.4 ppm  $\text{NO}_3^-$ ; P<sub>2</sub>: 300 ppm  $\text{Cl}^-$  + 62 ppm  $\text{NO}_3^-$ ; P<sub>3</sub>: 500 ppm  $\text{Cl}^-$  + 6.2 ppm  $\text{NO}_3^-$ ). Para el electrodo de  $\text{Cl}^-$  se considera despreciable la interferencia de ión nitrato; el comportamiento del electrodo de  $\text{NO}_3^-$  se expresa teniendo en cuenta la concentración de  $\text{Cl}^-$  de cada patrón, según la expresión  $E = a + b \cdot \log([\text{NO}_3^-] + k[\text{Cl}^-] + c)$ , donde  $k$  representa la constante de selectividad potenciométrica del electrodo de  $\text{NO}_3^-$  respecto a la presencia de  $\text{Cl}^-$ . Los resultados obtenidos se representan en la figura 4.58.



**Figura 4.58:**  
Calibración de los electrodos integrados en el prototipo 3.

Aplicando un proceso iterativo, la respuesta del sensor de  $\text{NO}_3^-$  en el tercer prototipo se define como:

$$\Delta E = -85(\pm 28) + 74(\pm 14) \cdot \log([\text{NO}_3^-] + 0.4(\pm 0.1)[\text{Cl}^-] + 14(\pm 5)), \quad r^2 = 1 \quad (n=4, 95\%).$$

La respuesta del electrodo de  $\text{Cl}^-$  es:

$$E = -51(\pm 2) + 57(\pm 2) \cdot \log[\text{Cl}^-]; \quad r^2 > 0.99 \quad (n=3, 95\%).$$

Los resultados obtenidos son coincidentes con los sistemas de flujo convencionales, lo que permite confirmar la importancia de la estructura tridimensional en el estrés que ésta pueda ocasionar sobre las pistas conductoras. En el caso de sistemas que integren membranas poliméricas, es aconsejable el uso de canales realizados en bajorelieve.

#### 4.6.4 CONCLUSIONES

Se ha demostrado la posibilidad de desarrollar dispositivos multiparamétricos utilizando la tecnología LTCC. Los resultados obtenidos muestran que, en ocasiones, es preferible utilizar los canales bidimensionales ya que los de configuración tipo serpentín exigen una optimización más rigurosa de los procesos de laminación y sinterización para poder controlar el estrés generado.

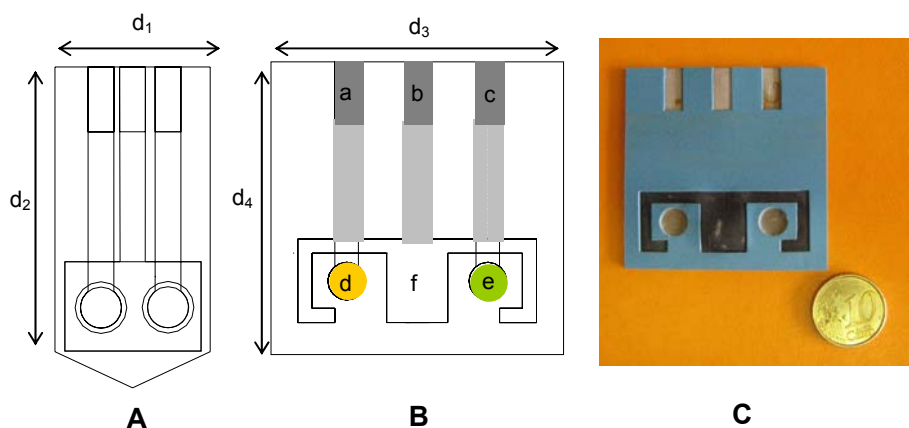
#### 4.7 Sondas de ión nitrato y amonio en suelos (DP7)

Los dispositivos que se muestran a continuación son los únicos construidos para la determinación directa de iones en suelos. La idea original surge de una serie de sondas desarrolladas en el GSB en colaboración con EMBRAPA (Sao Carlos, Brasil) para la monitorización directa de nutrientes en suelos de cultivo. Estos equipos integran diferentes electrodos selectivos a iones basados en las anteriores membranas poliméricas, así como sensores de temperatura y humedad.

El electrodo de referencia utilizado por estas sondas consiste en una placa de cobre metálico sobre la que se forma una capa de óxido, con lo que el par Cu/CuO es el responsable de mantener el potencial de referencia constante.<sup>26,27</sup> Los dispositivos construidos se muestran en la figura 4.59. La única diferencia entre ellos se encuentra en la forma. Se pensó que, dado que los dispositivos debían ir enterrados en un suelo, la forma en flecha de la sonda facilitarían su inserción en el medio.

**Figura 4.59:**

**A y B:** dibujos CAD de dos sondas donde  
 $d_1 = 25.5$  mm;  
 $d_2 = 47$  mm;  
 $d_3 = d_4 = 53$  mm;  
**a:** conexión al ESI **d;**  
**b:** conexión al electrodo de referencia **f;**  
**c:** conexión al electrodo **e.** **C:** fotografía del dispositivo **B.**



Una vez más, se aprovecha la facilidad de construcción de dispositivos multicapa mediante la tecnología LTCC para serigrafar pistas conductoras a diferentes niveles. En este caso, las pistas conductoras de los electrodos selectivos a iones se encuentran en un nivel inferior a la pista que forma el electrodo de referencia. Sobre los círculos designados **d** y **e**, se depositan cada una de las membranas sensoras. En este caso, no es necesario aumentar la viscosidad del cóctel sensor, ya que el área de deposición es elevada ( $\varnothing = 1$  cm) y no existe el peligro de obturar los canales interiores. De este modo, la membrana se deposita gota a gota hasta rellenar completamente la cavidad.

En este dispositivo se evalúan dos tipos de electrodos de referencia. El primero de ellos es el de Ag/AgCl. La anodización de la superficie de Ag se realiza siguiendo la metodología que se había optimizado anteriormente. El otro electrodo de referencia evaluado es el basado en el par Cu/CuO. En este caso, se realiza una electrodeposición de cobre sobre la pista de plata, que se detallará a continuación. Una vez obtenida la capa de cobre, se deja oxidar humedeciendo la superficie de metal para facilitar el proceso de formación de CuO.

Estas experiencias se realizan con dos dispositivos como los que aparecen en la figura 4.59A, tal y como se explica en los siguientes apartados.

<sup>26</sup> Lemos, S.G.; Nogueira, A.R.A.; Torre-Neto, A.; Parra, A.; Artigas, J.; Alonso, J., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 5810.

<sup>27</sup> Parra, A., *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, **2007**.

De todos los dispositivos construidos con detección potenciométrica éste es el único que ha tenido una aplicación diferente al análisis de aguas.

#### 4.7.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Los reactivos utilizados se detallan en la tabla 4.14. No se han descrito los componentes necesarios para preparar las membranas puesto que se pueden encontrar en apartados anteriores (§4.4.1 y §4.5.1).

REACTIVO	CASA COMERCIAL
TRIS	Baker
Cloruro de potasio	Fluka
Cloruro de amonio	Fluka
Sulfato de cobre	Panreac

**Tabla 4.14:** Reactivos utilizados en la evaluación del dispositivo DP7.

#### 4.7.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

Tanto la anodización de la plata como la electrodeposición del cobre se realizaron con una fuente de potencial Blausonic (0-30 V, 2.5 A, DC) y un multímetro Fluke 179 TRUE RMS Multimeter. La formación de la capa de AgCl sobre la pista conductora de plata ya ha sido explicada anteriormente (§4.5.3). En el caso de las sondas, el AgCl formado no se protege de la luz ambiental. El cobre se deposita sumergiendo la zona a cubrir en 100 ml de una solución de  $\text{CuSO}_4$  1 M en constante agitación. Se aplica un voltaje de 0.5 V durante 10 minutos. Después de lavar la sonda con agua bidestilada, se deja en contacto con agua durante 24 horas para favorecer la formación del óxido sobre la pista recubierta de cobre. La caracterización inicial de los dispositivos se realiza en discontinuo, utilizando un potenciómetro Crison micropH 2002 y un conmutador TMI-6017 CONM16.

Seguidamente, la sonda se entierra en suelo fértil y se calibra en ese medio. Finalmente, se planta forraje de crecimiento rápido para comprobar si la sonda era capaz de monitorizar la dinámica de los nutrientes durante el proceso. El montaje experimental se muestra en la siguiente figura:



**Figura 4.60:** Montaje experimental para realizar el calibrado de la sonda en tierra.

### 4.7.3 INFLUENCIA DE LAS VARIABLES QUÍMICAS Y AMBIENTALES EN LA RESPUESTA DE LAS SONDAS

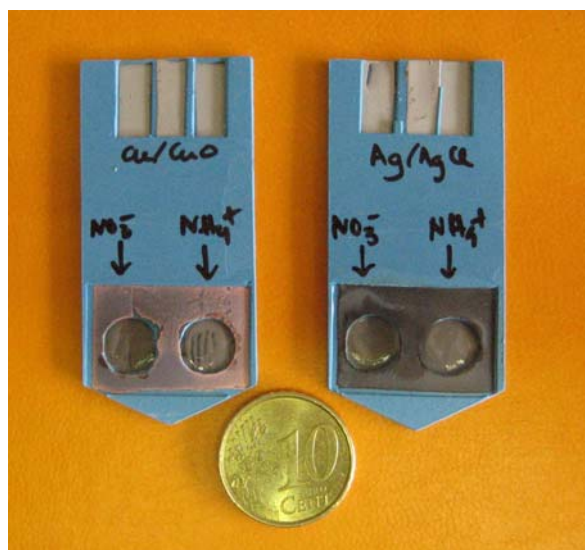
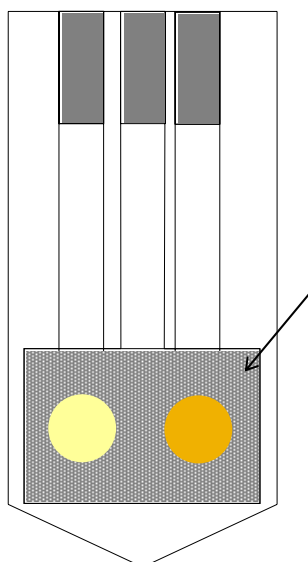
#### 4.7.3.1 Elección del electrodo de referencia

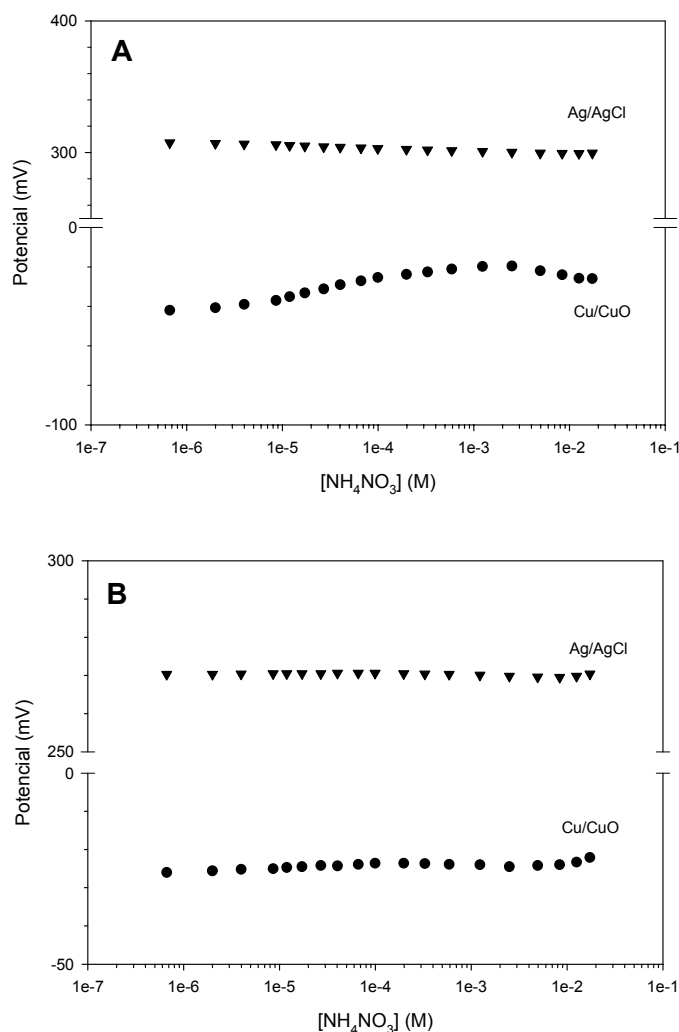
Para evaluar la respuesta de los electrodos de referencia se utilizan las sondas que aparecen en la figura 4.61. En primer lugar se provoca la formación de  $\text{AgCl}$  y  $\text{CuO}$  sobre la superficie de la pasta conductora en base de plata. Posteriormente se sumergen en una solución de TRIS 0.01 M ( $\text{pH}=7.4$ ) y se realizan adiciones de patrones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  para simular el proceso de calibración de la sonda una vez activada con las membranas sensoras. A lo largo del proceso de calibración se utilizan los electrodos de referencia de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  y  $\text{Cu}/\text{CuO}$  como electrodos indicadores y como electrodo de referencia un electrodo de referencia comercial ORION.

Los primeros resultados aparecen en la figura 4.62A. Se puede ver cómo el potencial suministrado por el par  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  tiene más estabilidad a lo largo de las adiciones de diferentes concentraciones de analito que el par  $\text{Cu}/\text{CuO}$ . Dado que se dispone de información previa sobre el buen funcionamiento del par  $\text{Cu}/\text{CuO}$  como electrodo de referencia, es de suponer que la formación de la capa de  $\text{CuO}$  no ha sido completa y se incrementa el tiempo de acondicionamiento en agua del dispositivo para favorecer la oxidación del electrodo de cobre. Tras un periodo adicional de acondicionamiento de 24 h se repite la experiencia anterior obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 4.61B. La respuesta del electrodo de cobre mejora notablemente y presenta resultados similares a los del electrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ .

**Figura 4.61:**

Esquema y fotografía de las sondas con las que se evaluaron los electrodos de referencia. La flecha indica la zona de la pista conductora tratada para conseguir el par correspondiente.





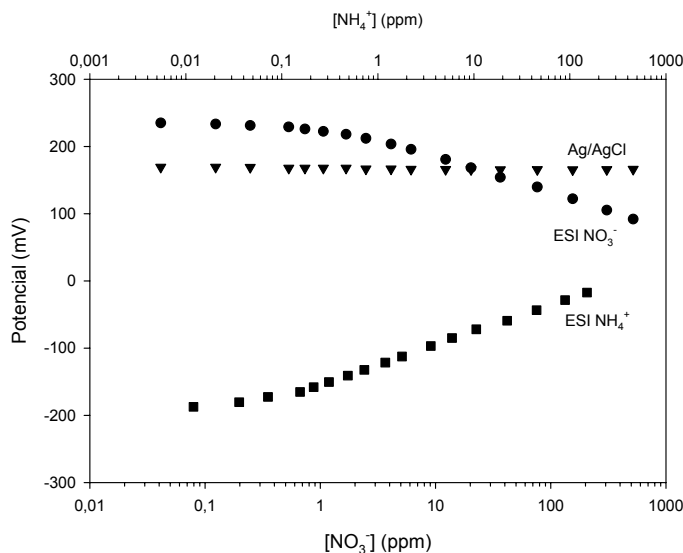
**Figura 4.62:**  
Evaluación de los  
electrodos de referencia  
**A:** primer calibrado  
realizado;  
**B:** calibrado realizado a  
las 24 horas del primero.

El potencial promedio y las RSD obtenidos para los pares Ag/AgCl y Cu/CuO son  $270.3 \pm 0.2$  mV (RSD=0.12%) y  $-24.3 \pm 0.4$  mV (RSD=3.89%), respectivamente. Finalmente, aunque queda demostrada la viabilidad del electrodo de Cu/CuO, se decide utilizar el electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia para futuros experimentos ya que evita el paso previo de depositar electrolíticamente cobre sobre la superficie de la pista conductora y su posterior oxidación.

#### 4.7.3.2 Calibración de la sonda en agua y discontinuo

Aunque la deposición de las membranas ya ha sido anteriormente evaluada, se realiza también un calibrado en discontinuo para comprobar su funcionamiento en este nuevo dispositivo. En esta ocasión, se utiliza el dispositivo que aparece en las figura 4.59B y C, en el que se ha formado un electrodo de Ag/AgCl. Las membranas son depositadas gota a gota y secadas durante toda la noche. Antes de calibrarlas se acondicionan en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.1 M durante 4 horas y después se lavan durante 30 minutos. El calibrado se realiza frente al electrodo comercial ORION.

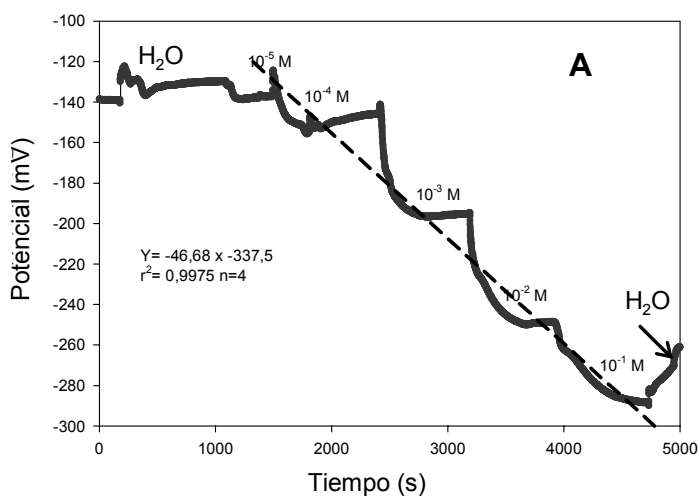
El electrodo de  $\text{NO}_3^-$  proporciona una pendiente de 51.3 mV/déc ( $r^2=0.9973$ ) y el de  $\text{NH}_4^+$  de 49.6 mV/déc ( $r^2=0.9997$ ). El electrodo de referencia evaluado frente al ORION presenta una RSD=0.89%. Las curvas obtenidas aparecen en la figura 4.63:



**Figura 4.63:**  
Calibrado completo de la sonda. Fondo de TRIS 0.01 M (pH=7.3).

#### 4.7.3.3 Calibración de la sonda en suelo

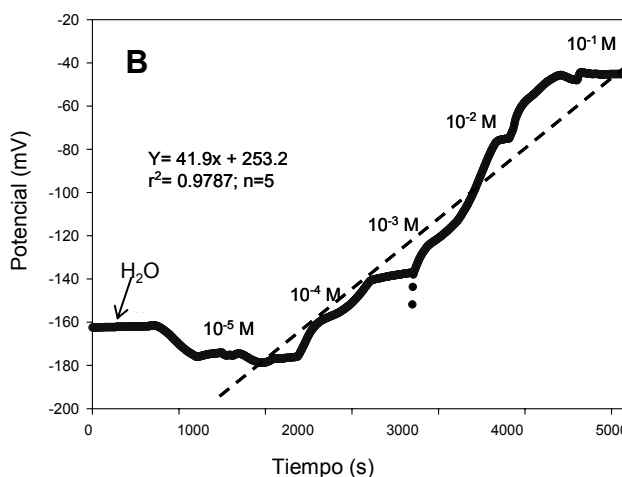
Una vez evaluado el comportamiento de las sondas en solución, se entierran en un suelo fértil estándar tal y como muestra la figura 4.60. Después de un proceso de acondicionamiento del suelo consistente en un lavado de éste con agua bidestilada durante 4 horas, se calibran los dispositivos añadiendo 20 ml de patrones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$ M) y registrando el potencial. Después del último patrón, se añade un exceso de agua para lavar el suelo y conseguir el retorno de la lectura de potencial al valor inicial de línea base. Los resultados obtenidos simultáneamente se muestran en las siguientes gráficas:





**Figura 4.64:**

Calibración de la sonda en suelo.  
**A:** registro obtenido con el sensor de  $\text{NO}_3^-$ ; **B:** registro obtenido con el sensor de  $\text{NH}_4^+$ .



Las rectas de calibrado se construyeron registrando el potencial obtenido al estabilizarse la señal después de cada adición. En ambos casos se obtienen pendientes ligeramente subnernstianas (46.7 mV/déc para  $\text{NO}_3^-$  y 41.9 mV/déc para  $\text{NH}_4^+$ ), siendo la sensibilidad para el catión inferior a la del anión debido a la mayor interacción electrostática del  $\text{NH}_4^+$  con el suelo.<sup>28</sup> Este hecho también se manifiesta en la forma de la curva obtenida (escalones menos definidos que en caso del anión).

#### 4.7.3.4 Monitorización de la dinámica de los nutrientes en un proceso de crecimiento vegetal

Después de comprobar la posibilidad de calibrar el dispositivo directamente en el suelo, se valida el funcionamiento de la sonda para la monitorización de la dinámica de los nutrientes en un proceso de crecimiento de cultivos o plantas. El montaje experimental se muestra en la siguiente fotografía:

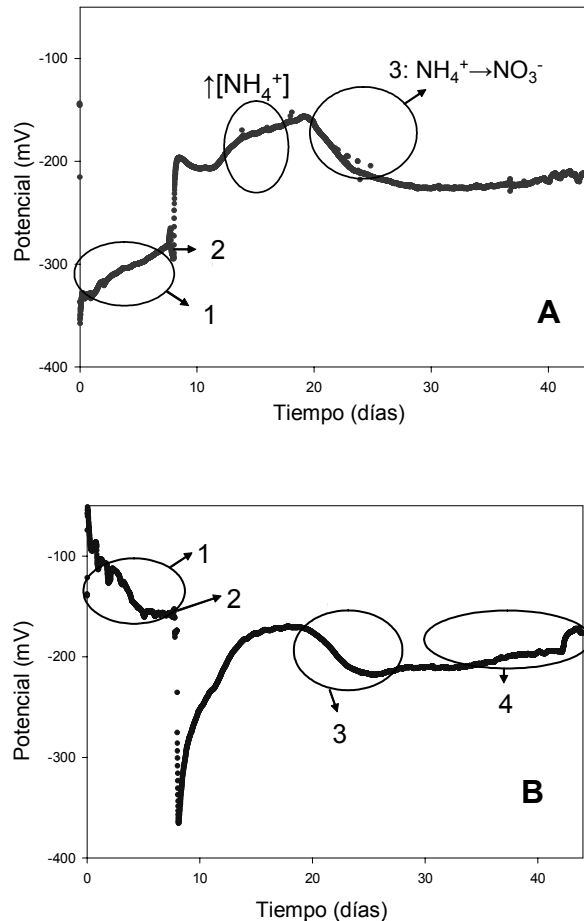
**Figura 4.65:**

Montaje experimental para la monitorización de la dinámica de nutrientes en un proceso de crecimiento vegetal. Se utilizó una fuente de potencial y un Data Logger para la adquisición de datos durante 45 días.



<sup>28</sup> Brady, N.C.; Weil, R.R. in: *The nature and properties of soil*; Prentice Hall, Inc., Upper Saddle, River, NJ; 1996, ISBN: 0-02-313371-6, 11 Ed.

Una vez enterrada la sonda en el suelo fértil, se realiza un proceso de acondicionamiento lavando con agua bidestilada durante 4 horas. Seguidamente se plantan las semillas y se fertilizan con una solución que contiene 1 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  disuelto. Las gráficas de la figura 4.66 muestran la evolución de la concentración de ambos iones a lo largo de un período de 45 días sin interrupción:



**Figura 4.66:**  
**A:** evolución de la concentración de  $\text{NH}_4^+$ ;  
**B:** evolución de la concentración de  $\text{NO}_3^-$ .

Respecto al ión amonio (gráfica 4.66A), la región 1 muestra el cambio de potencial obtenido durante el drenaje con agua. Acto seguido (región 2) se produce la fertilización con lo que tiene lugar un cambio brusco de potencial debido al aporte de  $\text{NH}_4^+$ . La variación máxima detectada por la membrana de  $\text{NH}_4^+$  es del orden de 100 mV. A continuación el potencial decrece (región 3). Este hecho se atribuye, respecto al ión amonio, a la nitrificación (transformación de amonio en nitrato).

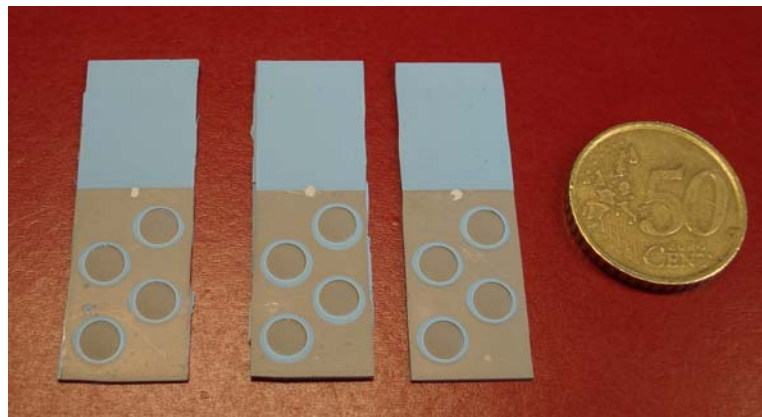
Respecto al ión nitrato, la gráfica 4.66B muestra también una región 1 donde se produce el drenaje del suelo y acto seguido, una disminución del potencial debido al aporte extra de  $\text{NO}_3^-$  (región 2), así como una rápida lixiviación que hace aumentar el potencial. A continuación se observa un incremento en la concentración de nitrato debido al proceso de nitrificación (región 3). Finalmente, el potencial vuelve a crecer debido a un consumo de iones nitrato por parte de los vegetales (región

4), que se traduce en una disminución del potencial registrado por el sensor de  $\text{NO}_3^-$ .

#### 4.7.4 CONCLUSIONES

La sonda fabricada en LTCC proporciona una herramienta útil y robusta para monitorizar la evolución de los nutrientes en el agua intersticial de un suelo. Resultaría muy interesante implementar otras membranas selectivas a iones de interés para conseguir un mapeo exhaustivo del comportamiento de determinados suelos. Dado que la tecnología LTCC permite la integración de circuitos electrónicos, sería también muy útil construir una sonda que implementara el sistema de adquisición, tratamiento y transmisión de datos para dotarla de una mayor autonomía.

Las sondas que se fabrican en la actualidad, que tienen como objetivo la monitorización de nutrientes en campos agrícolas pertenecientes a la EMBRAPA, se basan en los mismos principios de funcionamiento pero su tamaño se ha reducido considerablemente tal y como se puede observar en esta fotografía:



**Figura 4.67:**  
Sondas fabricadas con el  
equipo láser.

Cabe señalar que los resultados obtenidos con ellas son equivalentes a los de las anteriores sondas. Sin embargo, la confirmación de su aplicabilidad general requiere de su evaluación en diferentes tipos de suelos y bajo las estrictas condiciones de campo, que incluyen situaciones diversas como cambios de temperatura o de humedad.

## 5. DISPOSITIVOS AMPEROMÉTRICOS

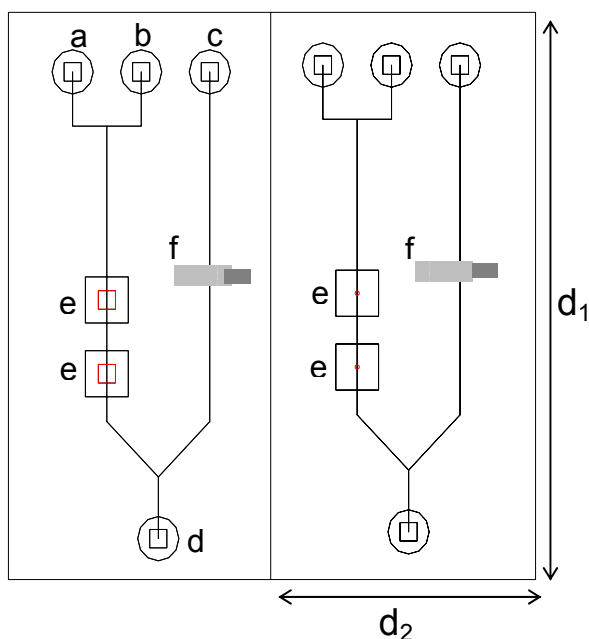
**E**n este capítulo se describe el diseño, fabricación y evaluación de dispositivos miniaturizados que integran monolíticamente detectores electroquímicos basados, en este caso, en medidas amperométricas.

El objetivo de los prototipos construidos es la determinación de pesticidas (organofosfatos, carbamatos, etc.) por el efecto inhibitor que estos presentan sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. Esta enzima cataliza la reacción de hidrólisis de la acetiltiocolina (sustrato) en tiocolina (producto), pudiéndose monitorizar esta última amperométricamente.

### 5.1 Analizador amperométrico de pesticidas (DA)

Como paso previo a la fabricación de este primer prototipo, se construye un dispositivo para verificar la posibilidad de sinterizar láminas de cerámica con placas de platino embebidas en su interior y comprobar su funcionamiento como sistema de medida amperométrico. En la figura 5.1 se muestra un esquema de la configuración de este dispositivo.

**Figura 5.1:**  
Dispositivos para la evaluación de la integración del sistema de medida amperométrico:  
**a:** entrada de muestra;  
**b:** entrada de tampón;  
**c:** entrada de solución de KCl; **d:** desecho;  
**e:** electrodos de platino;  
**f:** electrodo de referencia.  
 $d_1 = 5.2$  cm;  $d_2 = 2.6$  cm.



Las zonas en gris indican el electrodo de referencia que, al igual que en otros dispositivos, se coloca en un canal auxiliar por el que se hacía fluir una solución de KCl para mantener un potencial de referencia constante.

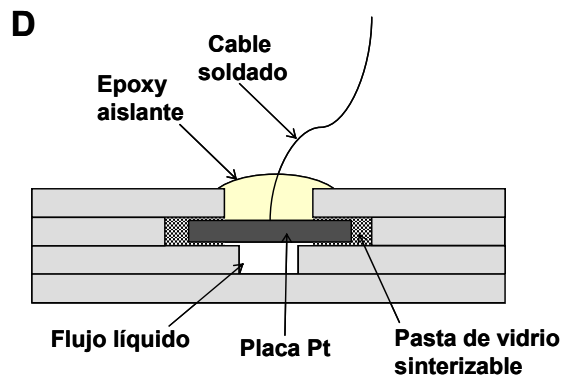
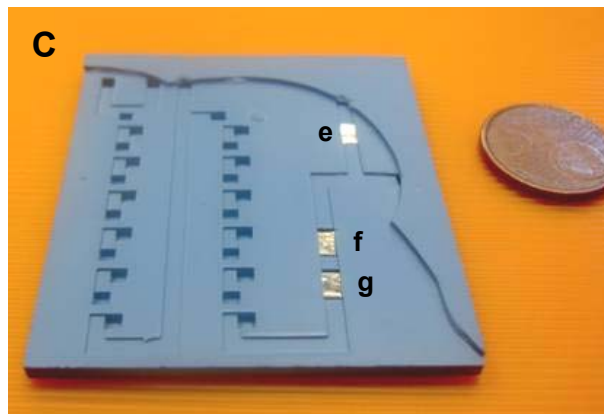
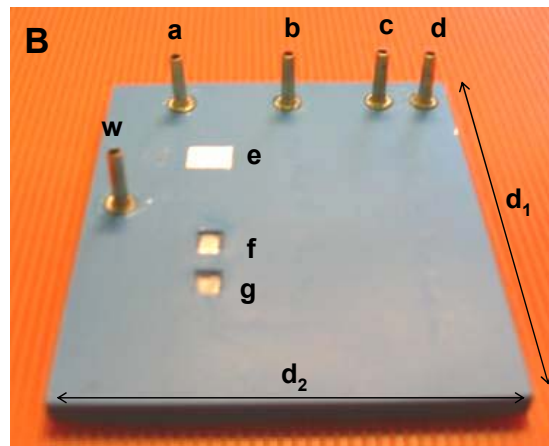
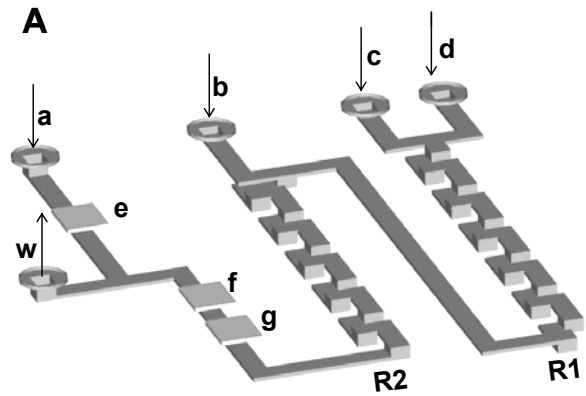
La diferencia entre la configuración de ambos dispositivos se encuentra en cómo se conectan las placas de platino al sistema de medida externo. En el caso del prototipo de la izquierda, se deja una área rectangular abierta (indicada en rojo) que permite soldar cables directamente sobre la superficie del metal integrado en la cerámica. En el dispositivo de la derecha, la conexión entre el platino y el exterior se realiza mediante vías (también indicadas en rojo) rellenas con pasta conductora. En ambos casos se obtienen respuestas satisfactorias. Sin embargo, se escoge la metodología de conexionado mediante el uso de vías por ser más robusta y de fácil construcción.

Los experimentos preliminares realizados con ambos prototipos consisten en la medida de la intensidad resultante de la oxidación de varios patrones de tiocolina. Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad del sistema de detección construido (la inserción de las placas metálicas y el funcionamiento, ya evaluado, del electrodo de referencia), por lo que se diseña y fabrica un prototipo, algo más complejo, que integra monolíticamente el sistema de detección (las dos placas de platino, que actuarían como electrodos de trabajo y auxiliar y el electrodo de referencia) y dos mezcladores tridimensionales que actuarían como reactores.

El diseño del primer analizador construido se muestra en la figura 5.2. Se puede observar como consta de dos reactores (R1 y R2). En R1 tiene lugar la mezcla de la enzima con la muestra (que puede contener pesticidas). En R2, se produce la reacción catalizada por la enzima (inhibida o no en función de la presencia de pesticidas en la muestra) con el sustrato, dando lugar a una especie electroactiva medible por el sistema de detección.

Como primera aproximación, los dos reactores o mezcladores se construyen en forma de serpentina para garantizar la máxima eficiencia en la mezcla entre reactivos. Una vez sinterizado el dispositivo, las dimensiones de los canales internos fueron de 1.7 mm de ancho y 220  $\mu\text{m}$  de altura. Cada reactor tiene un volumen de 164  $\mu\text{l}$ .

La figura 5.2C muestra el interior de un dispositivo deslaminado, donde se pueden observar los tres electrodos del sistema amperométrico de medida, así como los dos reactores.



**Figura 5.2:**

Dispositivo utilizado para realizar detección amperométrica con mezclador serpentina.

**A:** estructura interna tridimensional.

**B y C:** fotografías del dispositivo después de sinterizar.

**D:** integración de la placa de platino en la cavidad cerámica.

**a:** entrada disolución de KCl 0.1M (referencia);

**b:** entrada de solución de acetilcolina;

**c:** entrada de solución de pesticida o agua;

**d:** entrada de solución de enzima;

**e:** pista conductora (conectada al electrodo de referencia interno);

**f:** electrodo auxiliar de platino;

**g:** electrodo de trabajo de platino;

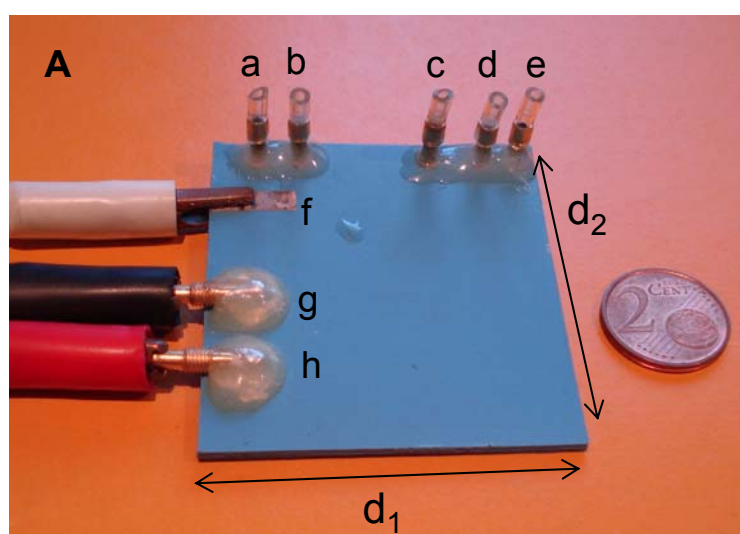
**w:** desecho;

**d<sub>1</sub>:** 5 cm; **d<sub>2</sub>:** 5 cm;

**R1:** reactor 1;

**R2:** reactor 2.

A lo largo de la caracterización y evaluación del dispositivo (descritos en los apartados siguientes) se observan ciertas anomalías en la respuesta aparentemente asociadas a la acumulación de enzimas, ya sea en los codos de 90° de los reactores serpentina, o bien a lo largo del recorrido fluídico debido a la rugosidad de las paredes del dispositivo. Cabe recordar que esta rugosidad se genera por el uso de brocas durante el mecanizado. Para intentar evitar este fenómeno, se construye otro dispositivo con el mismo sistema de detección pero con reactores de configuración bidimensional, tal y como se muestra en la figura 5.3. Después del proceso de sinterización, las medidas de los canales internos fueron: 1.7 mm de ancho y 430  $\mu\text{m}$  de altura. Cada reactor se diseña para que tenga un volumen lo más parecido posible a los volúmenes del primer prototipo (164  $\mu\text{l}$ ).<sup>1</sup>



**Figura 5.3:**

**A:** fotografía del dispositivo con los conectores eléctricos y fluidicos; **B:** estructura interna tridimensional, donde:

**a:** desecho;

**b:** entrada de disolución de KCl 0.1M;

**c:** entrada de acetiltiocolina;

**d:** entrada de agua/muestra;

**e:** entrada de enzima;

**f:** pista conductora (conectada al electrodo de referencia interno);

**g:** electrodo auxiliar de platino y conexión;

**h:** electrodo de trabajo de platino y conexión;

**$d_1$ :** 5cm;  **$d_2$ :** 5cm;

**R1:** reactor 1;

**R2:** reactor 2.

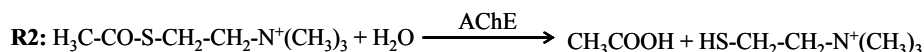
<sup>1</sup> Llopis, X.; Ibañez-García, N.; Alegret, S.; Alonso, J. *Anal. Chem.*, DOI: 10.1021/ac062390z

### 5.1.1 MATERIALES Y REACTIVOS

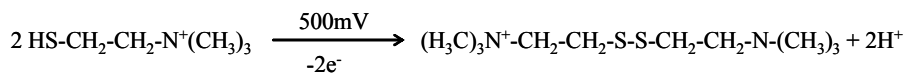
EQUIPO/REACTIVO	CASA COMERCIAL
Bomba peristáltica Minipuls 3	Wilson (Wisconsin, USA)
Válvula inyectora de 6 vías	Omnifit (NJ, USA)
Tubos de silicona (d.i.: 1.02 mm)	Ismatec (Zurich, Suiza)
Tubos de teflón (d.i.: 0.8 mm)	Scharlab (Cambridge, UK)
Amperímetro	Bioanalytical Systems LC-4C
Cloruro de potasio	Fluka
Hidrógenofosfato de sodio	Fluka
Dihidrógenofosfato de sodio	Fluka
Cloruro de acetiltiocolina	Sigma
Acetilcolinesterasa	Sigma
Carbofurano	Riedel-de Haën

**Tabla 5.1:** Listado general de los equipos y reactivos utilizados a lo largo de la evaluación de los dispositivos cerámicos.

Los patrones de pesticida se preparan diariamente por dilución en agua bidestilada a partir de una solución madre de  $2.3 \cdot 10^{-4} \text{M}$  en etanol (para ayudar a la disolución del analito). Las posteriores diluciones se realizan en agua bidestilada. Los patrones de cloruro de acetiltiocolina se preparan en un tampón fosfato 0.1 M y KCl 0.1 M ajustado a pH 7.4 (denominado tampón A). La acetilcolinesterasa (tipo VI-S de anguila eléctrica) se disuelve en un tampón fosfato 0.2 M y 0.2 M KCl a pH 7.4 (denominado tampón B). El tampón B en el que se disuelve la enzima tiene una concentración doble a la del tampón de la acetiltiocolina (tampón A) para que cuando la enzima se mezcle con agua/muestra en R1, se obtenga un tampón de concentración 0.1 M. Así, enzima y sustrato están diluidos en tampones de igual concentración cuando se mezclan en R2. En el siguiente esquema se muestran las reacciones que tienen lugar en la determinación:



**Electrodo de trabajo:**



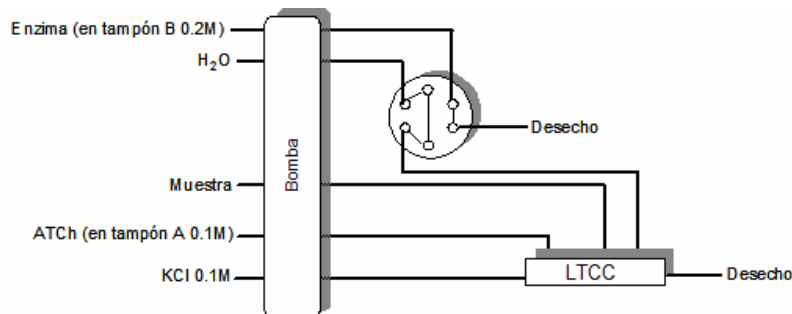
La solución madre 0.1 M de tiocolina utilizada para la evaluación de los dispositivos se prepara a partir de 100 ml de solución de acetiltiocolina 0.1 M en tampón A, a la que se le añaden 25 unidades de acetilcolinesterasa y se deja reaccionar durante 3 horas.<sup>2</sup> Los patrones de tiocolina se prepararon por dilución de la solución madre en tampón A.

<sup>2</sup> Joshi, K.A.; Tang, J.; Haddon, R.; Wang, J.; Chen, W.; Mulchandani, A. *Electroanalysis*, **2005**, *1*, 54.



### 5.1.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

El montaje experimental utilizado para la evaluación de ambos prototipos (mezclador tridimensional y bidimensional) se muestra en la figura 5.4.

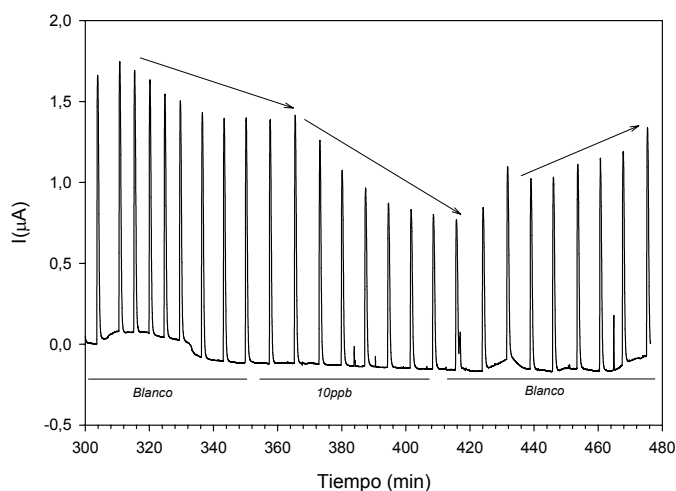


**Figura 5.4:**  
Esquema del sistema de flujo empleado para la evaluación de DA.

### 5.1.3 EVALUACIÓN DEL MICROSISTEMA CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

#### 5.1.3.1 Elección de la geometría del dispositivo

El primer dispositivo evaluado es el que se muestra en la figura 5.2. El objetivo de los mezcladores tridimensionales es el generar una turbulencia suficientemente elevada para favorecer la mezcla entre reactivos. A pesar de las ventajas inherentes a esta configuración, cuya idoneidad ya quedó demostrada en otros dispositivos desarrollados en esta tesis, su uso en sistemas con reactivos enzimáticos resulta poco adecuada. La figura 5.55 muestra los resultados preliminares obtenidos cuando se inyectaron sucesivamente agua (blanco) o 100  $\mu$ l de pesticida (en el canal marcado como “H<sub>2</sub>O”) y el enzima (0.3 unidades) por el canal “Muestra”:



**Figura 5.5:**  
Experimentos de inhibición preliminares. Inyecciones de 100  $\mu$ l de pesticida (carbofuran 10 ppb) a un caudal de 1.16 ml/min. [ATCh] = 5 mM; [AChE] = 0.3 U. Uso del electrodo de referencia integrado.

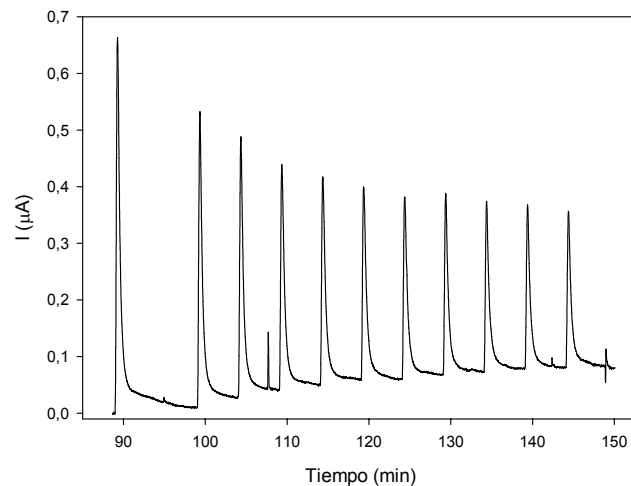
Se pueden observar dos tipos de anomalías: la disminución continuada de la altura de pico y la variabilidad en la línea base. La disminución del pico estaría relacionada con una posible pasivación del electrodo y el aumento de la línea base a la acumulación de enzima a lo largo del recorrido de los mezcladores, que impediría una correcta limpieza del sistema entre análisis.

Dado que la acetiltiocolina fluye constantemente a través del sistema, la enzima residual iría reaccionando progresivamente con ella, generando un nivel de tiocolina no deseado y cada vez mayor, que se traduciría en un aumento de la línea base.

Con el objetivo de eliminar el problema de la acumulación de enzima, se construye el segundo prototipo que difiere del anterior en la forma de los canales, tal y como ya se ha comentado.

En la evaluación preliminar del dispositivo, se observa de nuevo una disminución en la altura de los picos al realizarse inyecciones de tiocolina, tal y como se pone de manifiesto en la figura 5.6.

**Figura 5.6:**  
Inyecciones consecutivas de una solución de tiocolina 100 mM (volumen de inyección: 100  $\mu$ l; caudal: 1 ml/min).



Dado que en este experimento no se ha utilizado enzima, la irreproducibilidad de la señal no puede atribuirse a la acumulación del catalizador a lo largo de los canales del dispositivo. Por este motivo, se baraja como hipótesis la posible pasivación de la superficie del electrodo de trabajo. En la literatura se plantea como origen de este problema, la electropolimerización de la tiocolina, lo que conlleva a una disminución de la sensibilidad del sistema, ya que la superficie efectiva del electrodo se ve reducida drásticamente.<sup>3</sup> La primera solución propuesta se basa en la aplicación de un potencial inverso (-500 mV) después de cada análisis para solubilizar las sustancias polimerizadas sobre el platino. Sin embargo surgen inconvenientes asociados a la dificultad de encontrar un tiempo óptimo de aplicación del potencial inverso que compatibilice una limpieza efectiva y un tiempo de estabilización de línea base reducido después de cada aplicación.

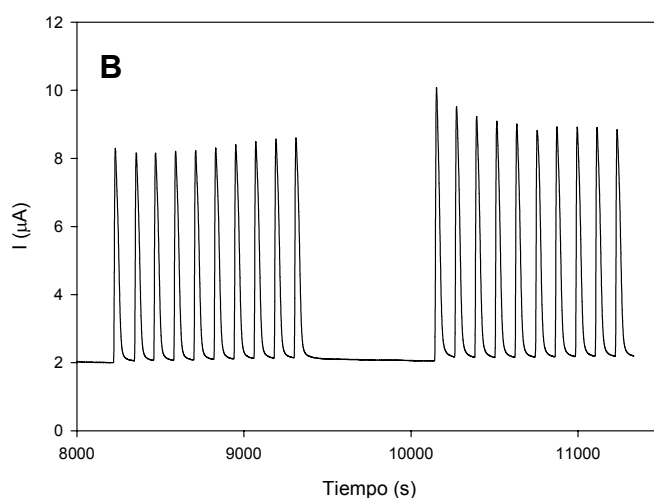
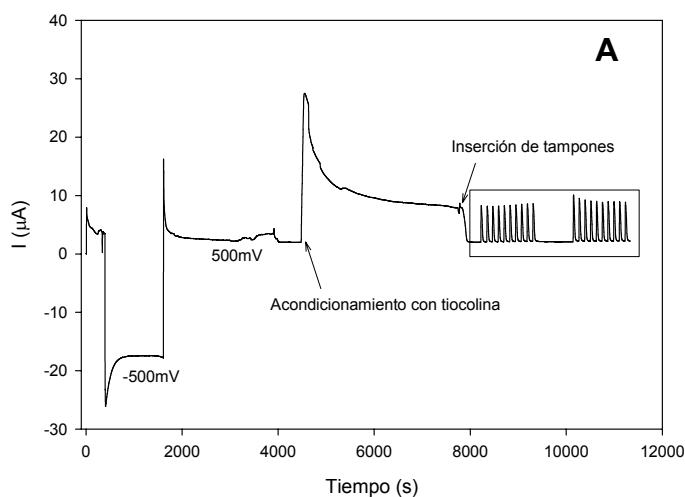
Durante las experiencias realizadas se observa que la pasivación de los electrodos se produce hasta un cierto nivel, a partir del cual, las alturas de pico obtenidas comienzan a ser reproducibles. Aprovechando este hecho, se realizan experimentos en los que, deliberadamente, se pasiva todo lo posible la superficie del electrodo y a continuación se realizan inyecciones sucesivas de un patrón.

<sup>3</sup> Barrow, G.M. in: *Physical Chemistry*. MC Graw-Hill (Ed.), 1973, pp 703-726.

Inicialmente se limpian los electrodos aplicando un potencial de -500 mV durante 20 minutos. A continuación se aplica un potencial de oxidación de 500 mV y, después de estabilizar la línea base, se hace fluir el analito a determinar (tiocolina en nuestro caso) a través del sistema para pasivar la superficie de los electrodos. Este proceso se lleva a cabo hasta que la señal registrada sea constante de nuevo. En ese momento, se introducen en el sistema los tampones necesarios para llevar a cabo la determinación y se realizan inyecciones de tiocolina.

En la figura 5.7 se puede observar el procedimiento seguido. Entre las dos secuencias de análisis (ampliación en Figura 5.7B) transcurren 14 minutos y los valores medios de intensidad obtenidos son los siguientes:  $6.23 \pm 0.08 \mu\text{A}$  y  $7.0 \pm 0.3 \mu\text{A}$ . La RSD obtenida es de 2.1%.

El procedimiento de pasivación de la superficie de los electrodos de platino resulta ser adecuado para estabilizar la respuesta del electrodo, aumentando así la reproducibilidad de las medidas. Dado que la pasivación tiene lugar al mismo tiempo que se lleva a cabo la estabilización de la línea base, esta etapa de acondicionamiento de los electrodos no ralentiza o complica el funcionamiento del sistema de análisis.

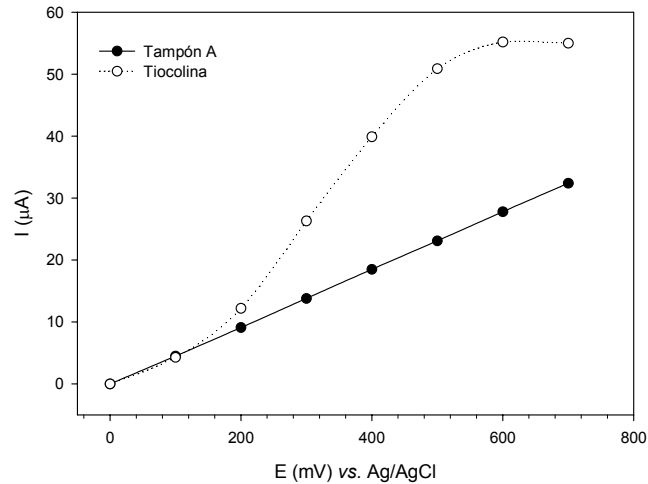


**Figura 5.7:**  
**A:** Pasivación controlada de la superficie de los electrodos con tiocolina 5 mM e inyección de 25  $\mu\text{l}$  de la misma solución a un caudal de 0.75 ml/min;  
**B:** ampliación de la zona destacada en la figura 5.7A.

### 5.1.3.2 Optimización de las variables experimentales

En primer lugar, se procede a optimizar el potencial aplicado para la oxidación de la tiocolina en el sistema empleado.

**Figura 5.8:**  
Voltametrías  
hidrodinámicas del  
tampón A y de tiocolina  
2 mM.  
Caudal: 0.5 ml/min.  
Barrido de potencial de  
0 a 700 mV  
(incrementos de 100  
mV).

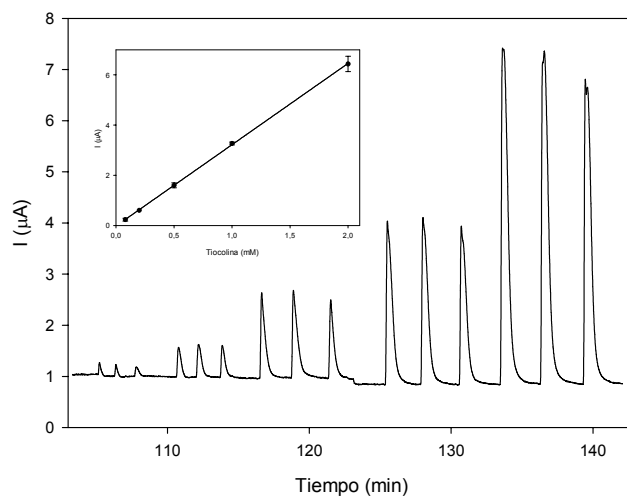


Para ello se realizan experiencias análogas a las voltametrías hidrodinámicas consistentes en hacer fluir constantemente, en primer lugar, el tampón A (0.1 M) a través del dispositivo y medir la corriente a diferentes potenciales de trabajo dentro del rango de 0 a 700 mV en intervalos de 100 mV. Esto nos permite determinar el ruido de fondo. En segundo lugar se hace fluir acetiltiocolina (2 mM) a través del dispositivo y se repiten las medidas de corriente en cada uno de los potenciales aplicados. Tal y como es de esperar, el ruido de fondo aumenta a medida que lo hace el potencial de oxidación aplicado, debido a la aparición de corrientes no faradaicas. La máxima relación intensidad/ruido se obtiene para un potencial aplicado de 500 mV vs. Ag/AgCl.

El funcionamiento del sistema de detección (cabe recordar que siempre se está trabajando con el electrodo de referencia Ag/AgCl integrado) se comprueba mediante la realización de un calibrado con diferentes patrones de tiocolina. Para llevar a cabo el calibrado, las entradas b y c del sistema (ver Figura 5.3) son bloqueadas por ser innecesarias. Por la entrada e se inyectan los patrones de tiocolina. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.9. Se obtiene un rango lineal entre 0.08 y 2 mM de tiocolina y una pendiente de  $3.239 \mu\text{A}/\text{mM}$  ( $r^2$  0.9994). La sensibilidad obtenida se considera adecuada para permitir la detección de las concentraciones de tiocolina que pueden llegar a ser producidas en el sistema enzimático.

**Figura 5.9:**

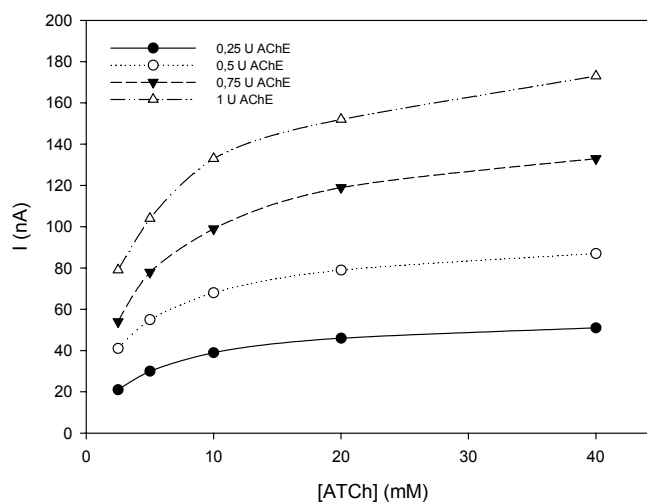
Registro de los picos obtenidos y recta de calibrado del microsistema frente a tiocolina. Se usaron patrones de 0.08, 0.2, 0.5, 1 y 2 mM. Volumen de inyección: 25  $\mu$ l; caudal: 1.0 ml/min; potencial: 500 mV vs. Ag/AgCl. Solución transportadora: tampón A.



Por otro lado, la optimización de la concentración de sustrato y de enzima se lleva a cabo mediante la obtención de las curvas de Michaelis-Menten (ver Figura 5.10). Se inyectan 25  $\mu$ l de cuatro concentraciones diferentes de enzima en un flujo de sustrato y se registra la intensidad generada en cada caso. Esta operación se repite para concentraciones de ATCh de 2.5, 5, 10, 20 y 40 mM. La concentración mínima de ATCh a utilizar en los ensayos de inhibición es de 10 mM, ya que para concentraciones inferiores la velocidad de la reacción enzimática depende de la concentración de sustrato. Este hecho puede inducir a un error durante el proceso de medida dado que la ATCh sufre hidrólisis espontánea, incluso sin estar en presencia de enzima. Sin embargo, el uso de concentraciones de sustrato muy elevadas puede limitar la sensibilidad del sistema, puesto que cuesta más detectar una disminución en la señal inhibida. Como valor de compromiso entre la sensibilidad y el coste del producto se escoge una concentración de enzima de 0.5 U.

**Figura 5.10:**

Curvas de Michaelis-Menten. Volumen de inyección: 25  $\mu$ l. Caudal: 0.5 ml/min



### 5.1.3.3 Evaluación del sistema

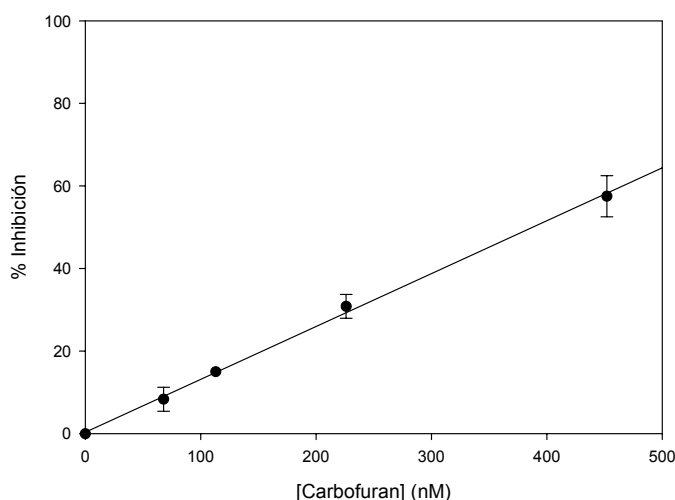
Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se realiza un calibrado con inhibición. Experimentos preliminares muestran que un caudal de 0.5 ml/min (el habitual hasta el momento) es demasiado elevado dada la cinética lenta de la reacción enzimática, por lo que se reduce hasta 96  $\mu\text{l}/\text{min}$ . La señal del blanco se obtiene haciendo fluir agua como muestra y la señal inhibida haciendo fluir patrones de carbofurano (68, 113, 226 y 453 nM). El porcentaje de inhibición se calcula como:

$$\%I = \frac{I_{\text{blanco}} - I_{\text{inhibición}}}{I_{\text{blanco}}} \cdot 100$$

Los resultados aparecen en la figura 5.11. La sensibilidad obtenida es de 0.128 % I/nM ( $r^2=0.9983$ ). El límite de detección se calcula como la concentración de pesticida que produce un 5% de inhibición,<sup>4</sup> dando un resultado de 36 nM. Actualmente, el límite legal está fijado en 0.1  $\mu\text{g}/\text{l}$  para pesticida individual (0.45 nM si es carbofuran) y 0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  para pesticidas totales.<sup>5</sup>

Cada análisis (consistente en un triplicado del blanco y un triplicado de la inhibición) se realiza en 20 minutos, lo que supone una frecuencia de muestreo de 3 análisis/hora (18 medidas/hora).

**Figura 5.11:**  
Calibrado con inhibición de carbofurano. Potencial aplicado: 500 mV vs. Ag/AgCl; caudal: 0.096 ml/min; Volumen de enzima: 25  $\mu\text{l}$  de una solución madre de 0.5 U/ml (0.0125 U); [ATCh]= 10 mM; tampón A (pH 7.4).



### 5.1.4 CONCLUSIONES

En este capítulo se ha demostrado la posibilidad de aplicar la tecnología LTCC para la fabricación de un dispositivo analítico con detección amperométrica. El analizador miniaturizado incorpora el electrodo de referencia anteriormente evaluado y dos placas de platino como electrodos de trabajo y auxiliar.

<sup>4</sup> Nunes, G.S.; Skladal, P.; Yamanaka, H.; Barceló, D. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 362, 59.

<sup>5</sup> Directiva 80/778/CEE relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.

La incorporación de las placas metálicas ha resultado ser perfectamente compatible con las cerámicas verdes.

Los mezcladores pasivos integrados permiten realizar análisis en un tiempo realmente corto gracias a una mezcla efectiva entre reactivos.

El dispositivo fabricado podría ser utilizado para cualquier otra aplicación analítica basada en medidas amperométricas que requiriese de una o dos etapas de mezcla, incluso cuando las reacciones implicadas fueran de cinética lenta.

Actualmente, se encuentra ya en fase de desarrollo un microsistema para la determinación de ión plomo que incorpora los elementos necesarios para realizar una voltamperometría de redisolución anódica (utilizando ésta como método de preconcentración del metal) y la detección potenciométrica posterior del plomo utilizando un electrodo selectivo de membrana polimérica. Con ello se pretende desarrollar un microsistema analítico portátil capaz de determinar in-situ el cumplimiento de la normativa comunitaria relativa al contenido de plomo en aguas potables y redes de distribución (10 ppb en el 2013).

## 6. DISPOSITIVOS ÓPTICOS

**D**e entre los diferentes principios de detección empleados en Química Analítica, los métodos ópticos ocupan un lugar prominente. Este hecho es debido fundamentalmente a dos factores: por un lado su elevada sensibilidad y por otro la amplia variedad de reactivos auxiliares existentes que permiten mejorar la selectividad intrínseca del fenómeno óptico utilizado. En este apartado se ha explorado la integración de sistemas de detección ópticos sobre plataformas de microfluídica fabricadas mediante la tecnología LTCC. Con el objetivo de visualizar la potencialidad y versatilidad de esta tecnología para el desarrollo de microanalizadores con detección óptica, se han fabricado dispositivos basados tanto en medidas de absorción molecular como quimioluminiscentes.

### 6.1 Analizador de ión nitrito con integración monolítica de celda de detección óptica (DO1)

En este primer dispositivo se ha pretendido demostrar la posibilidad de diseñar microanalizadores basados en medidas de absorción molecular en la zona del visible. En general, la determinación de parámetros químicos en base a este tipo de medidas exige el uso de reactivos auxiliares que permitan selectivizar la respuesta obtenida. Esta selectividad se consigue determinando indirectamente el parámetro de interés tras su reacción selectiva con un reactivo auxiliar (cromogénico) presente en exceso. El producto de la reacción debe presentar unas propiedades espectroscópicas diferenciadas. La sencillez tanto conceptual como experimental de esta metodología ha favorecido su amplia implantación en los laboratorios de análisis de rutina.

Un factor crítico de este tipo de metodologías ópticas de análisis es la consecución de una adecuada mezcla entre el reactivo auxiliar y la muestra. Para conseguir este objetivo, especialmente crítico cuando se trabaja sobre estructuras bidimensionales de microfluídica, se han fabricado microcanales que realizan múltiples giros de 90 grados. Esta geometría provoca la aparición de perfiles caóticos de flujo que favorecen notablemente la mezcla.<sup>1</sup>

Por otro lado, un factor de enorme importancia en el escalado de las técnicas ópticas de análisis basadas en la absorción de radiación es el hecho de que la sensibilidad dependa directamente del camino óptico. Si éste se reduce drásticamente, la población de moléculas capaces de absorber también lo hace y con ello se incrementa el límite de detección.

---

<sup>1</sup> Baeza, M.D.M.; Ibanez-Garcia, N.; Baucells, J.; Bartroli, J.; Alonso, J. *Analyst*, **2006**, *131*, 1109.



Para minimizar este problema sin perder las ventajas inherentes a la miniaturización, el dispositivo diseñado integra monolíticamente una configuración de celda de detección que pretende compensar la disminución del camino óptico mediante un incremento de la anchura del haz.

En lo relativo a la determinación de ión nitrito, nuestro grupo de investigación ya ha desarrollado dos equipos, uno macro y otro micro, basados en medidas de absorbancia para la determinación de este parámetro. El primero, comercializado bajo el nombre de Aquanitri<sup>®</sup>,<sup>2</sup> incorpora una membrana de difusión gaseosa para evitar interferencias de la matriz de la muestra y el segundo tiene como componente clave una estructura microfluídica fabricada en silicio mediante tecnología microelectrónica.<sup>1</sup> En ambos casos, la determinación de ión nitrito se basa en la reacción de Griess-Ilosvay. El ión nitrito reacciona con sulfanilamida y con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamida (NED) para formar un colorante azoico. La absorción del producto formado permite determinar, de forma indirecta, la concentración de nitrito. La validación de los dos analizadores se ha realizado aplicándolos a la monitorización de nitrito en procesos de depuración biológica de aguas residuales.

Para la caracterización del dispositivo fabricado con tecnología LTCC se ha utilizado la misma reacción química de reconocimiento.

### 6.1.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Para la evaluación de todos los dispositivos diseñados y fabricados en este capítulo se ha utilizado la instrumentación que se detalla en la tabla 6.1.

EQUIPO	CASA COMERCIAL
Bomba peristáltica Minipuls 3	Wilson (Wisconsin, USA)
Válvula de distribución de 6 vías	Omnifit (NJ, USA)
Tubos de silicona (d.i: 1.02 mm)	Ismatec (Zurich, Suiza)
Tubos de teflón (d.i.: 0.8 mm)	Scharlab (Cambridge, UK)
Microbureta XP3000 <i>Modular Digital Pump</i> Cattro	Tecan (Zurich, Suiza)
Válvulas de 3 vías 161T031	NResearch (NJ, USA)
Espectrofotómetro Pharmacia LKB	Novaspec II (Québec, Canadá)
Celda de flujo 178.712-QS (de cuarzo Suprasil, camino óptico: 10 mm; altura al centro: 15 mm)	Hellma (Müllheim, Alemania)

**Tabla 6.1:** Listado general de los equipos utilizados a lo largo de la evaluación de los dispositivos ópticos.

Los reactivos utilizados específicamente para este dispositivo son:

<sup>2</sup> Massana, M. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, 2006.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Nitrito de potasio	Fluka
Ácido fosfórico (85%)	Panreac
NED (99%)	Panreac
Sulfanilamida (98%)	Panreac

**Tabla 6.2:** Reactivos utilizados en la evaluación del dispositivo DE1.

La solución de reactivo colorimétrico se prepara añadiendo 100 ml de  $H_3PO_4$  y 10 g de sulfanilamida a 800 ml de agua bidestilada. Tras la completa disolución de la sulfanilamida, se añaden 10 g de NED y se enrasa el matraz hasta 1 litro. Una vez preparada, la disolución se introduce en una botella oscura y se guarda en nevera a 4°C.<sup>3</sup> En estas condiciones, el reactivo se mantiene estable al menos durante un mes. Los patrones de nitrito se preparan diariamente a partir de una solución madre de 1000 ppm obtenida por pesada de nitrito de potasio y guardada también en refrigeración.

La caracterización de las variables hidrodinámicas del sistema se lleva a cabo en ausencia de reacción química. Para ello se utiliza directamente el colorante azoico obtenido al hacer reaccionar, en el propio matraz aforado, un patrón de nitrito con un volumen determinado de reactivo de Griess-Ilosvay. A este producto se le llama de aquí en adelante “colorante”.

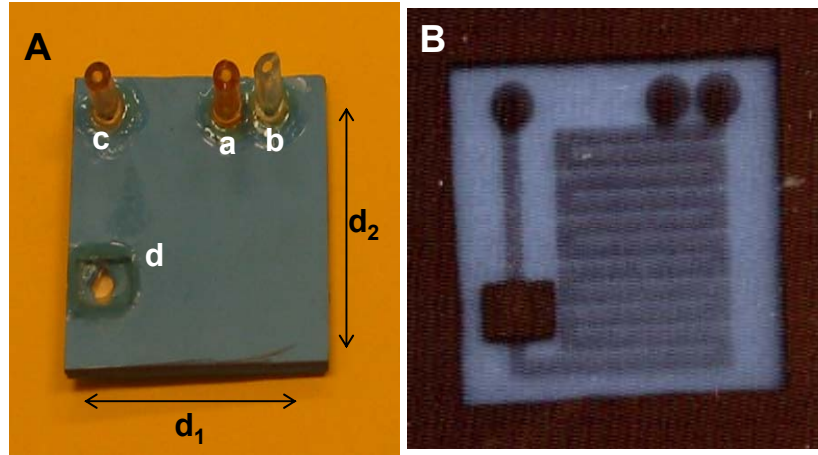
### 6.1.2 DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL MICROSISTEMA

Para el diseño del dispositivo basado en tecnología LTCC se tomó como modelo el dispositivo previamente fabricado en silicio con tecnología IC.<sup>1,3</sup> En la figura 6.1 se muestra una fotografía del dispositivo así como una imagen de rayos X que permite visualizar la estructura interna de microcanales. Dado que en el momento de fabricación de estos dispositivos no se disponía del equipo de micromecanización láser, se hacía difícil realizar canales pequeños con poca separación entre sí (1 mm), ya que en muchas ocasiones la estructura sufría roturas durante el mecanizado. Tal y como se comentó en el apartado §3.2, en estos casos resultaba interesante trabajar con la técnica de bajo relieve. En este dispositivo en particular, se laminaron 3 capas de cerámica (a 100°C y 4000 psi durante 3-4 minutos). Después de ello se realizaron los canales con una broca de 1 mm de diámetro. Los canales antes de la sinterización tienen unas dimensiones de 1 mm de ancho y 350µm de profundidad (regulada mediante el micrómetro del equipo CNC). En el Anexo C se puede observar con más detalle la geometría de las capas involucradas en el diseño del dispositivo.

<sup>3</sup> Baeza, M. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, 2003.

Teniendo en cuenta la posición de la ventana para la detección óptica (que atravesaba el dispositivo de superficie a superficie), el camino óptico resultante fue de  $1800\ \mu\text{m}$  (correspondiente a las 9 capas constituyentes del microanalizador).

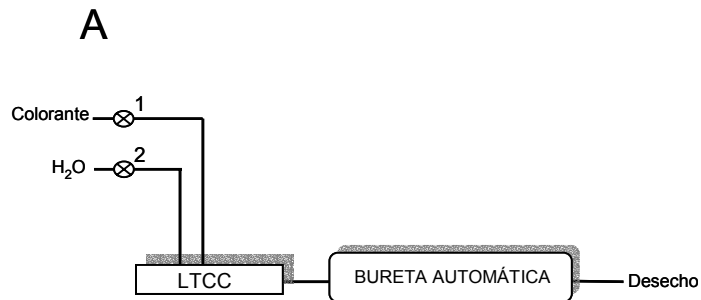
**Figura 6.1:** Dispositivo utilizado para la determinación de nitritos, se pueden observar dos entradas (a y b), una salida (c) y la ventana de detección (d). **A:** fotografía real donde  $d_1=22\ \text{mm}$ ;  $d_2=26\ \text{mm}$ . **B:** imagen en rayos X.



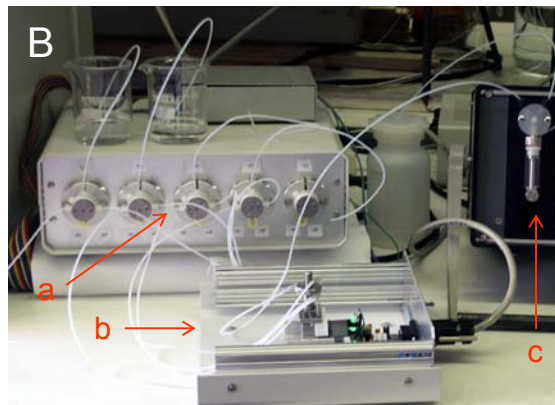
Después del proceso de sinterizado, las dimensiones de los canales fueron  $850\ \mu\text{m}$  de ancho y  $300\ \mu\text{m}$  de profundidad. En los dos casos (chip de silicio y de LTCC) se comprobó que la mezcla está favorecida por la existencia de codos de  $90^\circ$  de los mezcladores bidimensionales.<sup>1</sup>

### 6.1.3 MONTAJE EXPERIMENTAL

El montaje experimental utilizado en la evaluación del dispositivo se muestra en las figuras 6.2.



**Figura 6.2:** **A:** Esquema del sistema de flujo empleado para la evaluación del dispositivo DO1. **1** y **2** indican las válvulas de 3 vías. **B:** Fotografía del montaje experimental donde **a:** válvulas de 3 vías, **b:** caja contenedora del microchip y el sistema de detección y **c:** microbureta.



Consiste en una microbureta digital (de 250 y 2500  $\mu\text{l}$ ) y 3 válvulas solenoides de tres vías de PTFE (ver tabla 6.1). Los líquidos son aspirados a través del canal de salida del dispositivo a caudales que varían entre 4.16 y 25  $\mu\text{l/s}$ .

El software fue especialmente desarrollado para esta aplicación. Basado en Visual Basic, permitía el control en tiempo real de todo el proceso, realizando el control simultáneo de todos los elementos del sistema (bureta, válvulas de 3 vías y detector), así como la adquisición de datos y la selección automática de las relaciones muestra/reactivo, almacenadas en una base de datos (Microsoft Office Access).

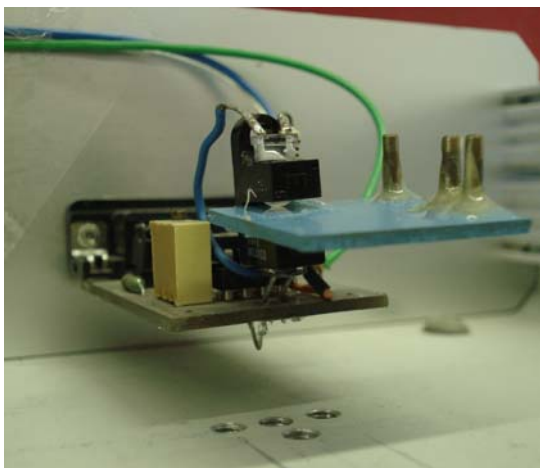
La caracterización hidrodinámica del sistema se realiza con el colorante azoico. Bajo estas condiciones experimentales, en ausencia de reacción química, la señal obtenida, para una concentración determinada, depende únicamente de la dispersión física sufrida por este colorante durante su recorrido a través de los canales del microsistema. El colorante se introduce a través del canal a (ver Figura 6.1A), mediante la apertura de su correspondiente válvula (número 1 en la Figura 6.2A). Lo mismo sucede con la introducción de agua (conectada a la válvula número 2, a través del canal b). La aspiración se realiza a través del canal designado como c en la figura 6.1A, conectado a la microbureta automática. El ciclo de análisis consiste en cuatro pasos. En el primero de ellos se aspira solución portadora (agua bidestilada) durante un tiempo prefijado ( $t_1$ ) a través del canal b. Al llegar a la celda de detección, se obtiene un voltaje de salida correspondiente a la señal de línea base ( $V_0$ ). Durante la segunda fase, se aspira solución de colorante a través del canal a durante un tiempo  $t_2$ , produciendo una señal analítica transitoria que presenta un máximo de voltaje  $V$ . Durante el tercer paso, se aspira de nuevo solución portadora a través de b durante un tiempo  $t_3$  para evacuar el colorante contenido en el chip. El cuarto y último paso consiste en la evacuación del líquido acumulado en la microbureta a través de una salida de desecho durante un tiempo  $t_4$ , previo cierre de las válvulas 1 y 2.

El voltaje de salida del detector se relaciona con la absorbancia mediante la siguiente ecuación:

$$Abs = -\log\left(\frac{V}{V_0}\right)$$

donde  $V$  es el voltaje obtenido cuando circula el producto de la reacción de Griess-Ilosvay o colorante y  $V_0$  el voltaje suministrado por la solución portadora (la línea base). Las señales suministradas por el detector se adquieren mediante una tarjeta A/D controlada mediante un software creado con este fin.

Cuando se llevaron a cabo experimentos con reacción química, en lugar de agua se utilizó el reactivo de Griess-Ilosvay como solución portadora y, en lugar de colorante, patrones de ión nitrito.



**Figura 6.3:**  
Montaje del sistema de  
detección y el  
dispositivo cerámico

El sistema de detección, diseñado y construido en el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Zaragoza, se muestra en la figura 6.3. El sistema consiste en un emisor de luz LED (modelo RL5-G8045 de Super Bright LEDs) que emite a 525 nm en un ángulo de 45° con una intensidad de 8000 mcd para una intensidad eléctrica de 20 mA. La detección de la luz transmitida a través de la celda se realiza mediante un fotodiodo de silicio (FDS100 de Thorlabs), que tiene un área activa de 13 mm<sup>2</sup>.

Los cristales utilizados como ventanas en la celda de medida óptica del dispositivo cerámico son del tipo borosilicato estándar y se fijan mediante el uso de una cola epoxídica convencional.

#### 6.1.4 EVALUACIÓN

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la evaluación del microsistema se desdobra en dos fases. En primer lugar se realiza la caracterización hidrodinámica teniendo en cuenta sólo los procesos físicos implicados, estudiando el efecto de variables tales como el caudal, volumen de inyección y concentración de reactivo en la respuesta del sistema. Esta evaluación se lleva a cabo estudiando la dispersión que provoca el microsistema en el colorante rojo de fenol. Para el estudio de las diferentes variables se realiza un diseño de experimentos basado en el método de planos compuestos de Box-Wilson (diseño central compuesto).<sup>4,5</sup> Aunque la descripción detallada de los datos obtenidos en este estudio han sido omitidos, se constata, como era previsible, que la absorbancia máxima (correspondiente a una menor dispersión del colorante dentro del sistema) se obtiene cuando se utilizan caudales y volúmenes de inyección elevados.

<sup>4</sup> Park, S.H. **in:** Robust Design and Analysis for Quality Engineering, Chapman & Hall, London, 1996.

<sup>5</sup> Box, G.E.P.; Wilson, K.B. *J. Roy. Statist. Soc.*, 1951, 13, 1.

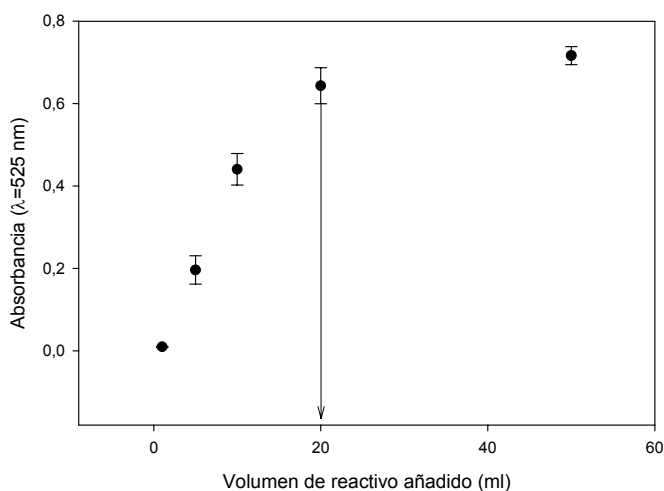
Respecto al caudal, aunque su efecto no es demasiado significativo, se observa que valores altos disminuyen el tiempo de residencia del colorante dentro del microsistema, con lo que impiden la dispersión debida a efectos de difusión hacia la solución transportadora (agua). En la misma línea argumental, a mayor volumen de inyección, menor dispersión de la zona central del bolo de muestra. De hecho, el volumen del microsistema es tan pequeño (55  $\mu\text{l}$ ) que volúmenes de inyección de colorante superiores a este valor provocan una lectura de absorbancia idéntica a la del colorante inyectado, ya que todo el microsistema queda repleto de éste.

Por último, y como es lógico, también se observa que a mayor concentración de colorante, mayor absorbancia obtenida.

#### 6.1.4.1 Modelización de la respuesta

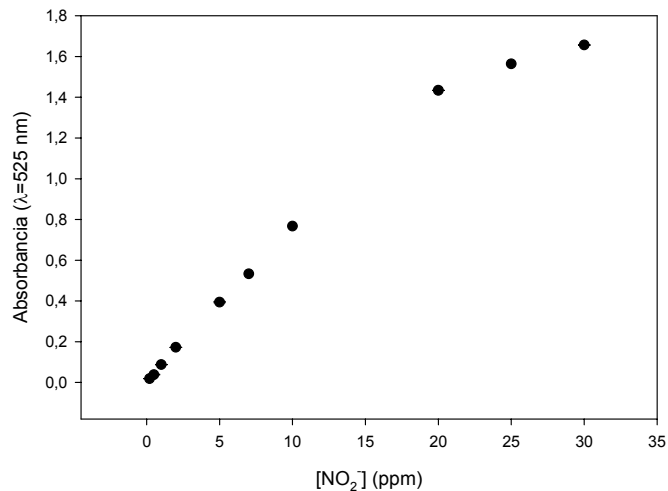
Una vez finalizada esta etapa inicial de caracterización intrínseca del dispositivo sin reacción química, con el objetivo de comprobar el funcionamiento de éste como microanalizador de ión nitrito, se lleva a cabo el estudio del sistema incorporando la reacción de formación del colorante dentro de los microcanales. Inicialmente se procede a repetir los estudios anteriores utilizando, en lugar de rojo de fenol, el colorante azoico producto de la reacción entre un patrón de nitritos y el reactivo cromogénico de Griess-Ilosvay. Los resultados así obtenidos, serían independientes de la cinética de reacción. Para ello, se utilizan patrones de nitrito de diferentes concentraciones a los que se les añade un volumen de reactivo cromogénico determinado (ver §6.1.1), se enrasan a 100 ml con agua bidestilada y se dejan reaccionar hasta la completa conversión. La elección del volumen óptimo de reactivo se realiza tras determinar la influencia de este parámetro en la señal obtenida (ver Figura 6.4). La secuencia seguida (siguiendo las 4 etapas descritas en §6.2.2) es:  $t_1=5''$  (estabilización de línea base),  $t_2=5''$  (tiempo de inyección de colorante),  $t_3=32''$  (limpieza del colorante con solución portadora) y  $t_4=42''$  (evacuación del volumen contenido en la microbureta a través del desecho).

**Figura 6.4:**  
Evolución de la señal  
obtenida en función del  
volumen de reactivo  
añadido en la  
preparación del  
colorante azoico.  
[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>]=10 ppm.  
Caudal: 5.83  $\mu\text{l/s}$ .  
Microbureta de 250  $\mu\text{l}$ .



Aunque 20 ml de reactivo cromogénico proporcionan la máxima señal para el patrón de nitrito, experiencias posteriores demuestran que un volumen de 10 ml resulta más adecuado para disminuir los valores de absorbancia obtenidos. De este modo es posible evitar la saturación del detector y, en consecuencia, aumentar el rango lineal de trabajo.

En la figura 6.5 se muestra un calibrado obtenido utilizando 10 ml de reactivo cromogénico en todas las concentraciones de nitrito. Se utiliza la misma secuencia de la anterior experiencia. La recta obtenida es:  $Abs = 2.06 \cdot 10^{-2} (\pm 1 \cdot 10^{-4}) + 7.173 \cdot 10^{-2} (\pm 7 \cdot 10^{-5}) \cdot [NO_2^-]$  (rango lineal: 0-20 ppm,  $n=3$ ,  $r^2 > 0.998$ , 95%).



**Figura 6.5:** Calibrado obtenido con patrones en los que el  $NO_2^-$  había reaccionado con 10 ml de reactivo.

Pese a que el régimen del flujo en sistemas microfluídicos suele ser de laminar, lo que dificulta la mezcla entre reactivos, en algunos casos, debido a que la geometría de los canales diseñados genera puntos de mezcla caótica, se obtiene un grado de mezcla superior a lo esperado. Estudios previos realizados en el grupo de investigación demostraron que el comportamiento de los microsistemas de silicio se basaba en la combinación de un reactor continuo de tanque agitado (RCTA) y un reactor de flujo pistón (RPF), en ausencia de dispersión.<sup>1,3</sup> El modelo RCTA, una vez planteado e integrado el balance de masas, proporciona las siguientes ecuaciones:

$$C(t) = C_o \left( 1 - e^{-\frac{Q}{V}t} \right) \quad 0 < t < \frac{V_s}{Q} \quad (6.1)$$

$$C(t) = C_o \left( e^{\frac{V_s}{V}} - 1 \right) e^{-\frac{Q}{V}t} \quad t > \frac{V_s}{Q} \quad (6.2)$$

donde  $C(t)$  es la concentración en el reactor para un tiempo  $t$ ,  $C_o$  es la concentración de la muestra inyectada,  $Q$  es el caudal,  $V$  es el volumen del reactor y  $V_s$  es el volumen de muestra inyectada. Por lo que respecta al volumen del reactor, es calculado de la siguiente manera:

$$V = \tau_{RCTA} \cdot Q \quad (6.3)$$

donde el tiempo de residencia ( $\tau_{RCTA}$ ) es el tiempo que se tarda en llegar al 63.21% de la respuesta máxima obtenida para un caudal y una concentración determinada.<sup>6</sup>

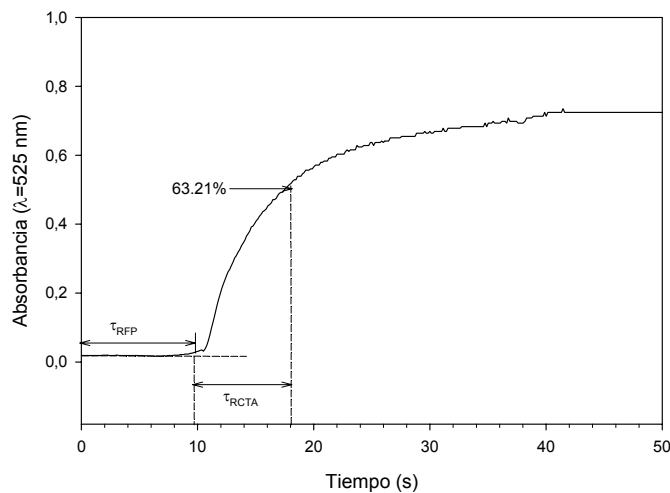
En el caso del RFP en ausencia de dispersión, el sistema se comporta como si tuviera un retraso ideal respecto a la señal, expresado de la siguiente manera:

$$C(t + \tau_{RFP}) = C_0(t) \quad t > 0 \quad (6.4)$$

$C(t + \tau_{RFP})$  es la concentración que llega al detector en un tiempo  $t$  incrementado el tiempo de residencia del RFP,  $C_0(t)$  es la concentración inyectada en el tiempo  $t$ .

Para comprobar si la respuesta del microsistema LTCC corresponde a la combinación de los modelos RCTA y RFP, tal y como sucediera con el microanализador de silicio, se utilizan las siguientes condiciones experimentales: un caudal de 6.25  $\mu\text{l/s}$  y una concentración de solución  $\text{NO}_2^-$  de 10 ppm a la que se le añaden 10 ml de reactivo cromogénico y se enrasa a 100 ml con agua bidestilada.

Se realiza un pico en forma de escalón (ver Figura 6.6) para que se mide un  $\tau_{RCTA} = 8.8$  segundos. El volumen interno, calculado según la expresión 6.3, es de 55  $\mu\text{l}$ . Asimismo, se obtiene un retraso  $\tau_{RFP} = 11.6$  segundos, que corresponde al momento en que la absorbancia se diferencia de la línea base.



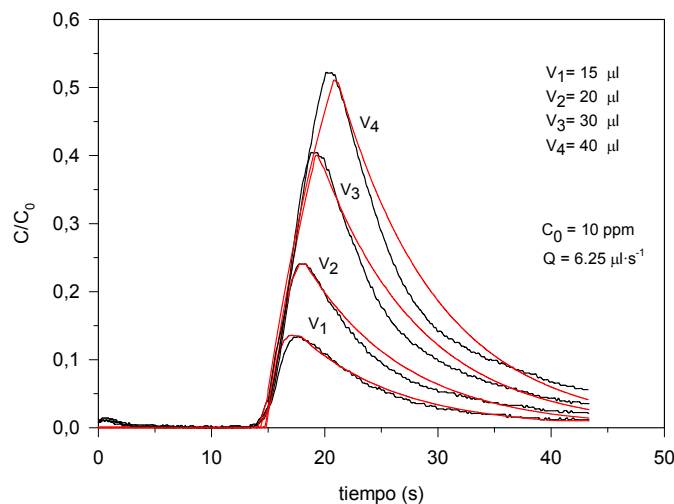
**Figura 6.6:**  
Escalón realizado con 10 ppm de  $\text{NO}_2^-$  y 10 ml de reactivo. Se marcan los dos tiempos de residencia.

<sup>6</sup> Levenspiel, O. **in:** The Chemical Reactor Ommibook, OSU Book Stores, Corvallis, OR, 1979.



Se repite la misma experiencia para dos concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  situadas dentro del rango lineal de trabajo (10 y 15 ppm), cuatro caudales (comprendidos entre 4.16 y 25  $\mu\text{l/s}$ ) y cuatro volúmenes de inyección (de 5 a 60  $\mu\text{l}$ ). Los tiempos de cada una de las 4 fases constituyentes del proceso de análisis, tienen que ser adaptados a cada condición experimental. Así, concentraciones de colorante elevadas necesitan mayores tiempos de limpieza ( $t_3$ ) o caudales superiores requieren de menos tiempo de inyección de colorante ( $t_2$ ), por ejemplo. Antes de proceder a la modelización, se lleva a cabo la normalización de las señales obtenidas. Es decir, se representa el cociente  $C/C_0$  (donde  $C_0$  es la señal máxima obtenida en ausencia de dispersión) en función del tiempo, para que las absorbancias sean independientes de la concentración.

La figura 6.7 muestra la comparación de los resultados obtenidos experimentalmente (línea negra) con los modelizados (línea roja). Las colas de los picos presentan una ligera desviación respecto a la teoría, probablemente debido a efectos de dispersión que no han sido tenidos en cuenta en el modelo. Sin embargo, tal y como se observó en el caso del dispositivo de silicio, se obtiene una buena concordancia entre el tipo de respuesta obtenida con el microsistema LTCC y la respuesta teórica correspondiente a un sistema que combina un RCTA y un RFP en ausencia de dispersión.



**Figura 6.7:** Efecto de la concentración sin reacción química, a un volumen variable y un caudal constante (6.25  $\mu\text{l/s}$ ).

Estos resultados nos permiten concluir que existe una mezcla efectiva en el microsistema. Para comprobarlo experimentalmente se procede a verificar la reacción química en el interior de los microcanales.

#### 6.1.4.2 Reacción química

Las condiciones experimentales para llevar a cabo la evaluación del microsistema cuando la reacción química tiene lugar dentro del dispositivo cerámico se escogen a partir de la caracterización hidrodinámica realizada durante el proceso de modelización anterior del dispositivo.

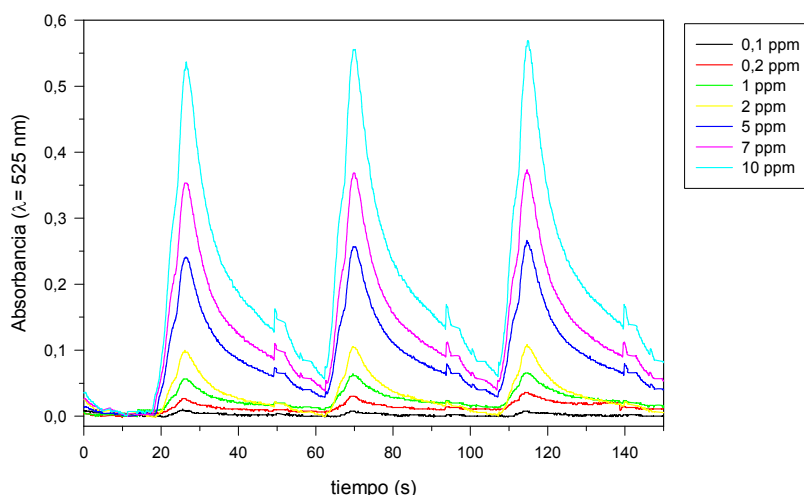
Puesto que el efecto de los caudales en la respuesta no es demasiado importante, se escoge un caudal bajo (5.83  $\mu\text{l/s}$ ) y un volumen de muestra de 29.15  $\mu\text{l}$  (o 5 segundos en términos de tiempos de aspiración al caudal escogido).

Se preparan patrones entre 0.1 y 20 ppm de  $\text{NO}_2^-$ . Se utiliza una microbureta de 250  $\mu\text{l}$  que, al caudal de trabajo de 5.83  $\mu\text{l/s}$ , permite un tiempo máximo de operación de 42 segundos. Se utiliza la siguiente secuencia de análisis:  $t_1=5''$  de aspiración de reactivo por el canal b (estabilización de la línea base),  $t_2=5''$  de aspiración de muestra o patrón por el canal a (aparición de la máxima señal),  $t_3=32''$  de aspiración de reactivo por canal a (retorno a la línea base),  $t_4=42''$  de expulsión del líquido de la bureta (limpieza) por la salida c. Los picos obtenidos se muestran en la figura 6.8.

La recta de calibrado obtenida es ( $n=3$ , 95%):

$A = -0.01(\pm 0.01) + 0.048(\pm 0.001) \cdot [\text{NO}_2^-]$ ;  $r^2 > 0.995$ . El rango lineal de trabajo es de 0.1 a 10 ppm. La RSD para un patrón de 10 ppm ( $n=3$ , 95%) es de 0.91%.

**Figura 6.8:** Calibrado realizado con el chip de LTCC. Sólo se muestran los picos que entraron dentro del rango lineal.



### 6.1.5 CONCLUSIONES

Los resultados muestran que, en lo relativo a la determinación colorimétrica de ión nitrito, a pesar del pequeño volumen del reactor del microanalizador LTCC (55  $\mu\text{l}$ ), se produce una mezcla totalmente efectiva. Este hecho se asocia a la presencia en el microcanal de codos de 90 y 180 grados que, tal y como ya sucediera en el estudio hidrodinámico del microchip de silicio, provocan una mezcla más alta de lo esperada para este tipo de sistemas donde normalmente predominan regímenes de flujo laminar.

La integración de la ventana de detección se realiza de manera sencilla. Sin embargo, es importante destacar la limitación inherente al escalado de las dimensiones del camino óptico de la celda de detección, ya que puede aumentar drásticamente el límite de detección e invalidar el uso del microsistema ante determinadas aplicaciones.

El actual dispositivo podría ser utilizado, por ejemplo, para la determinación de nitritos en aguas de depuración, donde los niveles de concentración de este analito son mucho más elevados que en aguas potables, donde no se esperaría encontrar concentraciones superiores a 1 ppb. Como conclusión general cabría remarcar que cualquier método colorimétrico que no sufra restricciones en relación a su límite de detección, puede ser integrado de forma sencilla en microsistemas LTCC.

## 6.2 Microanalizador basado en medidas de quimioluminiscencia. Celda de medida basada en la configuración "mezclador vórtex" (DO2)

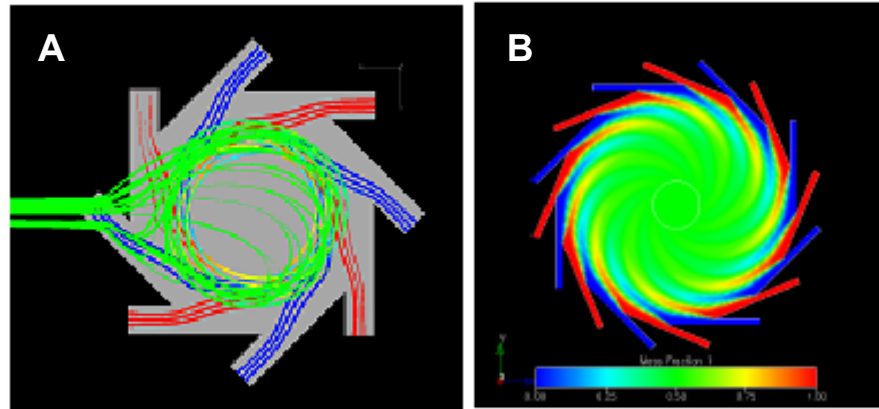
Los métodos de detección quimioluminiscentes ofrecen algunas ventajas respecto a los basados en medidas de absorbancia puesto que, a parte de ser sensibles y selectivos, no requieren de una fuente emisora, con lo que la instrumentación del sistema de medida se simplifica notablemente. Adicionalmente, las técnicas quimioluminiscentes soportan mejor el proceso de escalado que es necesario realizar para su integración en microsistemas de análisis.

Aunque la magnitud de la señal obtenida depende de la población de especies capaces de emitir, y ésta disminuye en el proceso de escalado, la señal generada por el detector puede ser amplificada enormemente sin verse sometido a problemas de saturación como ocurre con los sistemas basados en absorción de radiación. Las reacciones quimioluminiscentes presentan como característica singular que, en ocasiones, la intensidad de emisión se puede ver inhibida en presencia de un exceso de moléculas de la especie quimioluminiscente. Puesto que el máximo de intensidad lumínica decae exponencialmente en pocos segundos, la mezcla de muestra y reactivos debe producirse de la forma más rápida posible y en la propia cámara de medida para permitir registrar el máximo de intensidad en el menor tiempo. Este hecho condiciona el diseño de las celdas de medida en quimioluminiscencia haciendo poco adecuados los esquemas de los sistemas de flujo utilizados habitualmente. Para la fabricación de estos dispositivos, se escogió la configuración del mezclador tipo vórtex dado que, a parte de favorecer un rápido mezclado entre reactivos, permiten dejar una ventana abierta en la cual ubicar el detector sobre la zona de reacción. De esta manera se evitan pérdidas de intensidad quimioluminiscente. En un mezclador vórtex, existen, por lo menos, dos entradas de reactivos distintas que se bifurcan en dos o más canales antes de llegar a la cámara de reacción, de manera que la mezcla, no sólo se ve favorecida por la velocidad con la que entran los reactivos a la cámara (generando una gran turbulencia) sino porqué se incrementa el área de contacto entre ellos (aumentando así la difusión).<sup>7,8</sup>

<sup>7</sup> Lin, C.H.; Tsai, C.H.; Fu, L.M. *J. Micromech. Microeng.*, **2005**, *15*, 935.

<sup>8</sup> Wong, S.H.; Ward, M.C.L.; Wharton, C.W. *Sens. Actuator B-Chem.*, **2004**, *100*, 359.

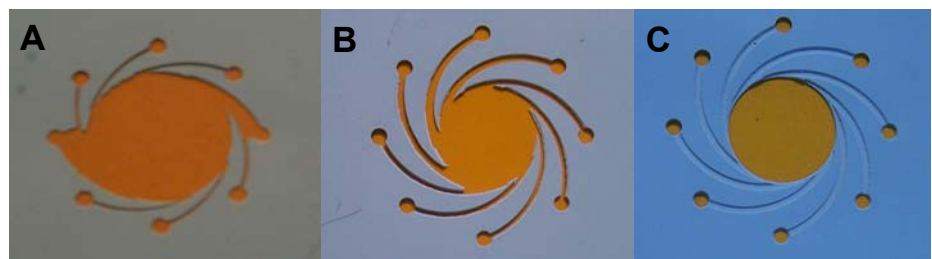
**Figura 6.9:** Simulación de la generación de un vórtex a partir de 2 reactivos (rojo y azul) que se bifurcan en: **A:** cuatro canales de cada una de las dos disoluciones antes de entrar en la cámara de reacción; **B:** ocho canales.



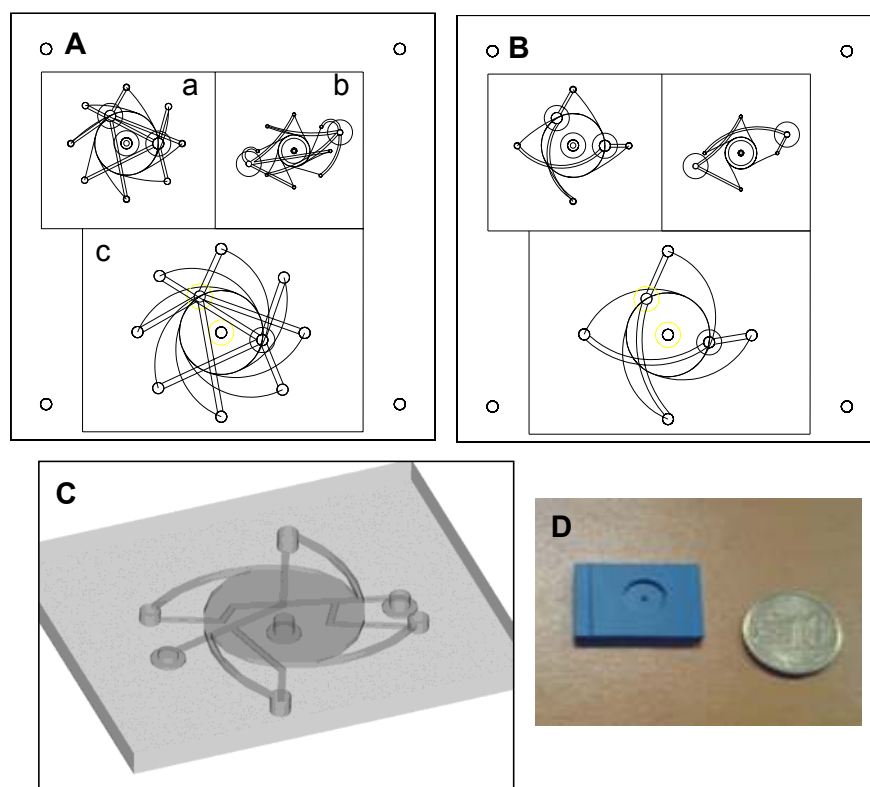
La figura 6.9 muestra dos simulaciones realizadas en las se puede observar cómo dos reactivos se bifurcan en cuatro y ocho entradas antes de entrar en la cámara de reacción y, al hacerlo, se genera una mezcla en forma de espiral concéntrica o vórtex.

La construcción de este conjunto de dispositivos mediante la tecnología LTCC presentó una elevada dificultad debido a la proximidad en la que se encontraban las entradas de líquidos en la cámara de reacción y, sobretudo, al hecho de no disponer en esos momentos todavía del equipo láser. La estrategia inicial fue mecanizar cada una de las capas implicadas en el dispositivo individualmente. Al llegar a la capa que contenía la estructura del vórtex (la cámara con las entradas de reactivos), las herramientas utilizadas, a pesar de ser del mínimo diámetro posible, provocaban la ruptura de los canales de entrada a la cámara debido a su tamaño y a la proximidad entre ellos (ver Figura 6.10A). Por este motivo, después de varios intentos fallidos, se laminaron dos capas de cerámica para conferir rigidez a la estructura y, sobre ellas, se fabricó el vórtex. En la figura 6.10B se puede observar cómo se perforaron totalmente los canales de entrada a la cámara de reacción. En vista de que los acabados eran algo irregulares, pudiendo esto afectar a la formación del vórtex, se mecanizaron los canales en bajo relieve, sin llegar a perforar las dos capas de la cerámica totalmente. Como puede observarse en la figura 6.10C, los resultados obtenidos fueron óptimos.

**Figura 6.10:** Estrategias para la fabricación de un vórtex con 8 entradas.  
**A:** una sola capa de cerámica mecanizada;  
**B:** 2 capas laminadas y canales cortados totalmente;  
**C:** 2 capas laminadas y canales en bajo relieve.

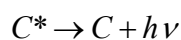
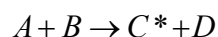


La siguiente figura muestra los diseños CAD empleados para la fabricación de los seis analizadores. Se diferenciaban entre ellos en el diámetro de la cámara (0.45, 0.9 y 1.2 cm, después del sinterizado) y en el número de entradas de reactivo y muestra construidas (4 u 8).



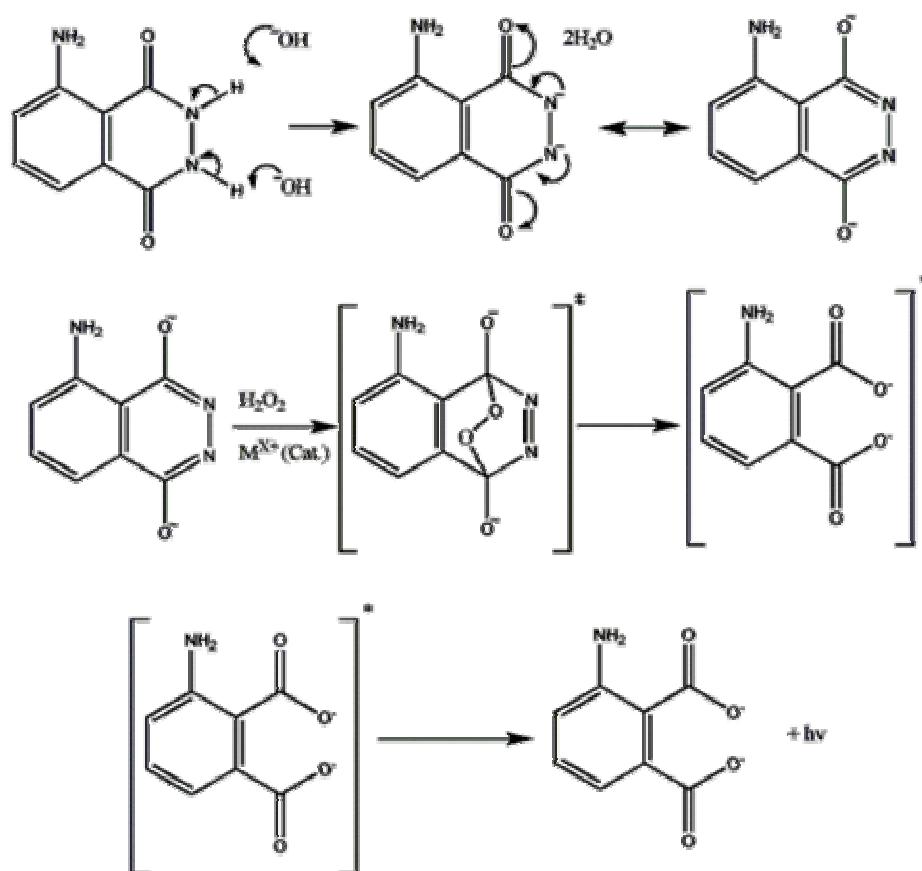
**Figura 6.11:**  
**A y B:** figuras en CAD de los 6 dispositivos construidos. Difieren entre ellos en el número de entradas a la cámara de reacción (**A:** 8 y **B:** 4); **a:**  $\varnothing = 0.9$  cm; **b:**  $\varnothing = 0.45$  cm; **c:**  $\varnothing = 1.2$  cm; **C:** dibujo de la estructura interna tridimensional; **D:** reverso de uno de los dispositivos, se puede observar la cámara de reacción.

La reacción quimioluminiscente elegida para validar los dispositivos implica el uso del luminol. El luminol ha sido el reactivo quimioluminiscente (CL) más estudiado desde 1928.<sup>9</sup> Esta especie exhibe quimioluminiscencia en presencia de un catalizador (como el  $\text{Co}^{2+}$  o el  $\text{Fe}^{3+}$ ). La reacción se desarrolla en solución acuosa, normalmente a pH alcalinos, y en presencia de un oxidante (es muy común el uso de peróxido de hidrógeno, aunque permanganato o hipoclorito también son ampliamente utilizados). La reacción en la que interviene el luminol es del tipo:



donde  $A$  es una especie oxidante,  $B$  es luminol y  $C^*$  es el luminol oxidado en estado excitado. De manera algo más detallada, la reacción se esquematiza en la siguiente figura. La intensidad de la luz emitida es proporcional tanto a la concentración de luminol o del oxidante, como del catalizador. Por este motivo es posible cuantificar las tres especies a partir de la misma reacción.

<sup>9</sup> Albrecht, H.O. *Z. Phys. Chem.*, **1928**, 136, 321.



**Figura 6.12:**  
Proceso de oxidación  
del luminol en medio  
básico y presencia de un  
catalizador

Por otro lado, existen compuestos que tienen un efecto inhibitor sobre la CL, reduciendo la intensidad de luz emitida. El porcentaje de inhibición se utiliza para determinar indirectamente la concentración de la especie inhibidora que, en ocasiones, es de gran interés. Tal es el caso de algunos fármacos, cuya determinación en aguas de consumo esta empezando a ser considerada de interés prioritario por sus potenciales efectos negativos sobre la salud y el medioambiente.

### 6.2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Los reactivos utilizados en esta sección se muestran en la tabla 6.3. Para simplificar el montaje experimental, la disolución de reactivo quimioluminiscente contenía, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía,<sup>10</sup> una concentración  $650 \mu\text{M}$  de luminol y  $60 \mu\text{M}$  de  $\text{Co}^{2+}$  disueltos en una solución  $0.1\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a pH 10.15 (ajustado con HCl diluido). La solución se dejaba en la nevera durante 48 horas en un recipiente oscuro. Las soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $97.9 \text{ mM}$ ) fueron preparadas diariamente y mantenidas también en recipientes aislados de la luz.

<sup>10</sup> Yuan, J.; Shiller, A.M. *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 1975.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Ácido L(+) <i>ascórbico</i>	Panreac
Ácido cítrico	Panreac
Ácido salicílico	Fluka
Ácido clorhídrico	Panreac
Carbonato de sodio	Panreac
EDTA	Panreac
D(+) <i>Glucosa</i>	Panreac
Hexocianoferrato de sodio (III)	Probus
Hidrogenocarbonato de sodio	Fluka
Hidróxido de potasio	Fluka
Hidróxido de sodio	Panreac
Luminol	Fluka
Nitrato de cobalto hexahidratado	Panreac
Paracetamol	Sigma
Penicilina G (sal sódica)	Sigma
Peróxido de hidrógeno	Sigma
Sacarina	Aldrich
Sacarosa	Panreac

**Tabla 6.3:** Reactivos utilizados en la evaluación del dispositivo DE2.

Fármaco (compañía fabricante)	Concentración paracetamol declarada (mg/comprimido)	Otros componentes
Ben-u-Ron ( <i>Neo-Farmacéutica</i> )	500	Almidón de maíz Talco Ácido esteárico Almidón glicolato de sodio Povidona
Frenadol ( <i>Mc Neil Iberica</i> )	650	Dextromorfano monohidratado Citrato de cafeína Clorfeniramina Ácido <i>ascórbico</i> Sacarosa y otros excipientes
Efferalgan ( <i>Bristol-Myers Squibb</i> )	1000	Ácido cítrico anhidro Bicarbonato de sodio Carbonato de sodio anhidro Sorbitol Docusato de sodio Povidona Sacarina sódica Benzoato de potasio
Cod-efferalgan ( <i>UPSA</i> )	500	Fosfato de codeína Ácido cítrico anhidro Bicarbonato de sodio Carbonato de sodio anhidro Sorbitol Sacarina sódica Benzoato de potasio

**Tabla 6.4:** Composición de la matriz de los comprimidos farmacéuticos utilizados en la validación del sistema para la detección de paracetamol.

En el último apartado de esta sección, se realiza el análisis de diferentes fármacos, cuya composición se ha detallado en la tabla 6.4.

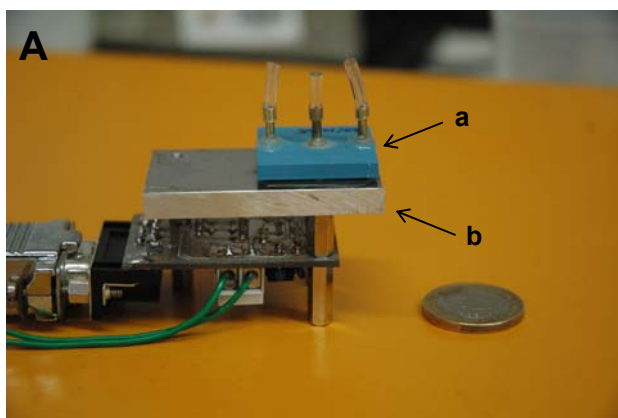
### 6.2.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

Dado que el montaje experimental utilizado fue modificado sucesivamente en función de la determinación a realizar, se ha optado por incluir el esquema de cada aplicación en su apartado de resultados correspondiente.

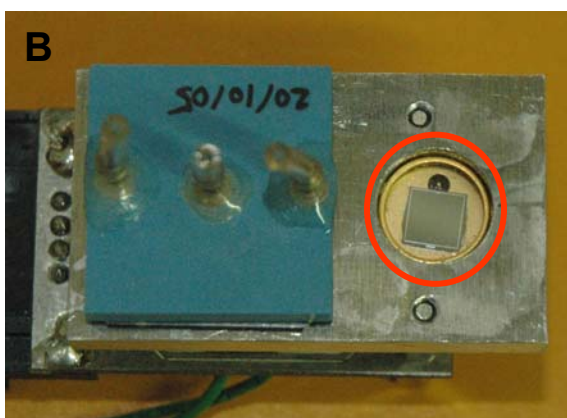
Las primeras pruebas, que sirvieron fundamentalmente para optimizar la configuración de la cámara de mezcla y reacción y algunas variables hidrodinámicas del sistema, fueron realizadas utilizando un fotodetector Hamamatsu modelo S1337-66BQ, conectado a una tarjeta de adquisición de Labview mediante dos líneas de salida (potencial y referencia) (ver Figura 6.13).

Posteriormente, se trabajó con un fotomultiplicador Hamamatsu modelo H6779-02, que sirvió para mejorar la sensibilidad del sistema (ver figura 6.14).

El software de adquisición de señales fue, en ambos casos, diseñado especialmente para esta aplicación.

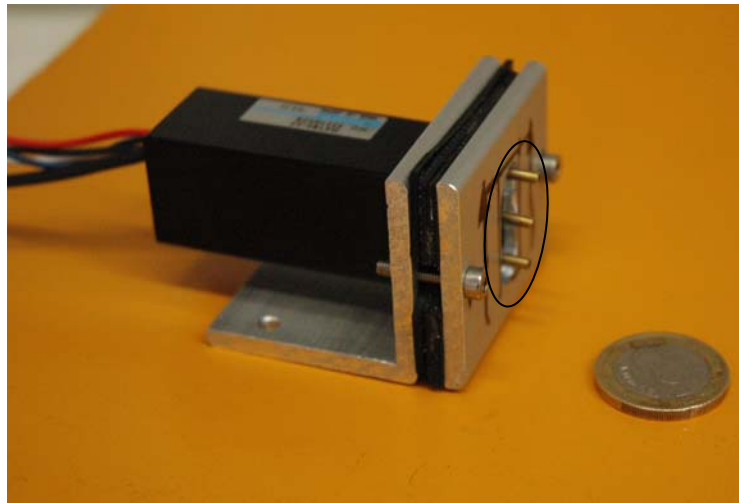


**Figura 6.13:**  
Fotografía del fotodetector Hamamatsu S1337-66BQ con el analizador miniaturizado de configuración vórtex.  
**A:** a: vórtex miniaturizado;  
**b:** plataforma de soporte. **B:** ventana del fotodetector (enmarcada en rojo).





**Figura 6.14:**  
Fotografía del montaje del fotomultiplicador Hamamatsu H6779-02 y uno de los dispositivos vórtex acoplado (se han destacado las entradas y salidas de flujo).



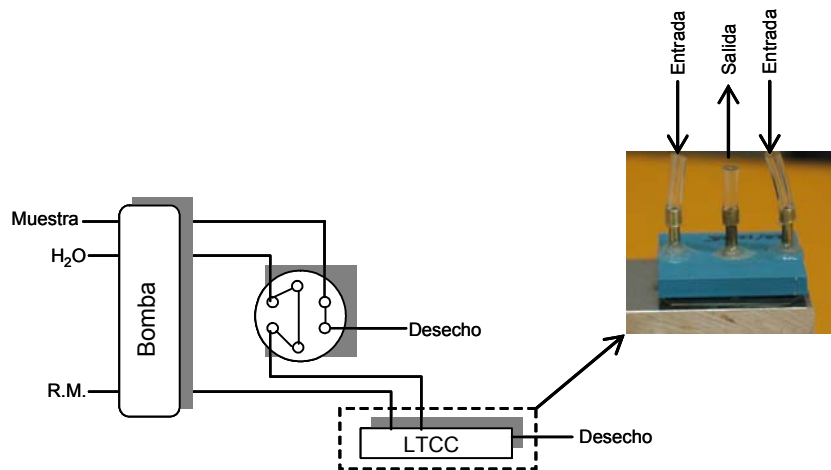
A continuación se muestran los montajes experimentales utilizados y los resultados obtenidos para cada determinación y tipo de experimento realizado.

### 6.2.3 EVALUACIÓN Y RESULTADOS

#### 6.2.3.1 Optimización del volumen de inyección, caudal y geometría del dispositivo

El montaje experimental utilizado se muestra en la figura 6.15. El volumen de muestra inyectada viene determinado por un bucle de inyección. La muestra, arrastrada por la solución portadora (agua), reacciona en el interior de la cámara tipo vórtex con el reactivo mixto (R.M.).

**Figura 6.15:**  
Esquema del sistema de flujo empleado para algunas experiencias de la evaluación de los dispositivos DO2.

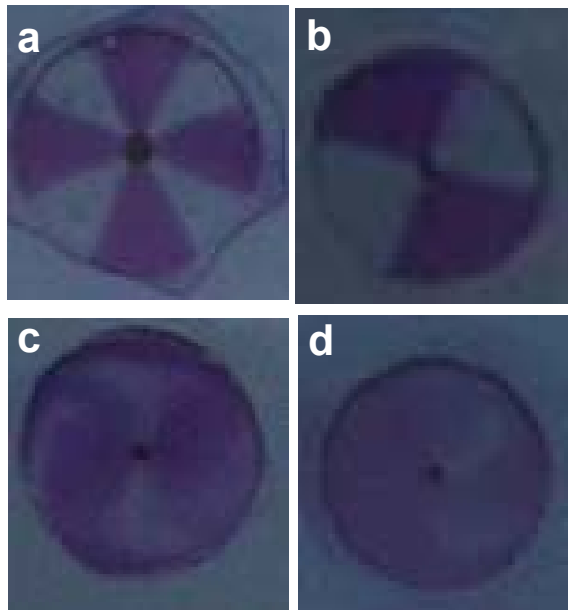


Las experiencias realizadas para la evaluación de los parámetros hidrodinámicos y la geometría del dispositivo (exceptuando aquellas en las que se utilizó un colorante) se realizan inyectando como muestra una solución de  $H_2O_2$  de concentración 97.9 mM.

a) **Geometría del dispositivo:** Las experiencias necesarias para llevar a cabo la elección de la mejor configuración de vórtex fueron realizadas utilizando el reactivo mixto de características descritas en el apartado §6.3.1, inyectando un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de oxidante y un caudal de entrada (tanto de muestra como de R.M.) de 6.67 ml/min. La elección de este caudal fue hecha en base a experimentos cualitativos realizados con un colorante (rojo de fenol). La inserción continua de colorante y agua a través de la entrada de muestra permitió visualizar el patrón de mezcla generado en cada uno de los dispositivos (ver Figura 6.16) a diferentes caudales. La siguiente figura trata de ilustrar los resultados obtenidos en algunas de estas condiciones.

**Figura 6.16:**

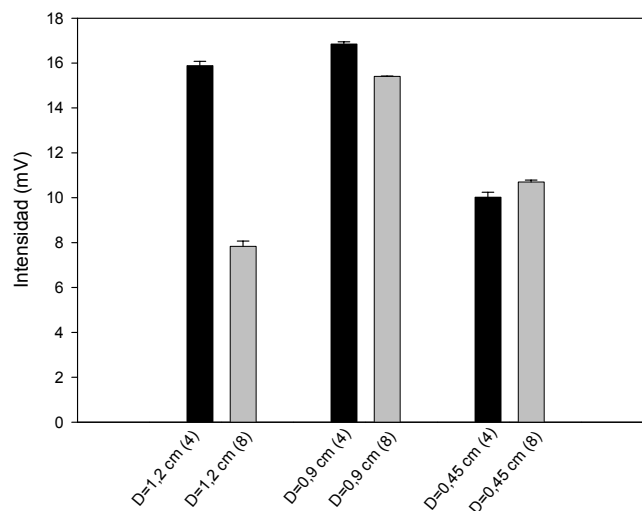
Imágenes tomadas bajo diversas condiciones experimentales. **a:** dispositivo de  $\text{Ø}=1.2$  cm y 8 entradas a caudal bajo; **b:**  $\text{Ø}=0.9$  cm y 4 entradas a caudal bajo; **c:**  $\text{Ø}=0.9$  cm y 4 entradas a caudal elevado; **d:**  $\text{Ø}=0.45$  cm y 8 entradas a caudal elevado. En todos los casos se hizo fluir continuamente agua y colorante.



De manera cuantitativa, la siguiente gráfica muestra las señales obtenidas con los seis dispositivos evaluados, al inyectar agua oxigenada como muestra.

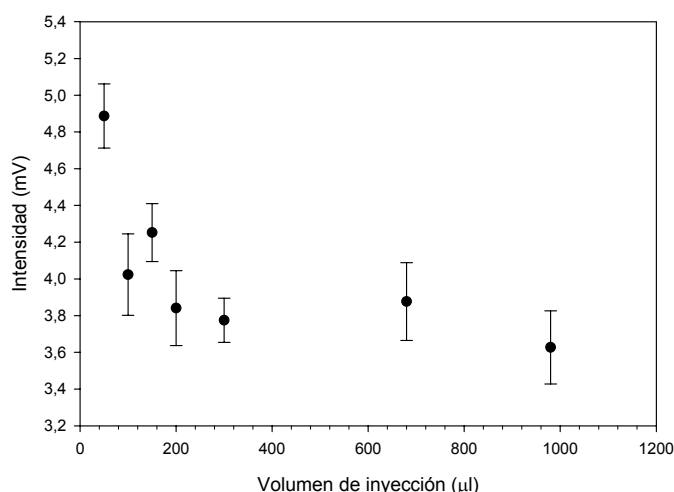
**Figura 6.17:**

Intensidades suministradas por cada uno de los dispositivos evaluados. Se indica el diámetro de la cámara de reacción y, entre paréntesis, el número de canales que entran a ella ( $n=3$ ). Caudal: 6.67 ml/min; volumen de inyección de  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 100  $\mu\text{l}$ .



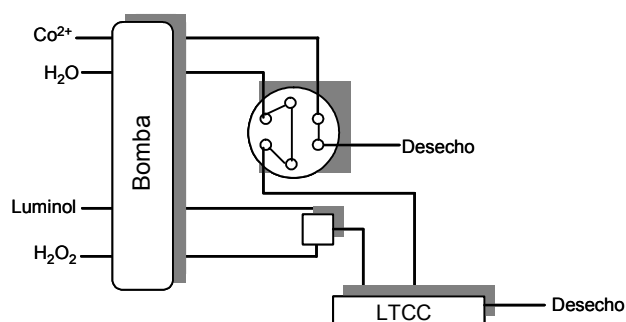
b) **Caudal:** Los apartados obtenidos en el apartado anterior muestran que, para conseguir la máxima intensidad los experimentos deben realizarse con el máximo caudal posible. Como se observa en la figura 6.16 (a y b), caudales bajos generan un patrón de mezcla dentro de la cámara poco eficiente. Para limitar el consumo de reactivos y la presencia de sobrepresiones indeseables se selecciona un caudal de entrada de reactivo/muestra de 6.67 ml/min.

c) **Volumen de inyección:** El efecto del volumen de inyección en la intensidad obtenida se muestra en la gráfica 6.18. La experiencia se realizó inyectando diferentes volúmenes de una disolución 97.9 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El volumen óptimo seleccionado es de 50  $\mu\text{l}$ . Volúmenes superiores provocan una disminución en la intensidad, probablemente debido a un efecto de auto-inhibición (*auto-quenching*) de las propias moléculas de luminol excitadas.



**Figura 6.18:** Efecto del volumen de inyección en la intensidad CL.

### 6.2.3.2 Optimización de la concentración y pH de la solución de luminol y la concentración de $\text{H}_2\text{O}_2$ para la determinación de $\text{Co}^{2+}$



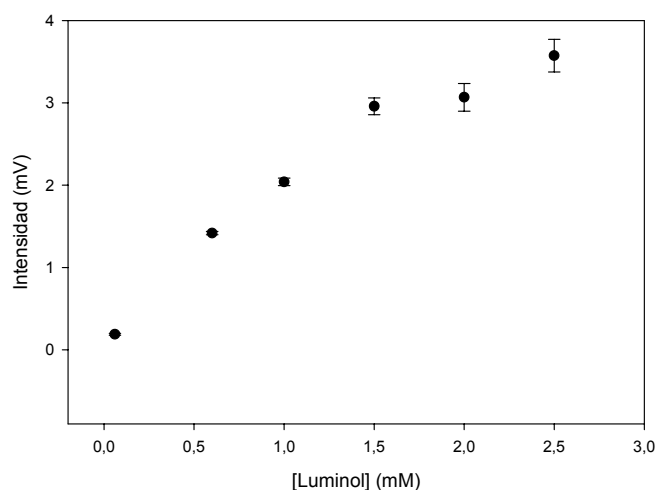
**Figura 6.19:** Esquema del sistema de flujo empleado para la determinación de  $\text{Co}^{2+}$ .

Para el desarrollo de estos experimentos, tal y como esquematiza en el diagrama del sistema de flujo de la figura 6.19, se realizan inyecciones de una solución de  $\text{Co}^{2+}$  de concentración constante.

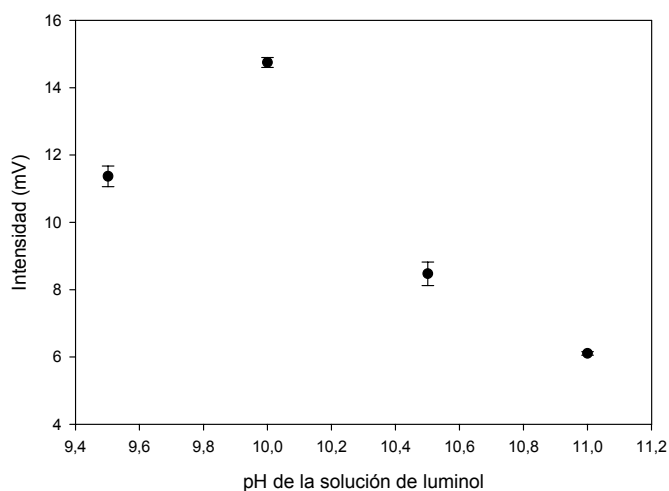
Dado que en este caso el objetivo es la determinación de cobalto utilizándolo como catalizador, el diseño del sistema de flujo ha de ser modificado. La disolución de reactivo ha de incorporar tanto el luminol como el oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Puesto que esta mezcla es inestable, ha de ser preparada *in-situ*, mezclando justo antes de la cámara los flujos de luminol y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El cobalto, ahora analito, es introducido a través de la válvula de inyección. Durante todo el proceso de optimización se utiliza un volumen de inyección de 50  $\mu\text{l}$ . Se fija este valor para evitar los problemas de *auto-quenching* observados anteriormente.

a) **Concentración y pH de la solución de luminol:** La optimización de la concentración de luminol se realiza inyectando una solución de  $\text{Co}^{2+}$  80  $\mu\text{M}$ . Se utiliza una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 97.9 mM y se evalúan concentraciones de luminol entre 0.06 y 2.5 mM. El valor óptimo escogido es 1.5 mM, ya que concentraciones superiores de luminol no provocan incrementos apreciables de señal (ver Figura 6.20).

**Figura 6.20:**  
Optimización de la concentración de luminol.

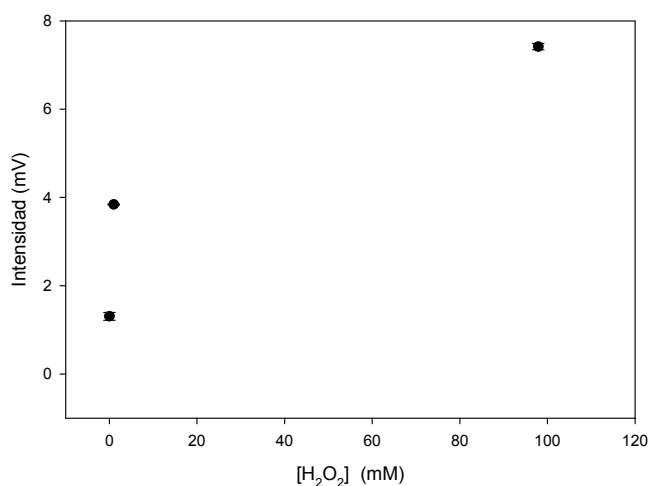


**Figura 6.21:**  
Optimización del pH de la solución de luminol.



Utilizando la concentración de luminol previamente seleccionada, se determina el valor óptimo del pH de esta disolución variándolo entre 9.5 y 11. La concentración de la disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es de 97.9 mM y la concentración de  $\text{Co}^{2+}$  inyectada de 80  $\mu\text{M}$ . Bajo estas condiciones experimentales, el máximo de señal se obtiene para un valor de pH de 10 (ver Figura 6.21).

b) **Concentración de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$ :** Con las anteriores condiciones ya optimizadas, se estudia el efecto de la variación de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tal y como se había observado previamente de forma cualitativa, las mayores intensidades se obtienen cuando se trabaja con una concentración de 97.9 mM. A partir de este valor, el poder oxidante de las sucesivas diluciones resulta tan elevado que se observa la aparición espontánea de productos de oxidación, que ensucian la celda de detección.



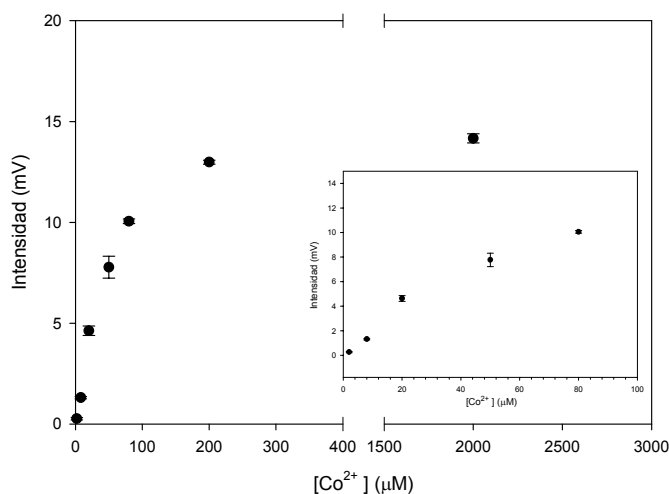
**Figura 6.22:**  
Optimización de la  
concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

c) **Características analíticas del microsistema para la determinación de  $\text{Co}^{2+}$ :** Con el objetivo de comprobar la viabilidad de las condiciones experimentales optimizadas para la determinación de  $\text{Co}^{2+}$ , se realizan calibrados inyectando concentraciones crecientes de cobalto obteniéndose los resultados que aparecen en la figura 6.23.

Para  $n=3$  (95%) se obtiene un rango lineal de entre 2 y 20  $\mu\text{M}$  siendo la ecuación de la recta:  $\text{Int} = -0.4(\pm 0.1) + 0.24(\pm 0.02) \cdot [\text{Co}^{2+}]$  ( $r > 0.993$ ).

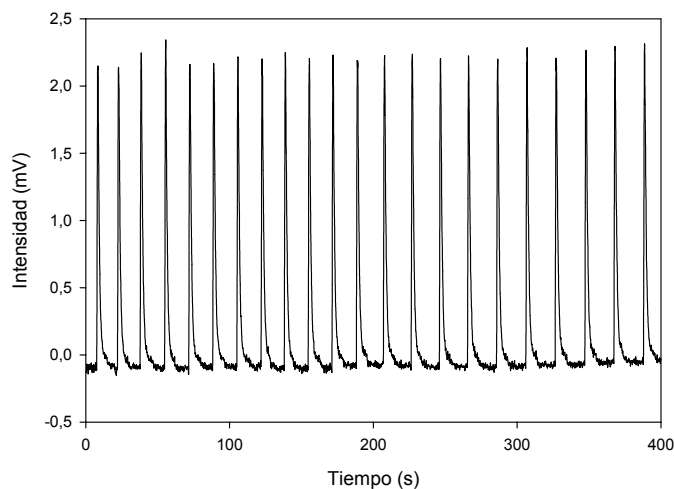
El límite de detección, calculado como tres veces la desviación estándar del blanco (obtenido cuando se inyectaba una disolución que no contenía catalizador), es: 1.1( $\pm 0.3$ )  $\mu\text{M}$  ( $n=10$ ).

**Figura 6.23:**  
Calibrado de  $\text{Co}^{2+}$ , en  
pequeño, ampliación de  
la zona lineal.  
Condiciones  
experimentales:  
 $V_{\text{iny}}=50 \mu\text{l}$ ;  
 $[\text{luminol}]=1.5 \text{ mM}$   
( $\text{pH}= 10$ );  
 $[\text{H}_2\text{O}_2]=97.9 \text{ mM}$



La repetitividad de los análisis se calcula a partir de 23 replicados de un patrón de  $\text{Co}^{2+}$   $20 \mu\text{M}$ . Se obtiene una intensidad media de  $2.29 \pm 0.02$  mV y una RSD de 2.3%. Es también importante destacar la elevada velocidad de muestreo del sistema. El tiempo de análisis es de 17 segundos, observándose un rápido retorno a línea de base, lo que indica una buena limpieza de todo el sistema.

**Figura 6.24:**  
Estudio de la  
repetitividad del  
sistema.



### 6.2.3.3 Evaluación del microsistema para la determinación de paracetamol basado en la inhibición inducida por éste en la reacción CL

Algunos compuestos, como el paracetamol (o acetaminofen), reaccionan con algunos de los catalizadores utilizados en la reacción de oxidación del luminol,<sup>11</sup> produciendo la inhibición de la emisión de radiación.

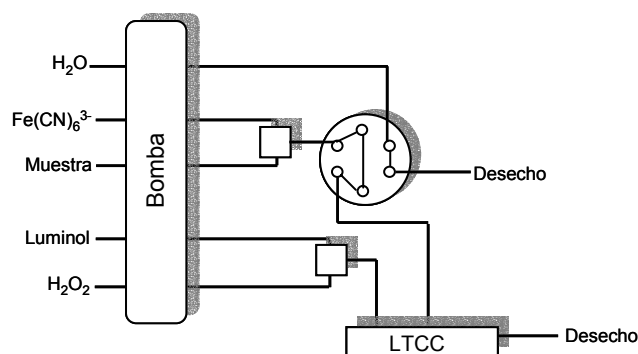
<sup>11</sup> Gregorio Alapont, A.; Lahuerta Zamora, L.; Martínez Calatayud, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, *21*, 311.

Este es el caso del hexacianoferrato (III) que actúa como catalizador de la reacción y es capaz oxidar a la vez el paracetamol, con el subsiguiente efecto inhibitor sobre la reacción entre el luminol y el peróxido de hidrógeno.

El montaje experimental utilizado se muestra en la figura 6.25. En una pieza T de metacrilato se mezclan la muestra, que contiene paracetamol, con el inhibidor  $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-})$  antes de llenar el bucle de inyección. La solución transportadora (agua) arrastra la muestra hacia el vórtex, donde se encuentra con una solución de luminol y peróxido que se han mezclado previamente en un punto de confluencia.

La aparente complejidad del sistema de flujo reside en el hecho de que los mismos dispositivos LTCC se han adaptado a aplicaciones de diferente naturaleza. Establecido un análisis concreto, la plataforma fluidica podría ser modificada fácilmente para que, antes de llegar a la celda de reacción, todos los reactivos implicados confluyeran dentro del propio dispositivo cerámico, sin necesidad de elementos externos (como las piezas de metacrilato en forma de T utilizadas como puntos de confluencia de canales).

**Figura 6.25:** Esquema del sistema de flujo empleado en los estudios de inhibición realizados con el dispositivo DO2.



Adaptando información recogida en la bibliografía,<sup>11</sup> se prepara una solución de luminol 1.9 mM, en tampón 0.4 M  $\text{NaHCO}_3$  ajustada a pH 10.8 con KOH, que se mantiene en refrigeración durante 48 horas antes de su uso. También se prepara una solución 1.8 mM de  $\text{Fe}^{3+}$  a partir de la disolución de una sal de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en el mismo tampón anterior. La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleada es de 17 mM.

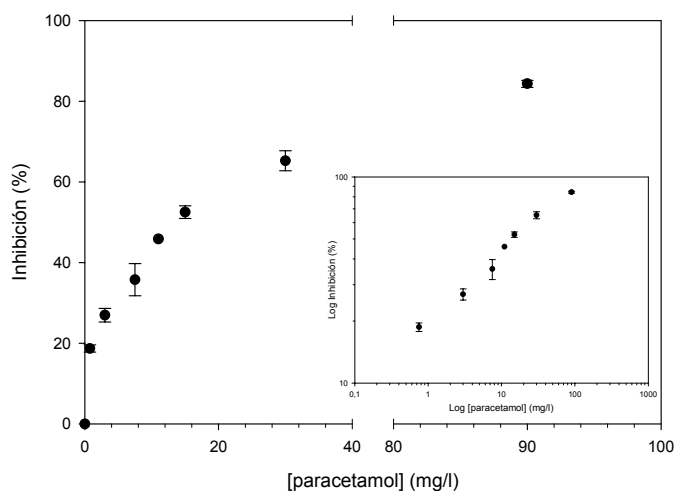
Bajo estas condiciones, se realiza un calibrado del microsistema inyectando patrones de paracetamol de concentración creciente. En primer lugar se obtiene la señal correspondiente a inhibición cero, inyectando agua. Para calcular la inhibición provocada por las diferentes concentraciones de paracetamol, se utiliza la expresión:

$$\%I = \frac{I_{\text{blanco}} - I_{\text{inhibición}}}{I_{\text{blanco}}} \cdot 100$$

La recta obtenida (ver Figura 6.26), es la siguiente:

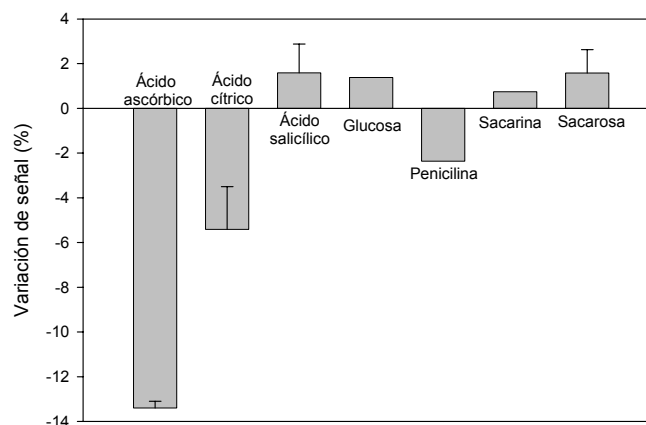
$\text{Log Inh} = 1.30(\pm 0.04) + 0.33(\pm 0.02) \cdot \log[\text{paracetamol}]$  ( $n=2$ ,  $r^2 > 0.98$ , 95% confianza), abarca un rango lineal de 0.75 a 90 mg/l, siendo el límite de cuantificación 750  $\mu\text{g/l}$ .

**Figura 6.26:**  
Calibrado obtenido por inhibición de la reacción CL del luminol con paracetamol.



Dado que se pretende aplicar este efecto inhibitor a la determinación de paracetamol en diferentes preparados farmacéuticos, se realiza un pequeño estudio del efecto de algunos compuestos presentes en la matriz de este tipo de formulaciones sobre la intensidad de la reacción CL. Se preparan disoluciones mixtas (analito-interferencia) con una concentración constante de paracetamol (7.5 mg/l) y las siguientes concentraciones de posibles interferentes: 7.5 mg/l de ácido ascórbico, 7.5 mg/l de ácido cítrico, 7.5 mg/l de ácido salicílico, 100 mg/l de glucosa, 10 mg/l de penicilina, 200 mg/l de sacarina y 150 mg/l de sacarosa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.27. El % de variación se calcula respecto a la inhibición causada por el patrón de control (7.5 mg/l de paracetamol). Una variación de señal negativa implica un incremento de la inhibición.

**Figura 6.27:**  
Efecto sobre la capacidad inhibitora del paracetamol en la reacción CL del luminol. No aparece la codeína.

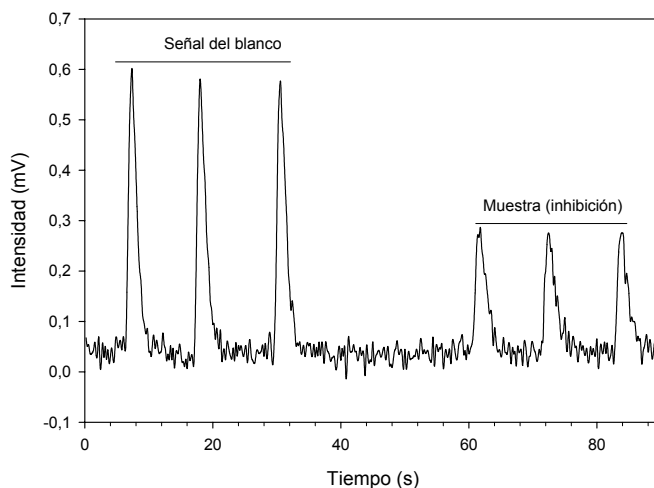




Como puede observarse en la figura 6.27, el ácido ascórbico y el cítrico son aquellos compuestos que más interferencia pueden causar al determinar paracetamol.<sup>12</sup> Dado que nuestro principal objetivo es demostrar la viabilidad de integración de este principio de detección en microsistemas fabricados con tecnología LTCC, no se ha procedido a estudiar la posibilidad de eliminar la interferencia de dichas especies. No obstante, el estudio del efecto de los interferentes realizado puede ayudarnos a evaluar los resultados obtenidos en el análisis de preparados farmacéuticos.

Previa molturación, los comprimidos se disuelven en agua y las disoluciones obtenidas se diluyen hasta obtener una concentración dentro del rango de trabajo del microsistema. En ocasiones, algunos componentes del medicamento eran insolubles por lo que se utilizó el sobrenadante.

**Figura 6.28:** Ejemplo de la metodología de realización de un análisis. Corresponde al comprimido Efferalgan (de Bristol-Myers Squibb).



La figura 6.28 permite visualizar el procedimiento seguido para la determinación de las muestras en base al registro de las señales obtenidas. Inicialmente, se obtiene por triplicado la señal correspondiente a la inyección de una disolución acuosa sin paracetamol (señal del blanco). A continuación se inyecta, también por triplicado, la muestra diluida de la formulación farmacéutica conteniendo paracetamol. A partir del valor medio del blanco y del de la muestra, se obtiene el porcentaje de inhibición. Los resultados obtenidos para las diferentes muestras analizadas aparecen en la tabla 6.7. Los resultados presentan una buena concordancia entre los valores teóricos (las disoluciones preparadas a partir del compuesto) y los encontrados mediante el método propuesto:  $|t_{\text{exp}}| = 1.45 < |t_{\text{crit}}| = 3.18$  (95%). Las diferencias, además, pueden explicarse en base a los componentes de la matriz de los diferentes comprimidos. Así, Frenadol contiene ácido ascórbico que, como se vio anteriormente, aumenta la inhibición de la reacción CL. Cod-efferalgan contiene ácido cítrico, que también incrementa la inhibición.

<sup>12</sup> Zhang, Z.J.; Qin, W. *Talanta*, **1996**, *43*, 119.

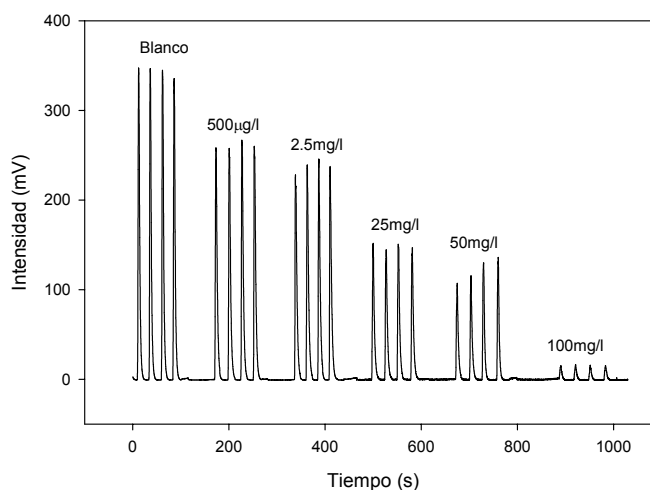
Compuesto farmacéutico	Concentración declarada (mg/comprimido)	Concentración de la muestra diluida (mg/l)	Concentración mediante CL (mg/l)
Ben-u-Ron	500	5	5±1 (n <sup>a</sup> =2)
Frenadol	650	10	13±1 (n=3)
Efferalgan	1000	20	20.4±0.1 (n=3)
Cod-efferalgan	500	50	60±4 (n=2)

<sup>a</sup>Cada replicado (n) consiste en la media de 3 picos de blancos y 3 de muestra (figura 6.28)

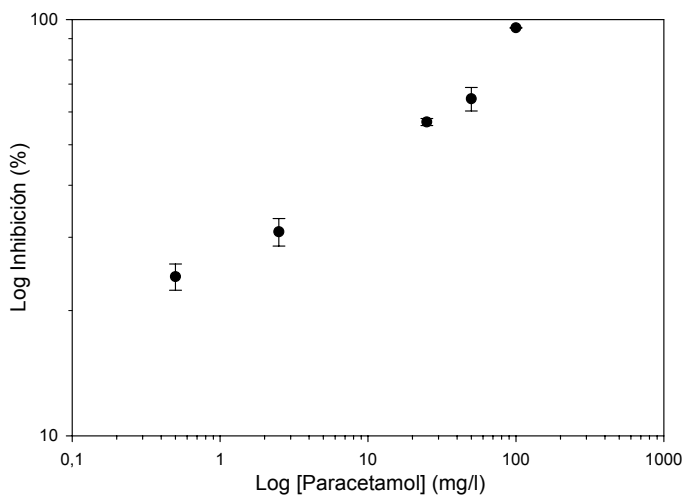
**Tabla 6.7:** Comparación de resultados obtenidos mediante el método CL.

En todos los experimentos realizados para la optimización del sistema quimioluminiscente se ha utilizado el fotodetector Hamamatsu S1337-66BQ.

El microsistema propuesto para la determinación de paracetamol se reevalúa utilizando un fotomultiplicador Hamamatsu H6779-02. Para estimar la mejora de sensibilidad obtenida con el nuevo detector se realiza un calibrado con patrones de paracetamol. Los picos obtenidos pueden observarse en la figura 6.29.



**Figura 6.29:** Registro de picos obtenidos con varias concentraciones de paracetamol.



**Figura 6.30:** Recta de inhibición resultante.

El uso del fotomultiplicador incrementa las señales obtenidas en un factor de 600, permitiendo detectar una concentración de paracetamol de hasta 500  $\mu\text{g/l}$ , tal y como puede observarse en la gráfica 6.30.

Dado el incremento substancial de sensibilidad, que mejora en un factor de cinco algunos de los resultados encontrados en la literatura,<sup>11</sup> se decide utilizar en posteriores trabajos el fotomultiplicador como sistema de detección.

#### **6.2.4 CONCLUSIONES**

La configuración de la celda de reacción en forma de cámara vórtex ha resultado muy útil para llevar a cabo reacciones quimioluminiscentes porque permite colocar el detector justo por encima de la zona donde tiene lugar la reacción facilitando así la medida del máximo de intensidad de emisión. El único inconveniente del diseño del microsistema es, como ya se comentó en el apartado §6.3, la dificultad de fabricar el dispositivo utilizando los equipos de microfresado mecánico (CNC). Sin embargo, la adquisición por parte del grupo de investigación de un equipo de mecanizado láser, permite ahora construir estos dispositivos con mucha mayor rapidez y sin limitaciones en cuanto al tamaño y número de canales a realizar.

Para aplicaciones futuras sería interesante integrar dentro del microsistema los elementos de microfluídica necesarios para el mezclado *in-situ* de los diferentes componentes del reactivo quimioluminiscente que, en este trabajo, se han realizado externamente mediante piezas en T.

## 7. OTRAS APLICACIONES

**E**n paralelo al desarrollo de los microanalizadores en LTCC, se diseñaron y construyeron otros dispositivos de igual importancia en la consecución de un verdadero microsistema total de análisis. Tal y como ya se puso de manifiesto en algunos apartados de la Introducción, el desarrollo de la tecnología LTCC es de marcado carácter multidisciplinar. Como muestra de ello, los dispositivos que aparecen en las siguientes secciones forman parte de la estrecha colaboración entre el Grupo de Sensores y Biosensores y el Instituto Tecnológico de La Laguna (México). Puesto que la aportación de este trabajo se basa en el diseño de las plataformas fluidicas y su aplicación en el ámbito de la química, no se entrará en detalles concernientes al diseño electrónico.

La idea básica de este capítulo es el demostrar la posibilidad de construir un sistema de análisis miniaturizado que integre todos los elementos necesarios utilizando únicamente material cerámico y su tecnología asociada.

### 7.1 Potenciómetro

En la construcción del sistema de medida potenciométrico miniaturizado se hizo uso de la tecnología LTCC del modo más convencional, sacando el máximo provecho de la compatibilidad entre sustrato y pastas conductoras serigrafiables, así como de la particularidad de fabricación multicapa, que permite reducir notablemente las dimensiones de los circuitos a realizar.

El modelo original del circuito electrónico, a partir del cual se diseñó el prototipo miniaturizado, fue el utilizado en los equipos analizadores fabricados por Adasa Sistemas, S.A.

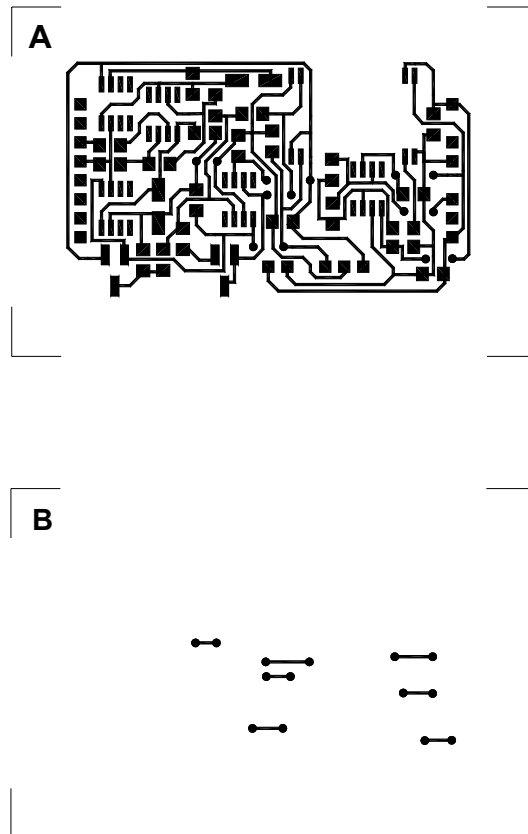
Al igual que al diseñar determinadas configuraciones de canales y cavidades, el dibujo del circuito a transferir a la malla serigráfica, tuvo que contemplar el encogimiento de las cerámicas. Este es un parámetro especialmente crítico, puesto que sobre las pistas conductoras se deberían soldar los componentes de montaje superficial necesarios para completar el dispositivo electrónico.

Los dispositivos fueron fabricados utilizando tanto materiales Dupont como Heraeus, pero sin intercambiar pastas serigráficas y cerámicas para lograr la máxima resolución en las pistas conductoras. Los dispositivos obtenidos con ambos materiales fueron satisfactorios. Además, el uso de cerámicas 0-*Shrinkage* de Heraeus facilitaba el diseño del circuito electrónico ya que este sustrato no presenta encogimiento en el eje X-Y. Sin embargo, debido al alto encogimiento en el eje Z (32%), para conferir al circuito de suficiente robustez era necesario el uso del doble de capas cerámicas. Es por ello que, finalmente, se optó por el uso de materiales Dupont para el desarrollo del módulo electrónico.

### 7.1.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Para la fabricación del potenciómetro, se utiliza la cerámica 951 de Dupont y las pastas conductoras 6146 (basada en Ag/Pd) para las pistas conductoras superficiales, la 6141 (de Ag) para las vías de conexión y la 6142 (de Ag) para las pistas conductoras de las capas internas, todas de la casa Dupont.

La siguiente figura muestra las dos capas componentes del potenciómetro:



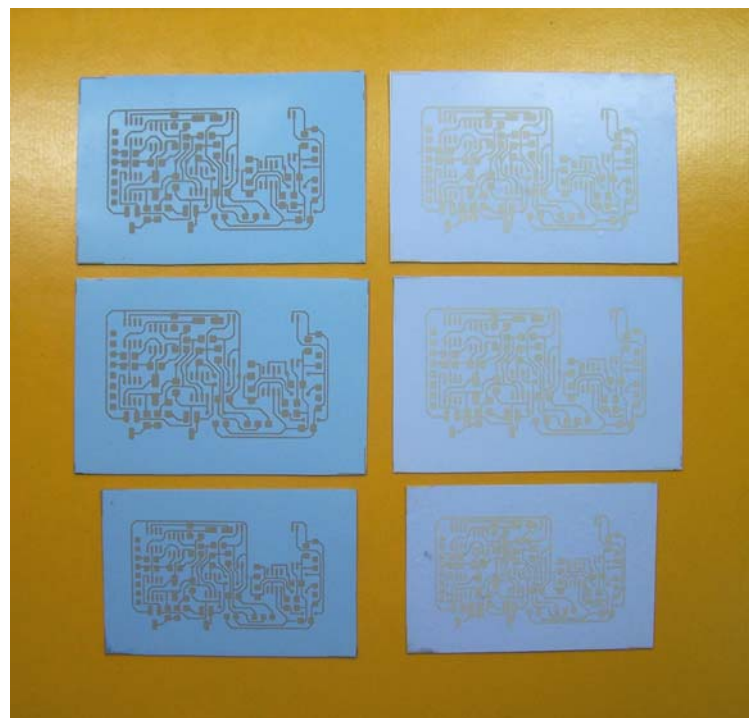
**Figura 7.1:**

**A:** circuito electrónico a serigrafiar en la superficie de la cerámica. **B:** conectores a serigrafiar en una capa interna. Ambas capas se conectaban mediante vías conductoras.

Para serigrafiar las pistas y siguiendo las especificaciones de Dupont, se utiliza una malla de acero inoxidable, de abertura 325 y emulsión de 12µm (ver Metodología de Fabricación §3.3). Antes de realizar la serigrafía con un equipo convencional, las capas de cerámica son preacondicionadas durante 25 minutos a 120°C. A continuación se laminan dos de estas capas para serigrafiar, por separado, cada uno de los motivos de la figura 7.1. Tanto las vías como las pistas conductoras son tratadas después de la serigrafía durante 5 minutos a 100°C, antes de laminar los dos conjuntos de cerámicas. El sinterizado final se realiza siguiendo el mismo perfil de temperatura empleado en el caso de los otros dispositivos construidos.

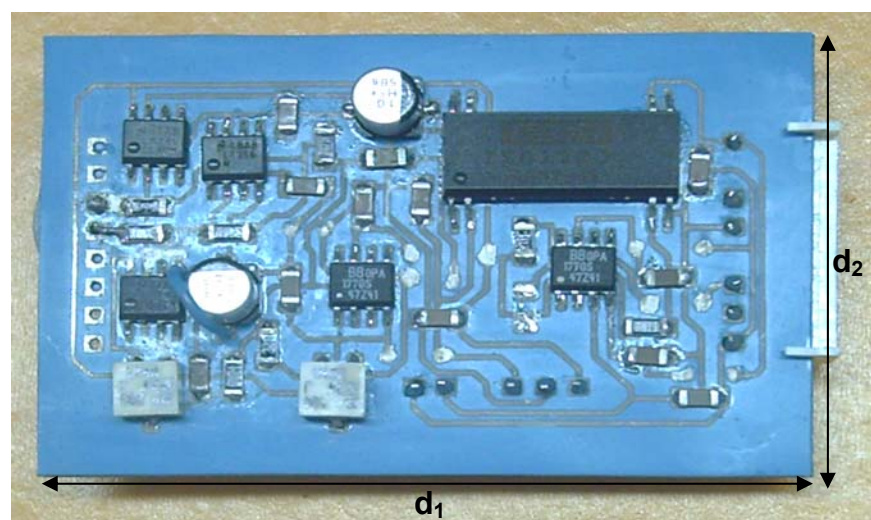
La figura 7.2 muestra los seis prototipos fabricados todavía en estado verde. El conjunto de la izquierda corresponde a materiales Dupont y el de la derecha a Heraeus.

Como se puede observar, se fabrican tres medidas de circuitos electrónicos: tamaño 100%, tamaño 112.7% (en el que se tenía en cuenta el posterior encogimiento del material) y tamaño 115% (teniendo en cuenta un hipotético encogimiento superior, que se había observado experimentalmente en algunos dispositivos construidos). Finalmente, se utiliza el potenciómetro diseñado escalando las medidas un 15% respecto al tamaño normal.



**Figura 7.2:**  
Variantes de los circuitos electrónicos construidos. A la izquierda, materiales Dupont; a la derecha Heraeus.

La figura 7.3 muestra una fotografía del dispositivo fabricado. Tal y como se puede observar, su reducido tamaño lo hace idóneo para poder ser adaptado monolítica o modularmente a otros dispositivos que integren la parte fluidica y sensora, para poder obtener un sistema de análisis cada vez más completo.



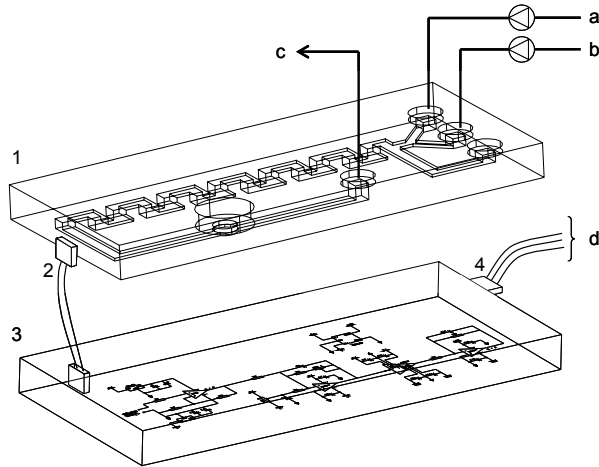
**Figura 7.3:**  
Fotografía del potenciómetro miniaturizado una vez soldados los elementos de montaje superficial.  $d_1=6$  cm;  $d_2=4$  cm.

### 7.1.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

El dispositivo químico empleado para la verificación del funcionamiento del potenciómetro es el DP2, correspondiente al analizador de cloruros. Ambos módulos se unen eléctricamente tal y como muestra la figura 7.4.

**Figura 7.4:**

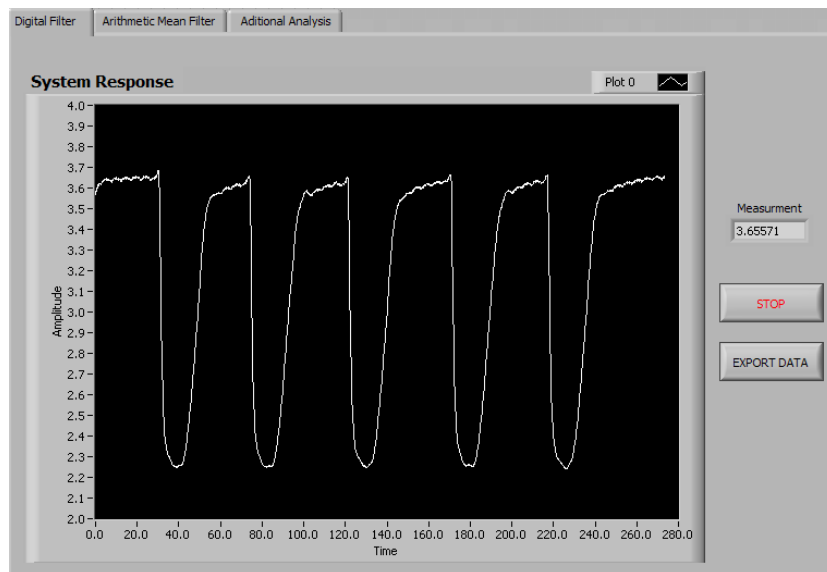
Montaje experimental:  
**a:** entrada de agua/muestra;  
**b:** solución acondicionadora;  
**c:** desecho;  
**d:** procesador digital de la señal; **1:** DP2;  
**2:** conector eléctrico;  
**3:** potenciómetro;  
**4:** alimentación y salida de la señal eléctrica.



El software para la adquisición de datos se ha diseñado en Labview 7.0 (National Instruments, Austin TX). La figura 7.5 muestra el panel frontal del instrumento virtual desarrollado. El instrumento recibe la señal desde el dispositivo LTCC a través de una de las entradas analógicas de la tarjeta NI 6221 DAQ. La señal es entonces filtrada y mostrada en la pantalla, tanto gráfica como numéricamente. Los datos adquiridos son exportados a una hoja de cálculo (Excel) para ser procesados posteriormente.

**Figura 7.5:**

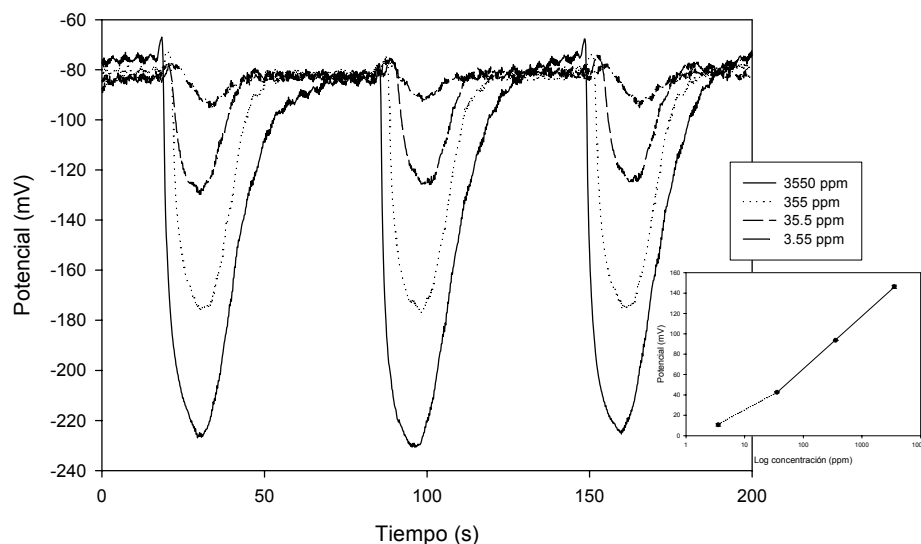
Panel frontal del instrumento virtual. Se muestran algunos picos obtenidos en la determinación de un patrón de cloruros.



### 7.1.3 EVALUACIÓN Y RESULTADOS

El potenciómetro se acopla modularmente al dispositivo utilizado para la determinación de cloruros (DP2). En la figura 7.6 se muestra una serie de calibrados sucesivos obtenidos con el dispositivo, así como una de las rectas de calibración:<sup>1</sup>

**Figura 7.6:**  
**A:** picos obtenidos en el proceso de calibrado,  
**B:** Curva de calibrado obtenida. Se usó la tarjeta de adquisición NI 6221.



Los análisis se llevan a cabo utilizando las siguientes condiciones experimentales: caudal de 1.55 ml/min; volumen de inyección de 300  $\mu$ l; solución acondicionadora  $K_2SO_4$  0.1 M ajustada a pH 2.4 con  $H_2SO_4$ . El calibrado obtenido responde a la siguiente ecuación:

$E = -38(\pm 1) + 51.8(\pm 0.7) \cdot \log[Cl^-]$  ( $n=3$ , 95%,  $r^2 > 0.999$ ). El límite de detección encontrado es de  $5.4(\pm 0.1)$  ppm y la RSD, para un patrón de 355 ppm, de 0.11% ( $n=15$ , 95%). Los resultados demuestran el buen funcionamiento del potenciómetro miniaturizado acoplado al dispositivo analizador de ión cloruro.

### 7.1.4 CONCLUSIONES

En anteriores capítulos de esta tesis se ha pretendido demostrar la idoneidad de la tecnología LTCC para la fabricación de dispositivos fluidicos aprovechando, entre otras ventajas, su enfoque multicapa, que ha sido ampliamente explotado por la industria electrónica para conseguir dispositivos de reducido tamaño. En este apartado se muestra como, mediante el uso de una única tecnología, pueden construirse tanto módulos fluidicos como electrónicos.

Desde el punto de vista estrictamente modular se podría haber construido el potenciómetro utilizando otro tipo de sustrato más convencional como el PCB.

<sup>1</sup> Martínez-Cisneros, C.S. *Trabajo de investigación*, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España, 2007.



Sin embargo, estos materiales no permiten algo importante desde nuestro punto de vista: la aproximación multicapa con la que se logra reducir el tamaño del dispositivo y la posibilidad de construir sistemas de análisis totales que integren monolíticamente tanto la gestión de fluidos como la detección y el tratamiento de la señal mediante el uso de un único sustrato y una única tecnología.

## **7.2 Microsistemas con control de temperatura integrado**

Como ya se ha mencionado, la integración de componentes electrónicos y fluidicos mediante el uso de una única tecnología puede realizarse modular o monolíticamente. En el caso del potenciómetro miniaturizado descrito en el anterior apartado, se aprovechan las ventajas de la modularidad, permitiendo su uso con diferentes plataformas fluidicas. En ocasiones, sin embargo, electrónica y fluidica deberán formar parte del mismo dispositivo cerámico. El ejemplo que se presenta en este apartado muestra la integración de un sensor y un actuador para llevar a cabo el control de temperatura en un analizador miniaturizado. Tal y como ya se explicó en la Introducción (apartado §1.5.4), existen diversas reacciones en las que un control exacto de la temperatura puede resultar crucial. Tal es el caso de sistemas basados en el uso de reactivos enzimáticos o de amplificación de ADN.

Previo al diseño del dispositivo que integraría fluidica y electrónica de control de temperatura, fue necesario caracterizar por separado el actuador (resistor) y el sensor (termistor), que constituyen los elementos clave para este tipo de control electrónico.

### **7.2.1 MATERIALES Y REACTIVOS**

Se utilizan cerámicas Dupont 951AX, pasta conductora 6146 de Ag/Pd y pasta resistiva CF021 (100 ohms/sq), ambas de Dupont. La pasta termistora es la R131 (1000 ohms/sq) de Heraeus. La pantalla de *screen-printing* utilizada es de acero inoxidable (50  $\mu\text{m}$  de grosor) y la máquina serigráfica, una DEK 248 (Asflex Internacional, España). La caracterización de los dispositivos en flujo se realiza utilizando bombas peristálticas y tubos, tanto de teflón como de silicona, convencionales.

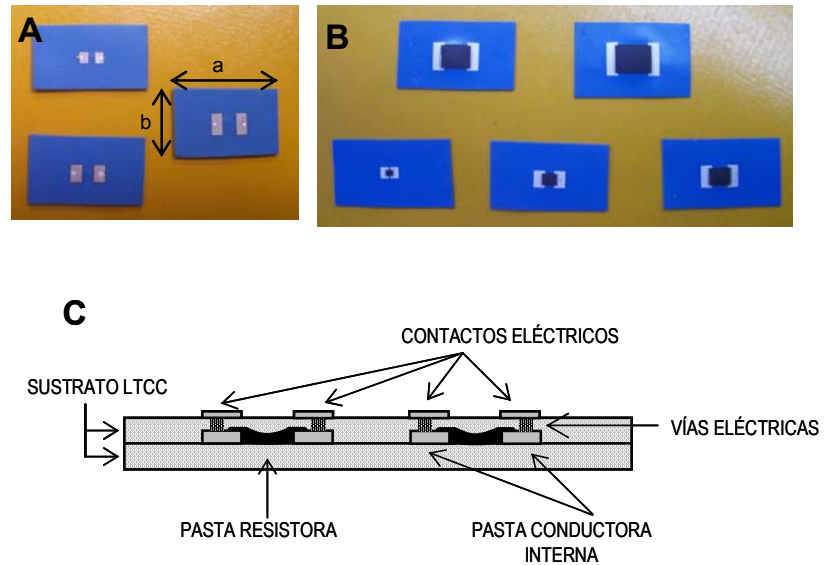
Para calentar los dispositivos de manera controlada se utiliza un horno programable Carbolite CBC2F11/23P16 (Afora, España) y un termómetro basado en un termopar (Fluke 179 Multimeter, Everett, WA USA). Antes de realizar la serigrafía de las pastas es necesario precondicionar las cerámicas durante 25 minutos a 120°C, siguiendo las especificaciones del fabricante. Después de cada serigrafía, las pastas y vías deben secarse a 100°C durante unos 5 minutos. Los procesos de laminación y sinterización son análogos a los empleados en otras ocasiones.

En la figura 7.7 se pueden ver algunos de los dispositivos evaluados por separado (sin formar parte de ningún microsistema de flujo) así como un esquema de la conexión externa.

La elección del resistor se realiza estableciendo un compromiso entre la temperatura generada y la potencia aplicada. El mejor termistor se escoge también en términos de requerimientos de corriente y potencial, así como de sus dimensiones reducidas. Una vez caracterizados de manera aislada, se diseñan diversos prototipos que integran el control de temperatura (conjunto sensor-actuador), la fluidica y los canales de aislamiento para evitar, en la medida de lo posible, la disipación de calor a través de la cerámica.

**Figura 7.7:**

**A:** Dispositivos utilizados para evaluar el comportamiento del termistor y del resistor. Se pueden observar sobre su superficie las pistas conductoras para realizar el contacto eléctrico con el exterior.  
**a:** 1.5 cm; **b:** 1 cm;  
**B:** áreas conductoras internas. En negro el termistor y en gris los conductores;  
**C:** esquema que muestra las capas serigrafiadas.

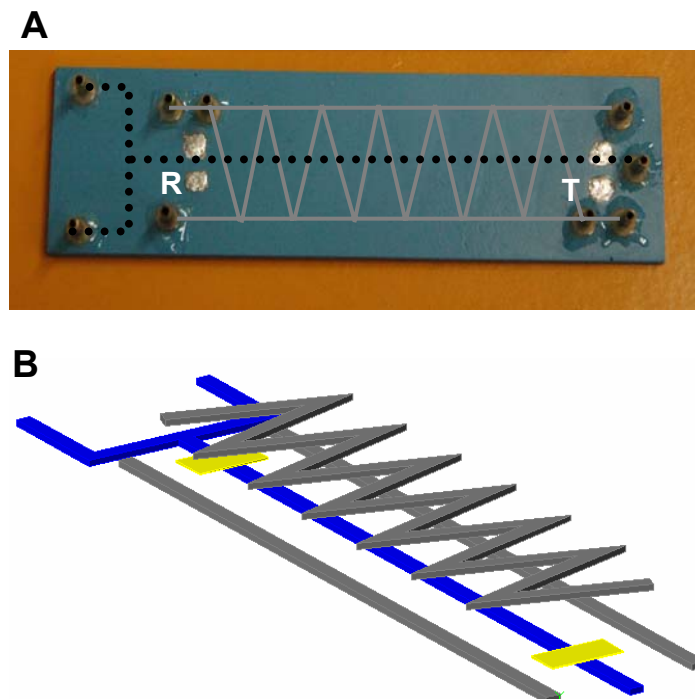


### Prototipo 1

El primer dispositivo construido es el que aparece en la figura 7.8.

**Figura 7.8:**

**A:** fotografía del dispositivo cerámico (3x5.4 cm), donde **R:** resistor y **T:** termistor. La línea punteada indica el canal de líquido y las grises los canales de aislamiento. Los cables de conexión con el sistema de medida externo se soldaban sobre los puntos **R** y **T**.  
**B:** esquema tridimensional de la estructura interna del dispositivo. En azul el canal de líquido; en amarillo las pistas serigrafiadas y en gris los canales de aislamiento.

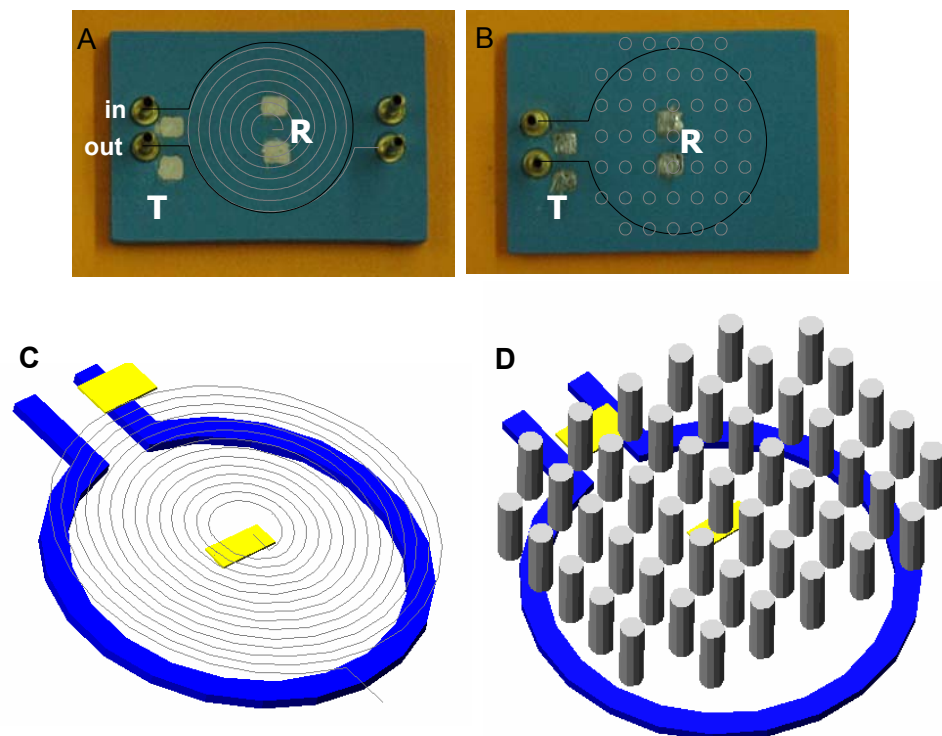


Tal y como se puede observar en la figura 7.8B, se diseña un canal de líquido recto (marcado en azul). En la capa de cerámica que cubre este canal se serigrafían el sensor (termistor) y el actuador (resistor), que se esquematizan en amarillo. Experiencias previas demuestran la necesidad de asegurar un buen confinamiento del calor dentro del canal de líquido, por lo que se diseñan y construyen estructuras de aislamiento que permitan el paso de aire o agua a través suyo. Consisten en dos canales paralelos al canal de líquido y un tercer canal en forma de zig-zag situado sobre el canal de líquido y sobre la capa de cerámica que contiene las pistas serigrafadas

### Prototipos 2 y 3

**Figura 7.9:**

**A y B:** fotografías de los prototipos 2 (3x4.6 cm) y 3 (3x4.9 cm), respectivamente, donde *in*: entrada de líquidos, *out*: salida de líquidos, **T**: resistor, **R**: resistor. **C y D:** esquemas de la estructura tridimensional de los dispositivos. En azul los canales por los que circula el líquido, en amarillo las pistas serigrafadas y en gris las estructuras de aislamiento.

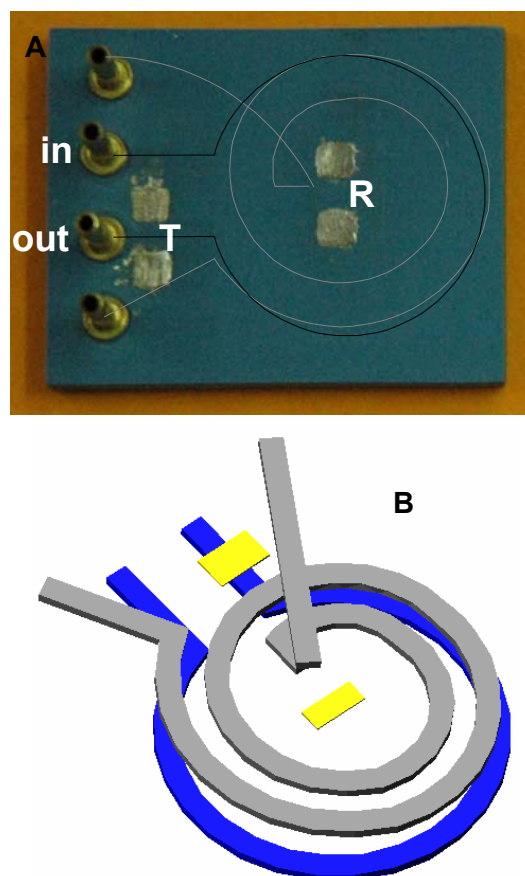


El primer prototipo muestra una distribución radial del calor generado por el resistor. Para poder aprovecharlo mejor se diseñan los dispositivos 2 y 3, donde el canal de líquido se sitúa de manera concéntrica al foco de calor, tal y como se puede ver en la figura 7.9. También en esta ocasión se coloca el sensor a la salida del canal de líquido (indicada como *out* en la figura 7.9A). Se evalúan dos geometrías para los canales de aislamiento: dos espirales concéntricas, sobre y bajo el canal fluido (figura 7.9A), a través de las cuales se puede hacer fluir aire o agua, y una estructura columnar, también sobre y bajo el canal fluido (figura 7.9B). En concreto se trata de un conjunto de 45 columnas que, al sinterizar el dispositivo, dejan aire alojado en su interior para que actúe como aislante. Las figuras 7.9C y 7.9D muestran las estructuras internas tridimensionales.

Siguiendo la misma nomenclatura de colores, en azul aparece el canal a través del cual se hace fluir el líquido a calentar, en amarillo las pistas conductoras y en gris las estructuras aislantes. Respecto a las pistas serigrafiadas, hay una diferencia respecto al dispositivo de la figura 7.8. En este caso, el resistor se serigrafía en el mismo plano (o misma capa de cerámica) en la que se realiza el canal para el transporte de líquido, mientras que el termistor se coloca en la capa superior que tapa este canal para que la pasta no entre en contacto directo con el líquido, como sucediera en el anterior dispositivo.

#### Prototipo 4

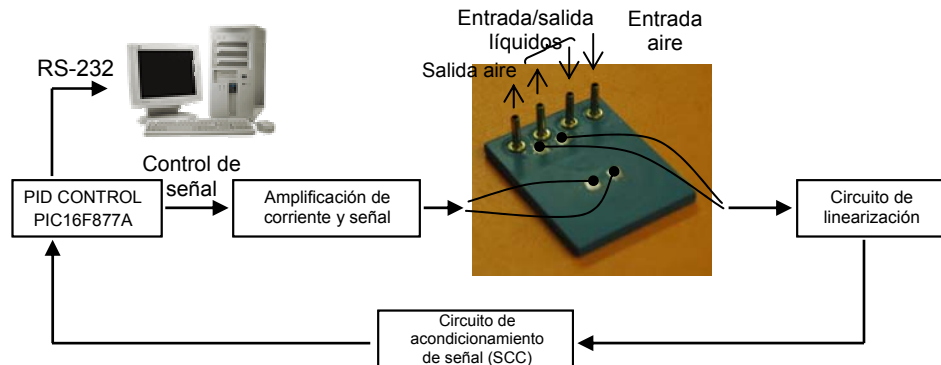
El prototipo que aparece en la figura 7.10 fue diseñado y construido en base a los resultados obtenidos en la evaluación de los prototipos 2 y 3. Consiste en un canal concéntrico respecto a la posición del resistor, para aprovechar la distribución radial del calor. La posición del resistor y del termistor es la misma que en el caso de los prototipos 2 y 3. La principal diferencia se encuentra en los canales de aislamiento. Se construyó una espiral sobre y bajo el plano que contenía el canal de líquido y el del termistor, de mayor amplitud que la espiral utilizada en el prototipo 2 para aumentar el área de refrigeración y disminuir la complejidad de fabricación de la espiral de este prototipo.



**Figura 7.10:**  
**A:** fotografía del dispositivo (3x3.9 cm) y  
**B:** estructura interna tridimensional.

## 7.2.2 MONTAJE EXPERIMENTAL

**Figura 7.11:** Diagrama de la integración de la electrónica y microfluídica en configuración *feedback*.



El esquema del montaje experimental utilizado aparece en la figura 7.11. En él se esquematiza el proceso de realimentación del sistema. La señal del control se genera mediante un microcontrolador y es amplificada antes de aplicarla al resistor dentro del sistema microfluídico. La medida de la temperatura, que se realiza gracias al termistor ubicado en la salida del canal de líquido, actúa como realimentación del sistema.

El sistema de flujo utilizado consiste en una bomba peristáltica y los tubos necesarios para impulsar los líquidos o aire a través del dispositivo cerámico.

## 7.2.3 EVALUACIÓN Y RESULTADOS

### 7.2.3.1 Caracterización del termistor y el resistor

En primer lugar se lleva a cabo la caracterización y optimización de los resistores y termistores. Respecto a los resistores, la restricción exigida es que proporcionen la máxima temperatura con la mínima potencia aplicada y la mínima área serigrafada. Su caracterización se realizaba aplicando un potencial y midiendo la temperatura sobre su superficie con un termopar.

El termistor considerado óptimo será aquél que presente mejor linealidad en el rango de temperatura deseado. Su caracterización se lleva a cabo variando la temperatura sobre el dispositivo (mediante el uso de un horno programable), comprobando la temperatura del dispositivo con un termopar y midiendo, en un circuito eléctrico, la diferencia de potencial obtenida como resultado de las variaciones de resistencia por el termistor.

El termistor seleccionado (de dimensiones 0.5x0.325 cm) es el que responde según la ecuación:  $T=3.67 - 32.4 \cdot E$  (donde T= temperatura y E = potencial), debido a su mayor pendiente y estabilidad con el tiempo. El resistor escogido (0.5x0.21 cm) es aquél que con tan sólo 12.4 V y 85 mA (1.054 W) alcanza temperaturas de 111°C.

Una vez optimizados, el sensor y el actuador se integran en el primer prototipo. Dentro del sistema cerámico han de ser recharacterizados dado que el entorno en el que se encuentran es significativamente diferente al inicial.

### Prototipo 1

El primer prototipo se descarta porque se observa que la distribución del calor se produce de manera radial con lo que el diseño propuesto es el que menos aprovecha la temperatura. Por este motivo se diseñan los prototipos 2 y 3.<sup>2</sup>

El prototipo 1, sin embargo, resulta útil para evaluar el tipo de aislamiento a utilizar. Cuando se usa el canal en zig-zag (por encima del canal de líquido) el termistor mide una temperatura máxima de 44°C cuando se usa agua y de 50°C cuando se usa aire. Cuando los canales de aislamiento utilizados se encuentran paralelos al canal de líquido, la máxima temperatura a la que se llega fue de 36.2°C, para agua, y 42.8°C, para aire. El aire ayuda a confinar mejor el calor debido a su inferior coeficiente de conductividad térmico (0.0264 W/m°K).<sup>3</sup> Por otro lado, el uso de estructuras de aislamiento en el plano superior al canal de líquido parece ser mejor opción para conseguir un confinamiento del calor más efectivo.

### Prototipo 2 y 3

La diferencia entre estos prototipos se encuentra en el sistema de refrigeración escogido. En ambos casos, las estructuras se sitúan por encima y por debajo del plano que contiene el canal por el que circula el líquido a calentar. Experimentalmente se observa que, de entre las dos geometrías, el canal en forma de espiral, circulando aire por su interior, resulta ser más efectivo para lograr un confinamiento del calor tal que permita calentar más el líquido que fluye por los canales.

### Prototipo 4

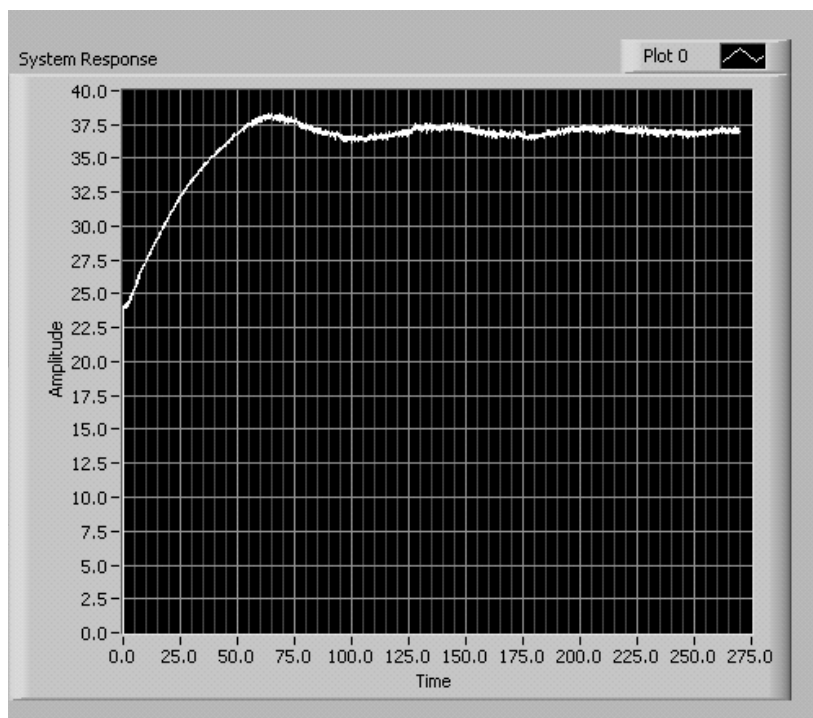
La principal aportación del prototipo 4 es una mayor superficie de canal de aislamiento. Es interesante observar la ecuación obtenida en la recaracterización del termistor:  $T = 2.72 - 7.55 \cdot E$ . La menor pendiente del termistor, en comparación a la obtenida en el proceso de caracterización de los dispositivos aislados, cuando no formaban parte de un sistema de flujo, se asocia al hecho de que, en esta ocasión, el sistema cerámico es más complejo, hay más capas entre las pistas conductoras y la superficie. En estas condiciones, la probabilidad de que el estrés ocasionado durante el proceso de sinterizado afecte al comportamiento del termistor, aumenta significativamente.

Para optimizar aún más el confinamiento de calor, se evalúa el efecto del caudal de aire que pasa por los canales en forma de espiral. Se observa que menores caudales facilitan una mayor transferencia de calor del resistor al líquido. Por este motivo, se decide utilizar esta metodología de trabajo para realizar la monitorización del calentamiento de líquido.

<sup>2</sup> Martínez-Cisneros, C.S.; Ibanez-Garcia, N.; Valdes, F.; Alonso, J. *aceptado en Sens. Actuators A-Phys.*

<sup>3</sup> Lemmon, E.W.; Jacobsen, R.T. *Int. J. Thermophys.*, **2004**, *25*, 21.

El programa desarrollado para monitorizar la evolución de la temperatura del líquido se basa en Labview 7.0 y se muestra en la figura 7.12. Tal y como se puede observar, el sistema requiere de unos 5 minutos de estabilización. Pasado este periodo, se obtiene una estabilización de la temperatura de  $37.36 \pm 0.07^\circ\text{C}$  (para  $n=10$ , 95%).



**Figura 7.12:**  
Estabilización de la señal obtenida, con oscilaciones de  $\pm 0.07$  en el estado estacionario.

#### 7.2.4 CONCLUSIONES

Durante la mayor parte del contenido de esta tesis se ha presentado el sustrato y la tecnología LTCC como una alternativa a tener en cuenta en la fabricación de plataformas fluídicas para la fabricación de microsistemas de análisis, que permitieran integrar una o más etapas del procedimiento analítico (pretratamiento, detección). En este último capítulo se ha mostrado de manera muy general una de las aplicaciones más habituales de este material, haciendo uso de su compatibilidad con la tecnología de *screen-printing*: la fabricación de módulos electrónicos. La conclusión más destacable es la posibilidad de fabricar, mediante el uso de un sustrato y una tecnología única, de manera modular o monolítica, que es aún más interesante, sistemas que incluyan la fluídica y la electrónica de control.

En la actualidad, en el grupo de investigación, se trabaja en la integración monolítica de la fluídica y la electrónica para llevar a cabo la determinación potenciométrica de cloruros, tal y como ya se realizara anteriormente de manera modular.

Por otro lado, en vista de la precisión conseguida por el conjunto actuador-sensor, se trabaja en el diseño de dos sistemas que puedan hacer uso del control de temperatura.

Uno de estos sistemas integra el conjunto resistencia-termistor, así como una ventana para llevar a cabo determinaciones colorimétricas basadas en el uso de reactivos enzimáticos. En paralelo, se siguen optimizando estructuras de refrigeración que resulten lo más eficaces posibles para el diseño de microsistemas de amplificación de ADN (PCR).



## 8. CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de los diferentes capítulos que conforman esta memoria, se han ido presentando las conclusiones parciales concernientes a cada dispositivo diseñado y evaluado. Se han remarcado los excelentes resultados obtenidos, así como las desventajas observadas en algunos sistemas y se han propuesto soluciones, algunas de las cuales se están llevando a cabo en la actualidad.

A modo global, cabría enfatizar que los resultados obtenidos ponen en evidencia las ventajas ofrecidas por la tecnología LTCC para realizar la construcción de microsistemas de análisis. Entre ellas, deberíamos destacar la facilidad con que es posible construir prototipos de analizadores con estructura multicapa, lo que facilita enormemente la integración de las operaciones unitarias del procedimiento analítico. Asimismo, se ha demostrado la posibilidad de compatibilizar e integrar monolítica o modularmente tanto la fluídica como la electrónica de control y detección asociada.

Como demostración de lo dicho, se han integrado y evaluado exitosamente etapas de pretratamiento (mezcla, difusión gaseosa, preconcentración), sistemas de detección (amperométrico, potenciométrico, óptico) y sistemas de electrónicos de medida y control.