

PROYECTO FINAL DE CARRERA

Ingeniería Técnica Industrial, Especialidad Química Industrial

***DESARROLLO DE MICROANALIZADORES MEDIANTE TECNOLOGÍA LTCC
PARA LA MONITORIZACIÓN DE PARÁMETROS AMBIENTALES***

Bárbara Baena Pérez
Cerdanyola del Vallès, setembre de 2009



María del Mar Baeza Labat, professora lectora del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que l'alumne Bárbara Baena Pérez ha dut a terme, sota la seva direcció, el treball amb títol "**Desarrollo de microanalizadores mediante tecnología LTCC para la monitorización de parámetros ambientales**" que presenta en aquesta memòria, la qual constitueix el seu treball en l'assignatura "Projecte Final de Carrera" (Codi 24675).

I perquè consti als efectes que correspongui, es presenta el treball esmentat davant l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona, signant el present certificat.

Cerdanyola del Vallès, 18 de setembre de 2009

María del Mar Baeza Labat

ÍNDICE

0	Resumen	1
1	Introducción	3
1.1	Monitorización.....	3
1.2	Analizadores miniaturizados	4
1.3	Características del flujo en microsistemas	7
1.4	Ventajas e inconvenientes de los dispositivos microfluídicos	8
1.5	Determinación de ión nitrito	8
2	Objetivos	11
3	Materiales y métodos.....	13
3.1	Materiales y reactivos	13
3.2	Montaje experimental.....	14
3.2.1	Características del dispositivo	14
3.2.2	Descripción del sistema	15
3.2.3	El sistema de detección	16
3.2.4	Programa de gestión	18
4	Estudios preliminares	21
4.1	Comparación de caminos ópticos sin reacción química	21
4.2	Comparación de grado de mezcla con reacción química	24
5	Diseño y construcción del dispositivo	27
5.1	Fabricación del dispositivo	27
5.1.1	Diseño en CAD del dispositivo	28
5.1.2	Mecanizado de las capas.....	30
5.1.3	Laminación.....	30

5.1.4	Sinterización.....	32
5.2	Comparación de celdas de flujo.....	34
6	Optimización.....	37
6.1	Características microfluídicas	37
6.1.1	Estudio previo	38
6.1.2	Evaluación de las características microfluídicas del microsistema	39
6.2	Estudio de la respuesta del microsistema	42
6.2.1	Diseño de experimentos.....	42
6.2.2	Resultados del estudio de respuesta del microsistema	44
6.3	Selección de las condiciones óptimas de operación	47
7	Caracterización del microsistema	51
7.1	Límite de detección.....	51
7.2	Repetitividad	52
8	Validación del microsistema	55
8.1	Análisis de muestras reales	55
8.2	Análisis estadístico	58
8.2.1	Test de la regresión lineal	58
8.2.2	Prueba t para medias de dos muestras emparejadas.....	59
9	Conclusiones	61
10	Bibliografía.....	63
11	Anexos	67

0 Resumen

El presente proyecto recoge el trabajo experimental realizado en el Grup de Sensors i Biosensors del departamento de química para desarrollar un dispositivo miniaturizado válido para la determinación de ión nitrito en aguas contaminadas. , Dentro de esta tarea, se han construido varios dispositivos con el objetivo de determinar el diseño que presenta mayores ventajas. Se ha continuado con los experimentos a fin de establecer las condiciones óptimas de operación; trabajo que, ha consistido en la observación de la respuesta obtenida frente a diferentes condiciones de trabajo: caudal, volumen de inyección y concentración. Posteriormente, se ha caracterizado el microsistema hallando el límite de detección y la repetitividad. Finalmente, se ha concluido la parte experimental con el análisis de muestras reales a fin de validar el microsistema construido.

En la memoria presentada, los primeros capítulos se han dedicado a la descripción del proyecto: objetivos, materiales y reactivos, montaje experimental, etc. A continuación, en el capítulo 1, se muestra una introducción con la que se pretende definir algunos conceptos y dar una visión general del estado de la tecnología asociada a la miniaturización de sistemas analíticos. Todos los resultados y discusiones de la sección experimental se encuentran agrupados en los capítulos del 4 al 8, conservando el orden cronológico a fin de guardar una relación lógica entre los resultados obtenidos y las etapas siguientes del trabajo.

1 Introducción

1.1 Monitorización

En la actualidad existe una gran demanda de información analítica generada por el planteamiento de problemas con origen en la industria, el medioambiente, en el ámbito médico o social en general. Adicionalmente, esta información ha de ser de mejor calidad ya que ha aumentado la necesidad de determinar concentraciones cada vez más pequeñas en espacios más cortos de tiempo, con una mayor precisión y exactitud. Con esta finalidad, se requiere instrumentación que permita realizar análisis cuantitativos y cualitativos para obtener medidas *in situ* con una alta selectividad.

En las últimas décadas se ha investigado en dos líneas complementarias. Por una parte se han diseñado equipos grandes adaptables a la determinación de un gran número de analitos, y por otra, se han miniaturizado sistemas analíticos pensando en su utilización *in situ* para disponer de información en continuo y en tiempo real. En el primer caso, se requiere un elevado mantenimiento, mano de obra especializada y un laboratorio adaptado adecuadamente, lo que conlleva un incremento del coste. Y en los segundos, los costes tanto de mantenimiento como de mano de obra se ven reducidos ya que en muchos casos los sistemas miniaturizados son más robustos y portátiles pudiendo ser utilizados por personal no especializado. La monitorización se define como un conjunto de metodologías analíticas que permiten extraer información de sistemas en evolución. En el caso concreto de la monitorización ambiental, se puede decir que el objetivo principal es la obtención de

información procedente de sistemas naturales o industriales de forma continua, *in situ* y en tiempo real.

Los métodos tradicionales de monitorización ambiental consisten en la realización de un muestreo y su posterior análisis en laboratorio. De esta manera, cuando se requiere realizar un gran número de análisis de rutina, la automatización puede reducir de manera contundente el tiempo de análisis y el coste de personal.

Con esta concepción, en la que resalta el propósito de integrar el método analítico y hacer equipos portátiles, se encuentran los microsistemas de análisis integrados y los sensores químicos. Siguiendo en esta dirección, el futuro desarrollo sería incorporar sistemas inteligentes en los sistemas analíticos dotándoles de la capacidad autónoma suficiente para hacer las operaciones de calibración, optimización y adaptación a situaciones variables (Betteridge et al., 1986).

1.2 Analizadores miniaturizados

Actualmente, los problemas medioambientales e industriales requieren de sistemas analíticos que hagan posible la obtención de datos en tiempo real, *in situ* y *on-line*. Esto implica una elevada capacidad de muestreo, análisis rápidos, sistemas robustos y costes bajos de operación y mantenimiento. Las técnicas de flujo continuo son las que mejor cumplen estos requisitos. Algunos ejemplos de estas técnicas son: flujo segmentado, flujo continuo, flujo intermitente, flujo detenido (*stopped-flow*) y microflujo.

La técnica de análisis por inyección en flujo (*Flow Injection Analysis*, FIA) fue inicialmente aplicada para automatizar análisis de rutina con una alta frecuencia de muestreo (Ruzicka, 1975). Esta técnica se basa en la inyección de una porción de muestra líquida en una disolución portadora o de reactivo que circula de forma continua. La porción de muestra es impulsada hacia el detector que continuamente está realizando lecturas. Durante el camino hacia el detector, las interfases delantera y trasera de la porción de muestra se diluyen. Esta técnica además permite el uso de reactivos para dar lugar a reacciones químicas determinadas. La conjunción de ambos fenómenos da lugar a la dispersión (Valcárcel y Luque de Castro, 1984). En la figura 1.1 se ha representado un esquema que muestra los principales elementos de esta técnica y el tipo de respuesta obtenida.

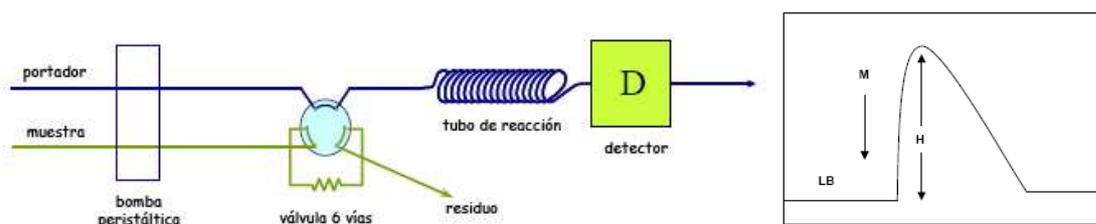


Fig. 1.1 Esquema básico de un sistema FIA (izquierda). Señal característica obtenida en un sistema FIA (derecha): M) inyección, LB) línea base, H) altura de pico.

Las características principales de un sistema de análisis por inyección en flujo continuo son: la introducción de un volumen fijo y constante de muestra (volumen de inyección); la dispersión controlada de éste; y, un tiempo de residencia de la muestra en el sistema constante y reproducible.

Esta metodología de flujo continuo ha sido ampliamente utilizada para la automatización de procesos de análisis. En la actualidad está siendo integrada en sistemas microanalíticos mediante el desarrollo de microanalizadores donde se integran todas las etapas del procedimiento analítico. El concepto de microsistema de análisis total (*Micro Total Analysis Systems*, μ -TAS) fue definido por Manz et al. en 1990, como sistemas analíticos miniaturizados que incorporan todos los elementos necesarios para la realización de todas las etapas del procedimiento analítico. En la mayoría de los trabajos publicados sobre sistemas microfluídicos durante la década de los años 90, se ha utilizado como materiales para su construcción vidrio, cuarzo o silicio. Pese a que los chips de silicio han sido muy utilizados, estos presentan algunas limitaciones en cuanto a construcción, especialmente en lo referido a la tridimensionalidad del dispositivo y a la integración de sistemas de detección electroquímicos. El mismo problema presentan otros materiales utilizados como el cuarzo y el vidrio. Además, los tres materiales: vidrio, silicio y cuarzo, necesitan de mucho tiempo y personal cualificado para su uso, además de la necesidad de utilización de salas blancas lo que encarece considerablemente el proceso.

Como solución a estos problemas, se ha presentado la alternativa del uso otros materiales para la construcción de microdispositivos. El uso de polímeros, como por ejemplo el polidimetilsiloxano (*Polydimethylsiloxane*, PDMS), el cual ha tenido muy buena aceptación en el campo de la miniaturización de sistemas analíticos, al presentar algunas ventajas por ser un material barato, fácil de manipular y presentar un menor coste de fabricación. Por otro lado, este material presenta algunas desventajas, ya que la construcción de este tipo de dispositivos necesita instrumental complejo, y son susceptibles a la presión generada por el paso de fluidos en su interior, llegándose a provocar pérdidas de estanqueidad y deformación de las estructuras internas (Li et al., 2005).

Con el objetivo de conseguir sistemas de análisis total miniaturizados (μ -TAS), se han de tener en cuenta tanto los elementos de microfluídica y los materiales con los que se construyen; así como, otros elementos necesarios para realizar el proceso analítico completo como bombas, válvulas, etapas de pretratamiento de muestra, sistemas de detección y el control integrado de todas las etapas. Cada una de estas operaciones unitarias puede conllevar al uso de materiales específicos. Por ejemplo, elementos de bombeo accionados mediante imanes para impulsar los líquidos a través de los canales; etapas de pretratamiento integrando una resina de intercambio iónico, sistemas de detección que pueden requerir del uso de pistas serigrafiadas conductoras, o la inserción de otro tipo de materiales como las membranas poliméricas selectivas a iones.

Las cerámicas verdes o *Low Temperature Co-fired Ceramics* (LTCC) son un material alternativo que presenta ventajas muy interesantes para la construcción de microanalizadores. Algunas de las más importantes son la rapidez y facilidad de diseño, junto con la posibilidad de construir dispositivos con estructuras tridimensionales.

La tecnología LTCC fue desarrollada originalmente por Hughes y Dupont con finalidades militares (Dupont, 2009). 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 conductoras serigrafiables y el sustrato cerámico de manera totalmente compatible.

La demanda de dispositivos electrónicos de tamaño cada vez más pequeños y multifuncionales (agendas electrónicas, teléfonos móviles, etc.) ha hecho patente la necesidad de obtener circuitos multicapa a costes y tiempos de producción reducidos (Góngora-Rubio et al., 2001).

Algunas de las ventajas más importantes por las cuales la tecnología LTCC resulta adecuada para llevar a cabo la integración y miniaturización de tanto elementos electrónicos como fluidicos son: la fabricación de dispositivos multicapa, simplicidad de micromecanizado en “estado verde”, aplicable a métodos de producción en masa, facilidad de integración de circuitos microelectrónicos, posibilidad de modificación de las propiedades físico-químicas de la propia cerámica en función de las necesidades del usuario, dispositivos robustos y técnicas de fabricación simples y baratas.

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. En general, los valores de encogimiento son bastante predecibles, de manera que se pueden compensar en el diseño inicial de los motivos a construir.

Otra característica importante a tener en cuenta, sobre todo para determinadas aplicaciones, 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. Sin embargo, si se piensa en el uso de material biológico, enzimas por ejemplo, para realizar análisis resultará vital tener en cuenta que, debido a la cierta rugosidad se podrían producir adsorciones en la superficie de los canales. En estos casos para evitar problemas de contaminación, entre muestras, pueden alternarse etapas intermedias de limpieza.

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. Este proceso es llevado a cabo mediante la aplicación

de calor. Las temperaturas empleadas en el proceso de sinterización dependen del material y cada fabricante especifica sus propias condiciones.

Aunque la principal aplicación de la tecnología LTCC es el campo de la microelectrónica, existen otras muy interesantes debido a la facilidad de construcción de sistemas tridimensionales: sensores de flujo de masa (Schmid, 2002), sensores de gases (Tetrycz et al., 1998), sensores de presión (Wilde et al., 2003), pantallas de plasma (Park et al., 2000), microbombas (Bau et al., 2003), etc.

Existen otros dispositivos construidos con la tecnología LTCC, como la integración de electrodos selectivos de iones ESIs sobre membranas poliméricas para la determinación de ión amonio/nitrato (Ibáñez-García et al., 2006) y para la determinación de cloruros en aguas potables (Ibáñez-García et al., 2006).

1.3 Características del flujo en microsistemas

Debido a las reducidas dimensiones de los microcanales en sistemas miniaturizados, se obtiene que el régimen del flujo es totalmente laminar y que no existe ninguna turbulencia. Se considera por tanto que el mecanismo de mezcla se produce por el fenómeno de difusión, impulsado por el gradiente de concentraciones de un sistema heterogéneo, como son las interfases entre la porción de un volumen de muestra inyectada en un microcanal por el cual circula un reactivo como transportador.

A partir de esta premisa, en la bibliografía se pueden encontrar diseños de elementos pensados con el objetivo de conseguir a escala micro un grado de mezcla adecuado. Bessoth et al. en la publicación de 1999 propuso un mezclador basado en la división de flujos para disminuir el tiempo de mezcla, otro mezclador ha consistido en introducir de manera opuesta dos fluidos (Ehrfeld et al., 1999), otro consiste en la introducción de fluidos de manera tangencial en una cámara circular induciendo a la formación de un remolino (Böhm et al., 2001). Otros tipos de diseño se han basado en la mezcla mediante la convección caótica. Un ejemplo es el microcanal de tres dimensiones en forma de serpentin (Liu et al., 2000).

En los métodos espectrofotométrico basados en la detección del producto formado por reacción de la muestra con un reactivo, como es el caso de este proyecto, se hace sumamente importante conseguir un grado de mezcla adecuado que favorezca la reacción. Para conseguir este objetivo, se han fabricado dispositivos constituidos por canales lineales que cambian de dirección a través de codos consecutivos. La presencia de un codo provoca la generación puntos de mezcla caótica que se traduce en un aumento de mezcla entre las soluciones (Baeza, 2009). Estos estudios realizados sobre un microsistema de silicio demostraron que el comportamiento podía ajustarse a un modelo basado en la combinación

de un reactor continuo de tanque agitado (RCTA) y un reactor de flujo pistón (RPF), en ausencia de dispersión.

1.4 Ventajas e inconvenientes de los dispositivos microfluídicos

Originalmente se pensó que el beneficio más significativo de los dispositivos microfluídicos sería la mejora analítica asociada con la reducción gradual del tamaño, pero se revelaron otras ventajas significativas, incluyendo la reducción del consumo de reactivos, una mayor automatización, y costes de fabricación reducidos (Erickson et al., 2004). Esto provoca que la generación de residuos se vea directamente reducida. Adicionalmente, la miniaturización de sistemas conduce a la generación de equipos portátiles debido a su reducido tamaño.

Sin embargo, la disminución del área de detección y de la reducción de volumen de reactivos y muestra, hace necesario que se requieran sistemas con una alta sensibilidad. En el caso que nos ocupa, en que el sistema de detección está basado en un método espectrofotométrico, la aparición de burbujas en el interior de la celda de detección da lugar a lecturas anómalas. Otro de los inconvenientes importantes está asociado a la necesidad de lograr un grado de mezcla suficiente en los sistemas analíticos donde intervienen reacciones químicas.

En la bibliografía se pueden encontrar otras desventajas de microsistemas construidos relacionados con la adsorción/desorción del analito o del reactivo en las superficies, o también en la compatibilidad de los materiales cuando se trabaja con células vivas.

1.5 Determinación de ión nitrito

Este proyecto se ha basado en la determinación de ión nitrito, ya que éste se trata de un parámetro importante desde el punto de vista medioambiental. La determinación de nitrógeno en forma de ión nitrito es una cuestión de gran significación en aguas tratadas en estación depuradora de aguas residuales, ya que niveles altos de éste pueden traducirse como un funcionamiento anormal de una estación depuradora o como focos de contaminación originados por vertidos a un río (WPFCA, 1983).

El uso de sistemas automatizados de análisis posibilita la monitorización de parámetros de interés ambiental, tales como el nitrógeno en forma de nitrito, ya sea en medios naturales como en el control de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs).

El nitrógeno presente en las aguas residuales urbanas, se encuentra básicamente en forma orgánica o amoniacal. El nitrógeno orgánico puede ser eliminado por parte de los

microorganismos presentes de forma natural. En cambio, el nitrógeno amoniacal puede persistir durante tiempo.

Habitualmente la concentración de nitrógeno en forma de ión nitrito en aguas superficiales y subterráneas suele ser menor a 0,1 mg/L. En efluentes de aguas residuales tratadas en plantas depuradoras tampoco acostumbra a ser superior a 1 mg/L. Es por ello que para la determinación del ión nitrito se requieren métodos analíticos con una gran sensibilidad. Los métodos espectrofotométricos son capaces de detectar niveles tan bajos. Sin embargo, últimamente la cromatografía iónica ha sido utilizada como técnica instrumental estándar.

A pesar de que la cromatografía iónica proporciona una alta sensibilidad y permite la determinación de varios iones a la vez de una misma muestra, también supone un elevado coste, ha de ser aplicada en laboratorio y se requiere personal cualificado. Estas circunstancias complican bastante la monitorización de ión nitrito (Bermejo et al., 1991). En cambio, el método espectrofotométrico tiene un coste inferior y ofrece unas prestaciones óptimas en determinaciones de concentraciones bajas (Sawyer et al., 1991).

En los experimentos realizados en este proyecto, el procedimiento analítico utilizado se fundamenta en el método colorimétrico basado en una modificación de la reacción de Griess-Ilosvay. Para llevar a cabo esta reacción se utilizan dos reactivos orgánicos: sulfanilamida y diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (NED). Dicha reacción se muestra en la figura 1.2:

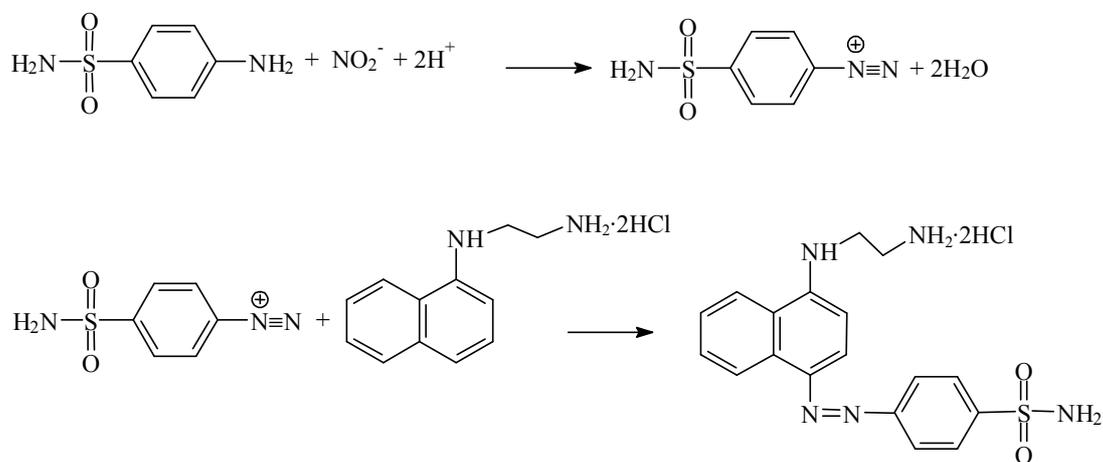


Fig. 1.2 Reacción de Griess-Ilosvay.

El ión nitrito en medio ácido se encuentra en la forma de ácido nitroso. Éste es capaz de reaccionar con un grupo amina de la sulfanilamida para formar un compuesto de diazonio. En el siguiente paso, por acomplamiento de la sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina se forma un colorante azoico de color fucsia que absorbe a 525 nm y puede ser medido por métodos espectrofotométricos.

En el procedimiento seguido en la realización de la etapa experimental de este proyecto se ha utilizado un reactivo mixto preparado con sulfanilamida y diclorhidrato de NED disueltos en medio ácido (APHA-AWWA-WPCF, 1991) con el fin de facilitar la operación y reducir la generación de residuos.

2 Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es el diseño, desarrollo y aplicación de un analizador miniaturizado para la monitorización de ión nitrito en procesos de interés medioambiental. El analizador desarrollado se basará en la formación de un producto coloreado que será determinado espectrofotométricamente. El micro dispositivo desarrollado integrará las etapas de reacción y detección. Este objetivo global se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación de la respuesta de micro dispositivos con detección óptica contruidos con distintos materiales
- Estudio y utilización de la técnica de micro fabricación basada en la tecnología LTCC para la construcción del dispositivo
- Mejora en el diseño y construcción de micro analizadores que integran detección óptica con la tecnología LTCC.
- Optimación de las condiciones de operación del sistema mediante la Metodología de Respuesta de Superficie (MSR) y la optimización punto a punto.

- Evaluación de las características de respuesta del dispositivo construido para determinar el rango de aplicación, repetitividad y sensibilidad del micro analizador.
- Finalmente, aplicación y validación del analizador dispositivo en el análisis de muestras reales procedentes de una EDAR piloto.

3 Materiales y métodos

3.1 Materiales y reactivos

Para la realización de los experimentos realizados en este proyecto se ha utilizado la instrumentación que se detalla en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Lista de los equipos utilizados en los experimentos.

Equipo	Fabricante
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)
Microbureta XP3000 Modular Digital Pump Cavro	Tecan (Zurich, Suiza)
Válvulas de 3 vías 161T031	NRResearch (NJ, USA)
Espectrofotómetro Pharmacia LKB	Novaspec II (Québec, Canadá)
LED emisor RL5-G8045 ($\lambda=525$ nm) (I=8000 mcd)	Super Bright LEDs (Missouri, USA)
Fotodiodo de silicio FDS100	Thorlabs (Munich, Alemania)
Ordenador Pentium IV	-
Placa de adquisición de datos PCL-812PG	-

De igual manera, también se detalla a continuación los reactivos empleados:

Tabla 3.2 Listado de los reactivos empleados en los experimentos.

Reactivo	Fabricante
Nitrito sódico 98%	Panreac
Ácido fosfórico 85%	Panreac
NED 99%	Panreac
Sulfanilamida 98%	Panreac

A partir de estos reactivos se han preparado las disoluciones patrón de ión nitrito y el reactivo de Griess-Ilosvay, en todos ellos siempre empleando agua desionizada MilliQ (18 mΩ/cm):

- Disoluciones patrón de ión nitrito: se han obtenido por dilución sucesiva a partir de una disolución madre de 1000 ppm de ión nitrito. La disolución madre se ha preparado por pesada a partir de la sal de nitrito sódico. La conservación de esta disolución es de una semana en nevera.
- Reactivo de Griess-Ilosvay: para la preparación de un litro se este reactivo se disuelve 10 g de sulfanilamida en agua destilada y se adicionan 100 mL de ácido fosfórico concentrado. Una vez se ha disuelto por completo la sulfanilamida se añade 1 g de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina (NED) y se enrasa el matraz aforado a 1 litro con agua MilliQ. Este reactivo se guarda en una botella de color topacio para protegerlo de la luz y se conserva durante un mes en nevera.
- Colorante: la preparación del colorante se realiza a partir de las disoluciones de ión nitrito de distinta concentración a las que le añade un pequeño volumen del reactivo de Griess-Ilosvay. De esta manera se obtiene un producto azoico coloreado.

3.2 Montaje experimental

3.2.1 Características del dispositivo

La construcción de los dispositivos se ha desarrollado mediante la tecnología LTCC, y para el diseño de estos se tomó como punto de partida un microchip elaborado en silicio con tecnología de circuitos integrados (IC) (Baeza, M., 2004). Las dimensiones finales de los dispositivos fabricados son de 850 μm de ancho por 300 μm de profundidad, un camino óptico de 1400 μm y un volumen de 55 μL.

Inicialmente, en los estudios preliminares, se ha utilizado un dispositivo construido con anterioridad al comienzo de este proyecto. Pero, como ya se verá en el punto 4.2.2, fue necesaria la construcción de nuevos dispositivos para continuar con los estudios realizados. En el capítulo 5 se explica el proceso seguido para el diseño y la fabricación de los nuevos dispositivos.

3.2.2 Descripción del sistema

En la siguiente figura 3.1 se muestra un esquema del montaje experimental utilizado para la realización de los experimentos de este proyecto.

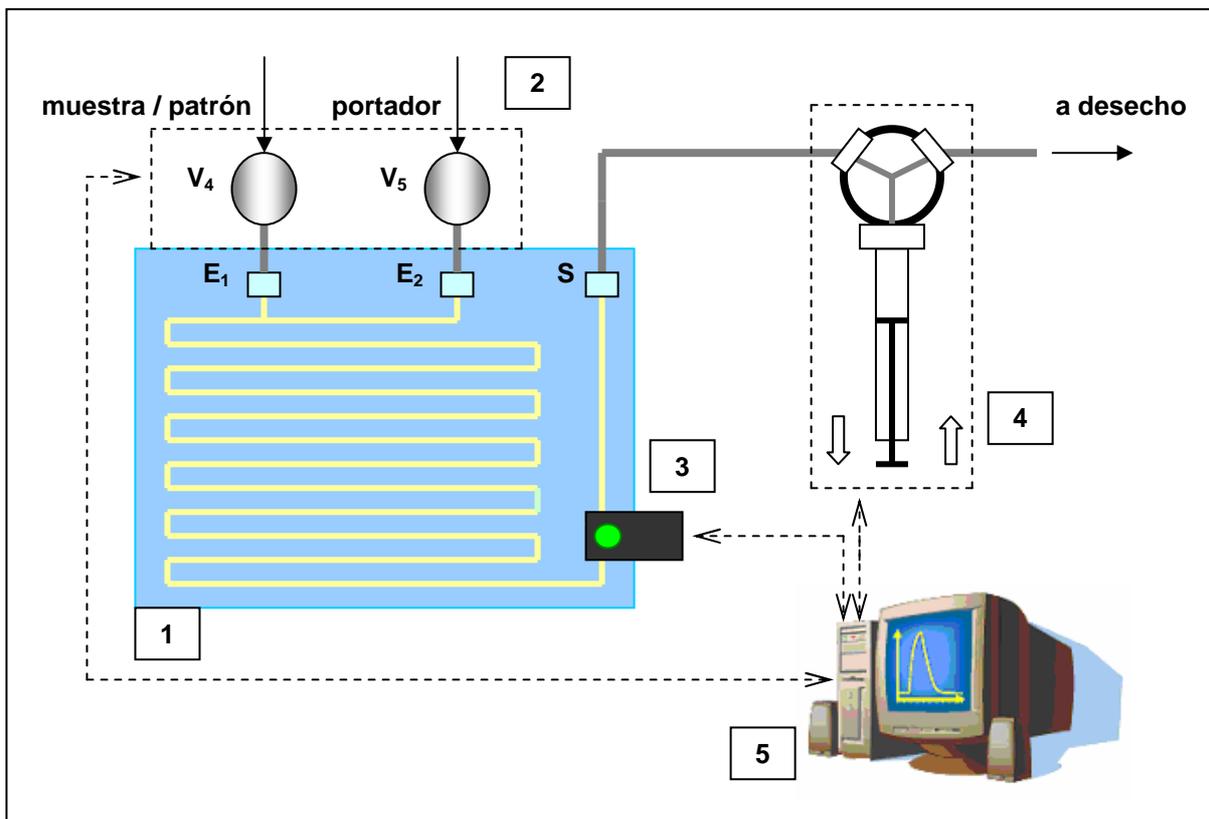


Fig. 3.1 Esquema del montaje experimental: 1: dispositivo LTCC, 2: caja de válvulas, 3: sistema detector, 4: microbureta y 5: PC.

El movimiento del flujo viene dado por el mecanismo de aspiración de la microbureta (4), que se encuentra conectada al canal de salida (S) del dispositivo (1). La microbureta tiene una capacidad de aspiración máxima de su volumen, 250 μL . Con las válvulas de tres vías (2), conectadas a los dos canales de entrada del dispositivo (E_1 y E_2), se selecciona el líquido aspirado (muestra o reactivo). Entonces, el recorrido seguido por el flujo va desde su entrada al dispositivo, atravesando las válvulas de tres vías, siguiendo su paso por los

canales en serpentín del interior del dispositivo, y antes de salir de éste, se encuentra integrada la celda de flujo, dotada de dos cristales que la sellan y que permiten realizar las medidas de absorbancia. Esta señal, una vez transformada en señal eléctrica es interpretada en el ordenador con al ayuda de un software basado en Visual Basic, diseñado específicamente para esta aplicación.

Las líneas discontinuas mostradas en la figura 3.1 representan las comunicaciones realizadas entre el PC con la caja de válvulas (2), el sistema de detección (3) y la microbureta (4). Estas comunicaciones ordenan y coordinan de manera simultánea las acciones ejecutadas por los diferentes elementos. En el caso del sistema de detección, también se recogen y almacenan los datos registrados por el sistema de detección. En la figura 3.2 se muestra una fotografía del montaje experimental utilizado.

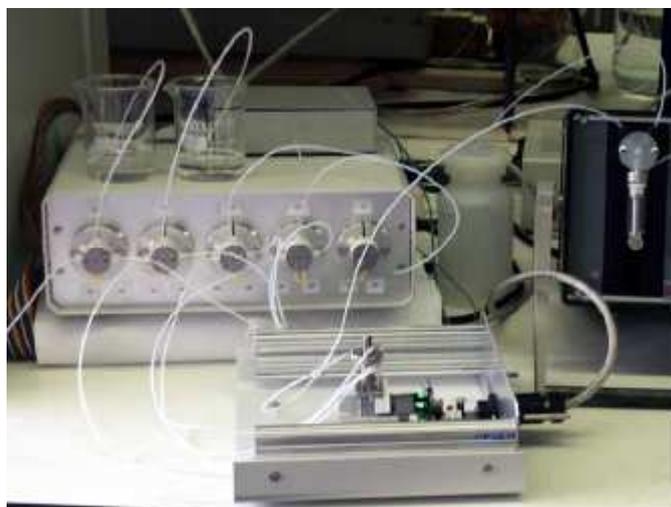


Fig. 3.2 Fotografía del montaje experimental (de izquierda a derecha): válvulas de tres vías, caja del dispositivo y sistema de detección, y microbureta.

3.2.3 El sistema de detección

El sistema de detección está compuesto por un LED emisor y un fotodiodo de silicio, que actúa como detector, construido por el Departamento de Ingeniería Electrónica y Comunicaciones del Instituto de Investigación de Aragón. El LED emite a una longitud de onda de 525 nm, en un ángulo de 45°, con una intensidad de 8000 mcd para una intensidad eléctrica de 20mA. El fotodiodo tiene un área activa de 13 mm².

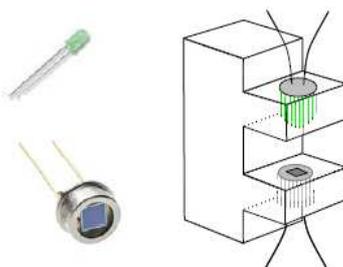


Fig. 3.3 Esquema de la disposición del LED y el fotodiodo del sistema de detección.

El haz de luz procedente del LED actúa de emisor y atraviesa de manera perpendicular la celda de flujo, la luz no absorbida es captada por el fotodiodo. Esta señal, una vez transformada en señal eléctrica es interpretada en el ordenador con la ayuda de un software basado en Visual Basic, diseñado específicamente para esta aplicación.

El ciclo de análisis consiste en cuatro pasos. En el primer paso se aspira solución portadora a través de la válvula V_5 (ver figura 3.1). Cuando este flujo llega a la celda de flujo, se obtiene un voltaje de salida correspondiente a la señal de línea base (V_0). En el segundo paso se produce la aspiración de muestra o patrón a través de la válvula V_4 , dando lugar a una señal analítica transitoria que presenta un valor máximo de voltaje (V). En el tercero se vuelve a producir la aspiración de solución portadora a través de la válvula V_5 , arrastrando el flujo y de esta manera se recupera la línea base. El cuarto y último paso consiste en la evacuación del líquido acumulado en la microbureta a través de la salida de desecho.

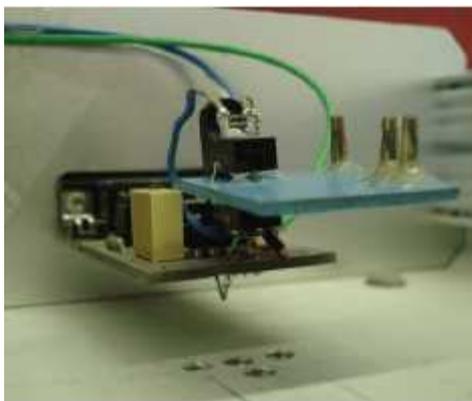


Fig. 3.4 Fotografía del montaje del dispositivo de LTCC y el sistema de detección.

El voltaje de salida del detector se relaciona con la absorbancia de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$A = -\log\left(\frac{V}{V_0}\right) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde A es la absorbancia, V es el voltaje que se obtiene cuando circula por el interior de la celda de detección el producto coloreado de la reacción de Griess-Ilosvay, y V_0 es el voltaje

correspondiente a la línea base, que se obtiene cuando por la celda de detección circula únicamente solución portadora.

3.2.4 Programa de gestión

El software utilizado ha sido realizado en Visual Basic, y permite controlar y gestionar en tiempo real todos los elementos del sistema simultáneamente (microbureta, válvulas de tres vías y detector), además de encargarse de la adquisición de datos.

El programa consta de tres pantallas a través de las cuales se puede acceder a la información, o bien, ordenar operaciones: *sistema*, *monitorización* y *configuración*.

En la pantalla *sistema* se pueden ordenar las operaciones a las válvulas y a la microbureta. También indica el estado y monitoriza, en tiempo real, las operaciones realizadas por los actuadores externos y el ciclo de análisis. En la siguiente figura 3.5 se muestra una vista de esta pantalla:

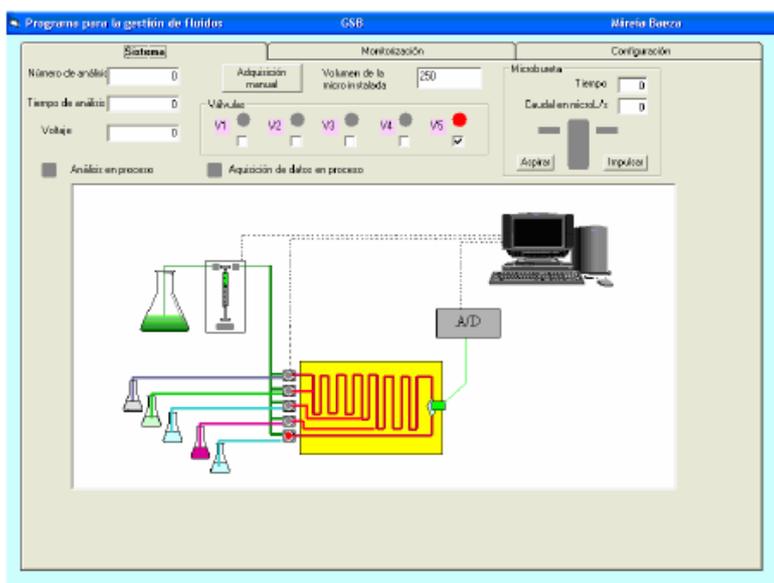


Fig. 3.5 Pantalla *sistema* del programa de gestión utilizado.

En la pantalla *configuración* se seleccionan las secuencias de análisis, que se encuentran almacenadas en una base de datos de Microsoft Office Access, y también se asignan los parámetros de volumen de la microbureta y de caudal de aspiración. Esto hace que no se pueda trabajar con una rampa de caudales dentro de un mismo ciclo de análisis. Existe una limitación a la hora de seleccionar los caudales de trabajo, y es que no todos los caudales son posibles, debido a que sólo unas determinadas velocidades del motor de la microbureta no pueden ser ejecutadas. Este inconveniente supone que en numerosas veces no sea

posible trabajar con volúmenes de inyección iguales para caudales diferentes. En la siguiente figura 3.6 se muestra una vista de la pantalla *configuración*:

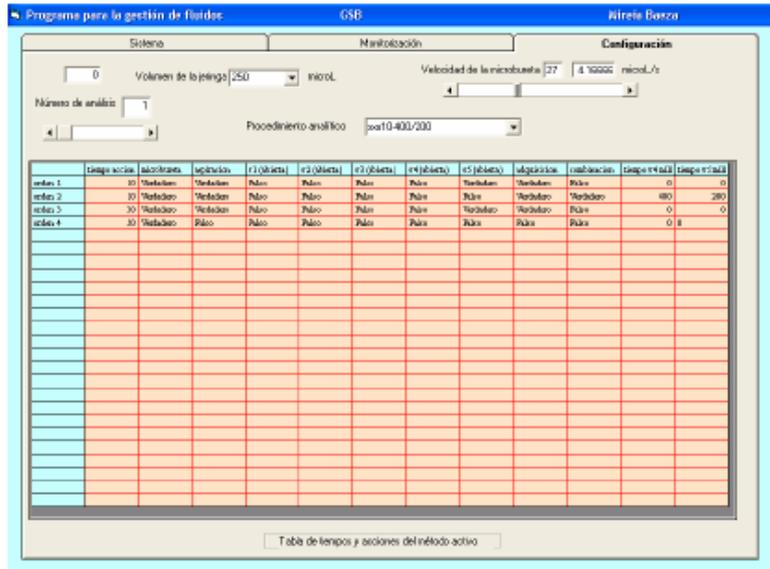


Fig. 3.6 Pantalla *configuración* del programa de gestión utilizado.

También es posible trabajar actuando dos válvulas de manera simultánea conmutándose en espacios de tiempo de milisegundos.

Como ya se ha mencionado antes, las secuencias de análisis se encuentran almacenadas en una base de datos de Microsoft Office Access. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de secuencia. En estas secuencias es posible definir los tiempos de aspiración y de impulsión, las operaciones ejecutadas por las válvulas y las etapas en las que se desea realizar la adquisición de datos.

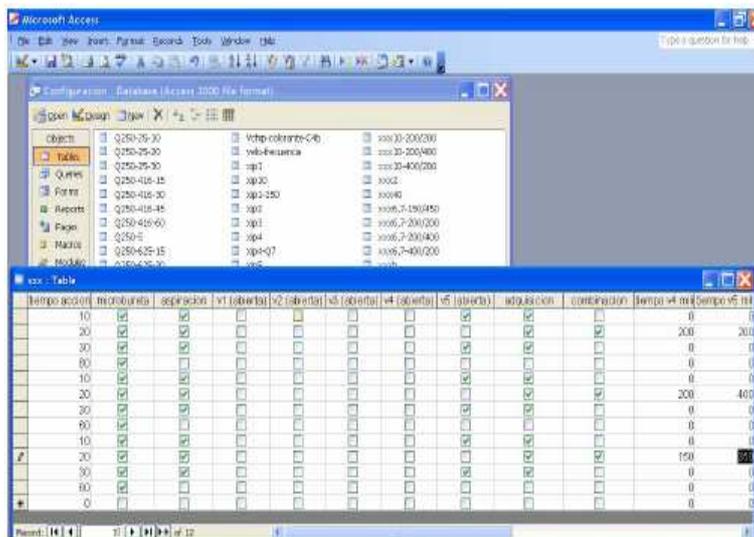


Fig. 3.7 Vista de la pantalla de base de datos donde se definen las secuencias de los ciclos de análisis.

En la pantalla de *monitorización* se muestra el registro durante el ciclo de análisis, donde los datos que aparecen se expresan en voltaje (V) en el eje de ordenadas, frente a tiempo (s) en abscisas. La frecuencia de muestreo es de 10 lecturas por segundo. Desde esta misma pantalla se ejecuta el inicio del análisis, y sólo aparecerá el registro de aquellas etapas del ciclo de análisis que han sido definidas previamente en la secuencia como con adquisición de datos. Cuando concluye el ciclo de análisis, automáticamente el registro de valores (en voltios) es convertido a absorbancia, y se pueden grabar los datos del registro si se desea. El almacenamiento de estos registros también se hace en base de datos de Microsoft Office Access. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de registro de análisis visto en la pantalla monitorización:

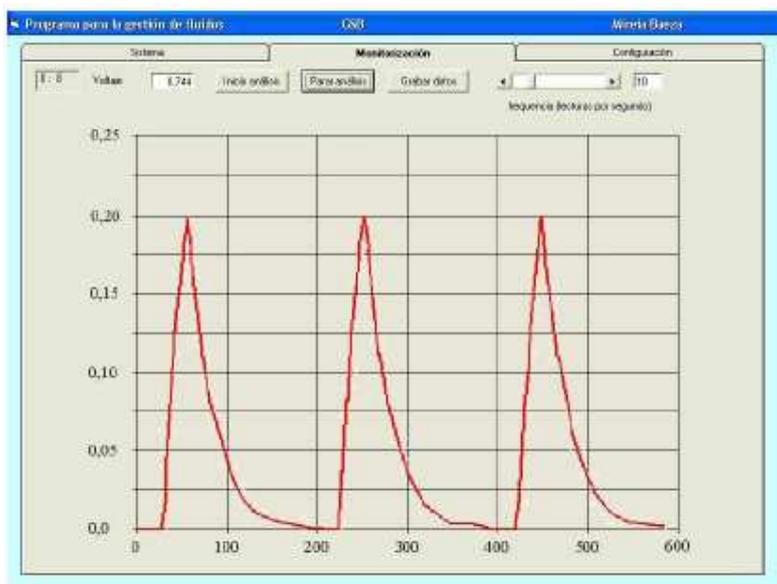


Fig. 3.8 Pantalla *monitorización* del programa de gestión utilizado.

4 Estudios preliminares

Para la realización de los estudios preliminares se han utilizado dos dispositivos construidos anteriormente a la realización de este proyecto. El objetivo de estos estudios ha sido obtener una visión general de algunas de las variables a tener en cuenta en el diseño de los nuevos dispositivos mediante la observación de las diferencias existentes en la respuesta, relacionados con el diseño de la celda, y el comportamiento como mezcladores de los dispositivos, relacionado con la geometría interna del dispositivo.

4.1 Comparación de caminos ópticos sin reacción química

El estudio de comparación de caminos ópticos ha consistido en contrastar la respuesta obtenida de tres medidas diferentes de caminos ópticos utilizando disoluciones de colorante. La ley de Beer-Lambert predice una reducción de la señal proporcional a la reducción del camino óptico:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot L \qquad \text{Ecuación 4.1}$$

donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absortividad molar (L/mol-cm), C es la concentración y L es el camino óptico (cm).

En el estudio realizado se han comparado los caminos ópticos de una cubeta típica de un espectrofotómetro y, de las celdas de detección de un dispositivo de silicio y de un dispositivo de LTCC. En la tabla 4.1 se muestran las medidas de sus caminos ópticos.

Tabla 4.1 Dimensiones de los caminos ópticos de los tres dispositivos utilizados.

Dispositivo	Camino óptico
Cubeta de espectrofómeto	10000 μm
Dispositivo de silicio	200 μm
Dispositivo de LTCC	1800 μm

4.1.1 Condiciones

Para el experimento se han preparado diferentes patrones de colorante azoico de distinta concentración para realizar las medidas en discontinuo sin reacción química en línea, con concentraciones equivalentes de ión nitrito entre 2 y 50 ppm. Para ello se han cogido alícuotas de 20 mL de cada disolución patrón de ión nitrito y se les ha añadido 500 μL de reactivo de Griess-Ilosvay. De esta manera se asegura que la reacción es completa.

En los análisis realizados con el dispositivo de silicio y el de LTCC, las condiciones de operación han sido las mismas, escogiéndose un caudal de 6,25 $\mu\text{L/s}$ y un volumen de inyección de 60 μL . Este volumen de inyección corresponde a un tiempo de aspiración de 9,6 s. Como portador se ha utilizado agua MilliQ. En la tabla 4.2 se resume la secuencia seguida.

Tabla 4.2 Secuencia seguida en el estudio de comparación de caminos ópticos sin reacción química.

SECUENCIA			
Tiempo (s)	Operación	Canal	Adquisición de datos
10	Aspiración de agua	5	No
9,6	Aspiración de producto azoico	4	Sí
20,4	Aspiración de agua	5	Sí
40	Impulsión para vaciado	S	No

4.1.2 Resultados

En la figura 4.1 se muestran los resultados obtenidos en este experimento.

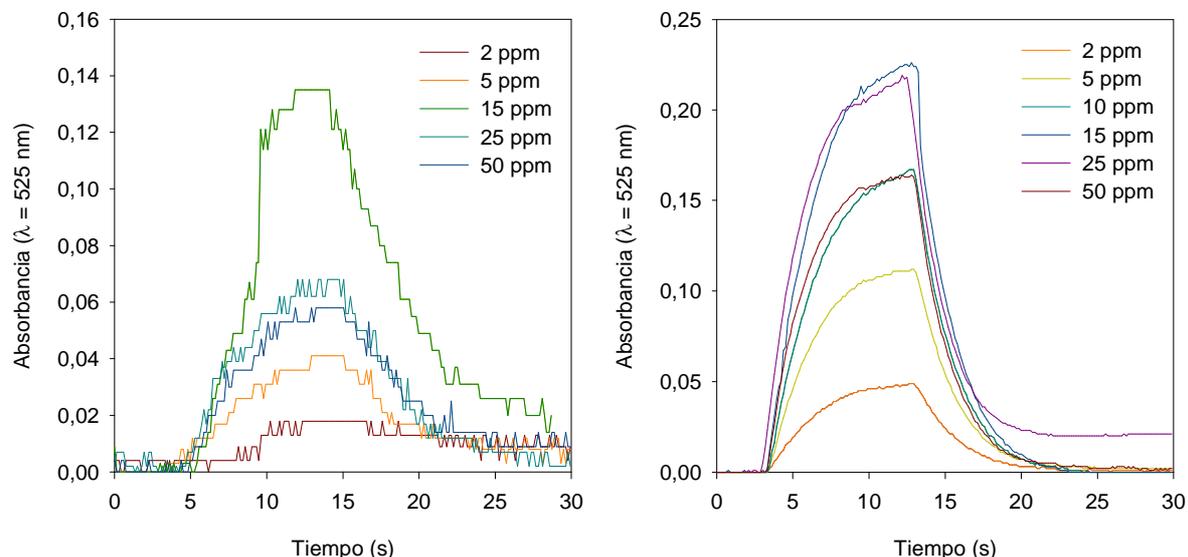


Fig. 4.1 Resultados obtenidos en los análisis de los dispositivos de LTCC (izquierda) y silicio (derecha).

Puede observarse que pese a que el camino óptico del dispositivo LTCC es mayor al de silicio (tabla 4.1), la respuesta ha sido menor. Este resultado hace pensar que debido a la geometría de los canales del dispositivo cerámico en comparación con en el dispositivo de silicio se produce una mayor dispersión del colorante en el microsistema cerámico. Asimismo, los picos obtenidos en el dispositivo de LTCC aparecen distorsionados, percepción que hace reflexionar sobre si pueden haberse originado estos problemas por modificaciones del flujo al pasar por la celda de detección.

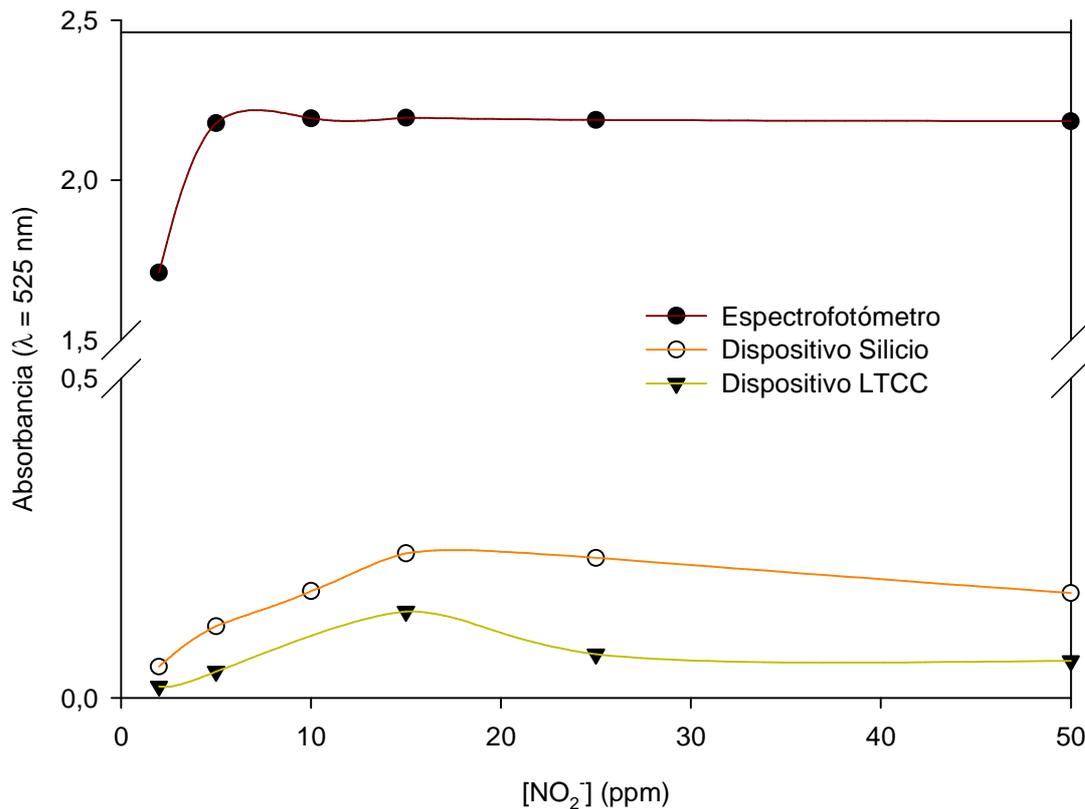


Fig. 4.2 Comparación de las respuestas obtenidas para los tres caminos ópticos estudiados.

En la figura 4.2 se ha representado la respuesta obtenida para los tres experimentos, y se puede apreciar una notable disminución, relacionada directamente con la disminución del camino óptico, entre las señales obtenidas para los dispositivos y para el espectrofotómetro. Paralelamente este descenso de sensibilidad, produce un aumento del intervalo lineal de respuesta. Mientras que para el espectrofotómetro el intervalo lineal es hasta 5 ppm, en los casos de los micro dispositivos la linealidad se encuentra comprendida entre 2 y 15 ppm.

4.2 Comparación de grado de mezcla con reacción química

Siguiendo con los estudios preliminares se ha realizado un experimento para evaluar el grado de mezcla en los dispositivos de LTCC y silicio. Para llevar a cabo este experimento la reacción se ha hecho en línea, es decir, la obtención del producto azoico coloreado ha tenido lugar en el interior de los dispositivos.

4.2.1 Condiciones

Las condiciones de trabajo han sido las mismas para ambos dispositivos. El caudal se ha fijado en 5,83 $\mu\text{L/s}$ y el volumen de inyección en 29 μL . En este caso, se ha empleado como

solución portadora el propio reactivo de Griess-Ilosvay. La secuencia seguida se detalla en la tabla 4.3:

Tabla 4.3 Secuencia seguida en el experimento de evaluación de grado de mezcla.

SECUENCIA			
Tiempo (s)	Operación	Canal	Adquisición de datos
5	Aspiración de reactivo	5	Sí
5	Aspiración de disolución patrón	4	Sí
32	Aspiración de reactivo	5	Sí
42	Impulsión para vaciado	S	No

La concentración se ha mantenido constante, y la disolución patrón empleada ha sido de 10 ppm de ión nitrito. Para cada dispositivo se han hecho análisis con dos estrategias distintas. La diferencia se ha introducido en la etapa 2 de aspiración de disolución patrón de la secuencia mostrada en la tabla 4.3. En un caso se han conmutado las válvulas de los canales 4 y 5 en periodos de tiempo de 200 ms durante los 10 s que dura la aspiración de patrón. En el segundo caso se ha aspirado sólo disolución patrón durante los 5 segundos. Con la primera estrategia se persigue aumentar el grado de mezcla entre reactivo y patrón.

4.2.2 Resultados

A continuación en la figura 4.3 se han representado los resultados obtenidos para ambos dispositivos.

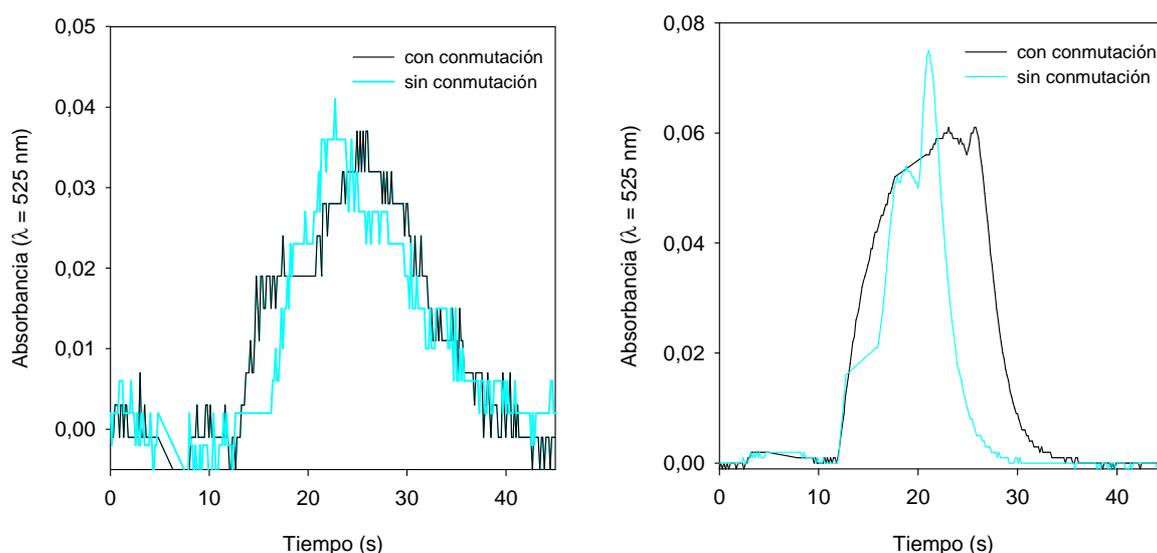


Fig. 4.3 Resultados obtenidos para el dispositivo de LTCC (izquierda) y de silicio (derecha) en el estudio de evaluación de grado de mezcla.

Puede observarse como para el dispositivo de silicio se obtienen diferencias significativas cuando se utiliza conmutación respecto a la no conmutación de las válvulas (Baeza et al., 2006). En el caso sin conmutación se observa una mayor altura de pico, relacionada directamente con una menor dispersión de la disolución patrón en el interior del canal. También se aprecia que se produce un doble pico. Esta respuesta está asociada con un defecto de reactivo el centro del bolo de muestra, mientras que en los extremos se produce más reacción entre el portador y el bolo de muestra, debido a la difusión del reactivo hacia el centro del bolo dando lugar al producto coloreado azo. En consecuencia, se obtienen dos frentes de concentración que se traducen en un doble pico. Sin embargo, puede observarse como la conmutación resuelve esta dificultad.

Siguiendo con el caso del dispositivo de cerámica, se observa como no existen prácticamente diferencias entre hacer o no conmutación de las válvulas, pues las alturas de ambos picos son iguales. Se puede concluir que el grado de mezcla del dispositivo de LTCC se mantiene constante a pesar de aplicar conmutación de las válvulas, por lo cual, se puede concluir que es un buen mezclador mejor que el de silicio.

A pesar de ello, se sigue observando distorsión de los picos en el dispositivo de LTCC, que podrían estar motivados por algún defecto en la celda de detección. Esta distorsión podría llegar a disminuir la sensibilidad, provocando una disminución de la respuesta especialmente a concentraciones bajas. Por esta razón, se decide fabricar nuevos dispositivos LTCC con la misma geometría interna pero con distintas geometrías de celdas de flujo con el objeto de conseguir atenuar la distorsión de la señal.

5 Diseño y construcción del dispositivo

En este capítulo se describe el proceso de fabricación de dispositivos mediante la tecnología LTCC. El procedimiento descrito se trata de una adaptación del protocolo general de fabricación de circuitos electrónicos mediante el uso de cerámicas verdes. Se han diseñado y construido 4 dispositivos cuya respuesta ha sido comparada después.

5.1 Fabricación del dispositivo

Este apartado se ha dividido según las etapas del proceso de fabricación:

- 1) Diseño del dispositivo en CAD (Computer Assisted Design)
- 2) Mecanizado de las capas componentes del dispositivo
- 3) Laminación de las capas por termocompresión
- 4) Sinterización

En la figura 5.1 se muestra un esquema de las etapas antes mencionadas:

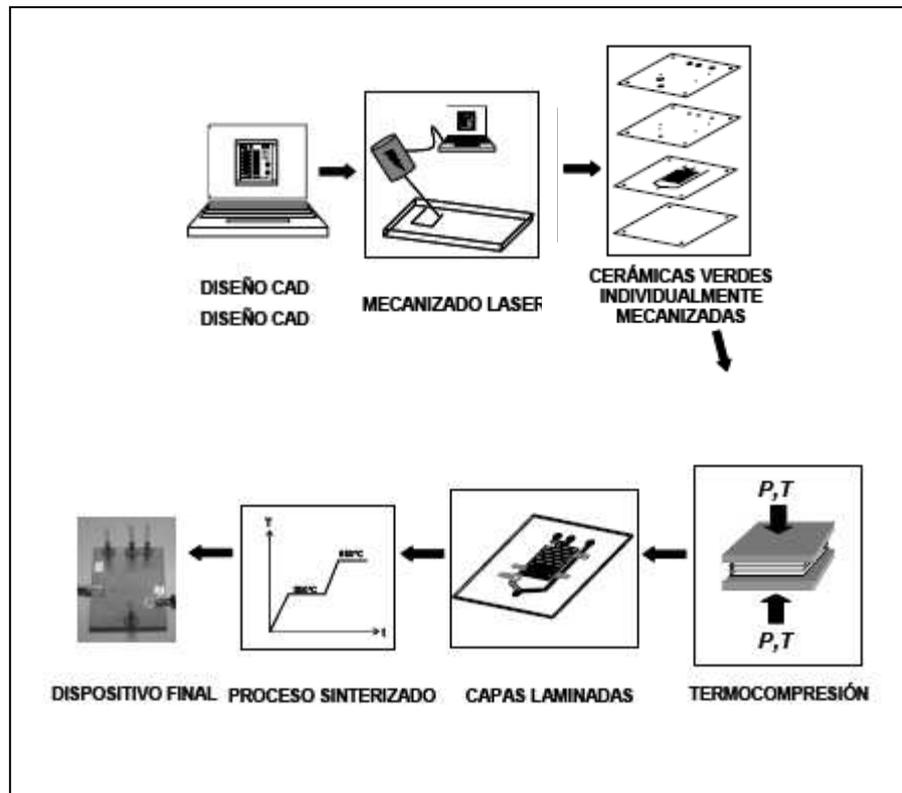


Fig. 5.1 Esquema general de proceso de fabricación de los dispositivos LTCC construidos.

5.1.1 Diseño en CAD del dispositivo

El diseño del dispositivo se basa en la superposición de capas de cerámicas verde. Estas capas, al superponerse en orden tienen como resultado la estructura tridimensional diseñada. El grosor del dispositivo depende del número de capas superpuestas. El área máxima de los dispositivos fabricados viene dada por el área de unos soportes metálicos que se utilizan en la etapa de laminación.

En el caso que nos ocupa, se han fabricado cuatro dispositivos, donde la única diferencia entre ellos es el diseño de la cámara de flujo, siendo idéntico el resto de la geometría interna. Para la fabricación de cada dispositivo ha sido necesario realizar cinco diseños de capa distintos para definir el dispositivo final.

A continuación, en la figura 5.2, se muestra el diseño de las diferentes capas. Se muestran de (a) a (e) los cinco diseños de capas. El orden de posición va de (a) a (e). La figura (f) es una representación de la superposición de las capas.

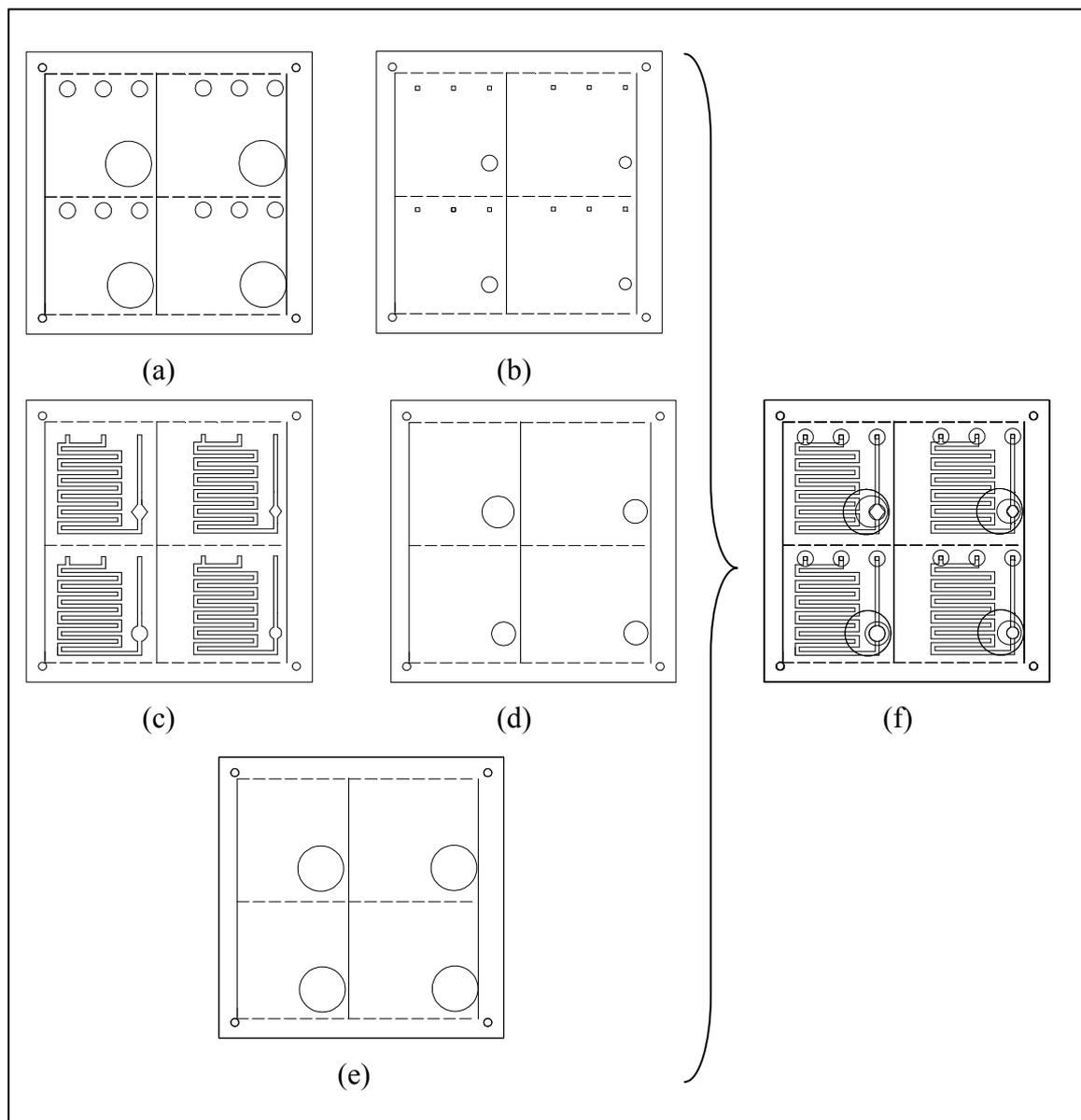


Fig. 5.2 Diseño en CAD de las diferentes capas de los dispositivos fabricados.

Aunque son 5 los diseños de las capas, cada dispositivo está formado por 9 de éstas, ya que existen capas repetidas, para crear volumen en los canales, y para poder integrar los flanges de conexión y los cristales para las celdas de detección.

Tabla 5.1 Número de capas de cada diseño utilizadas en la fabricación de los dispositivos.

Diseño de capa	Cantidad
(a)	2
(b)	2
(c)	3
(d)	1
(e)	1

En los diseños (figura 5.2) se puede apreciar como cada capa se encuentra dividida en cuatro partes. Cada una de estas partes pertenece a un dispositivo. Si se observa la capa (c), que pertenece al diseño de los canales internos y donde también se integra la cámara de flujo, puede verse como el tamaño y geometría de estas cámaras son diferentes para cada una de las cuatro de los diseños. La capa (a) es donde se integran los flanges de entrada y salida, y también un cristal para cerrar la cámara de flujo. En el lado opuesto se encontraría la capa (e) a la que también se le coloca un cristal para cerrar la cámara de flujo por el otro lado. La capa (b) presenta unos pequeñísimos orificios que coinciden con los orificios de los canales de entrada y salida. La capa (d) es anterior a la (e).

5.1.2 Mecanizado de las capas

El mecanizado de las capas consiste en obtener las capas diseñadas, en cerámica verde. Para ello se utiliza un equipo láser (Protolaser®). En el anexo II se describe el protocolo de utilización del equipo láser. El haz de láser corta con una gran precisión cada superficie de cerámica verde. De esta manera se pueden realizar estructuras muy pequeñas.

En la figura 5.3 se muestran algunas de las capas mecanizadas para la construcción de los nuevos dispositivos:

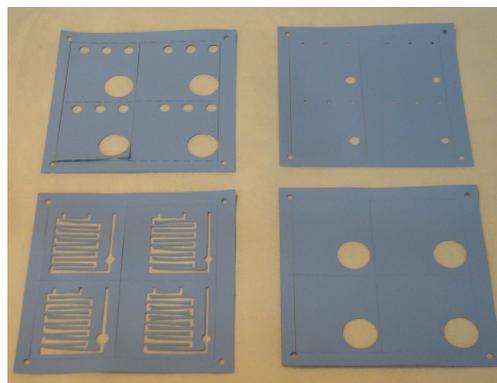


Fig. 5.3 Muestra de capas (a, b, c, d) de cerámica mecanizadas en la fabricación de los dispositivos.

5.1.3 Laminación

En el diseño de las capas ya se previenen cuatro pequeños orificios dispuestos en cada ángulo por donde se pasan los cuatro fiadores del soporte metálico utilizado en la etapa de laminación. En la figura 5.4 se muestra una imagen donde puede observarse un grupo de capas laminadas colocadas en el soporte metálico.



Fig. 5.4 Soporte metálico con un grupo de capas de LTCC laminadas

Entre las capas de cerámica verde, alineadas adecuadamente, y los soportes metálicos se coloca una lámina de plástico (Milar®) para evitar que las capas puedan quedar pegadas al soporte.

Una vez hecho esto, ya se puede seguir con el proceso de termocompresión. Para ello, se utiliza una prensa hidráulica (Talleres Francisco Camps S.A., Granollers, España) dispuesta con dos platos calentadores de acero de 250 x 150 mm. En la figura 5.5 se muestra un pequeño esquema del proceso:

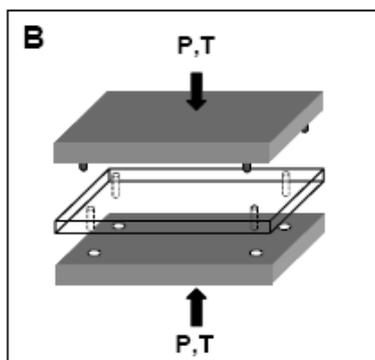


Fig. 5.5 Esquema del proceso de termocompresión.

El proceso se realiza aplicando series de 10 segundos a una presión de unos 2000 psi y con una temperatura de platos de unos 100°C. Si se aplican presiones superiores, se corre el riesgo de que las cavidades internas del dispositivo (canales y celda de flujo) puedan quedar deformadas de manera irreversible. Una temperatura más elevada también puede provocar deformaciones. Aunque no existe un número de series determinado, se conoce que se ha llegado al punto óptimo de laminación cuando se observan los canales marcados en la superficie de la cerámica. En la figura 5.6 puede observarse el resultado de este proceso en las capas de cerámica verde diseñadas.

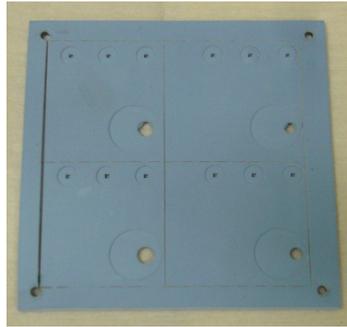


Fig. 5.6 Capas cerámicas después del proceso de termocompresión.

5.1.4 Sinterización

La etapa de sinterización consiste en la aplicación de calor a las cerámicas ya laminadas, para la obtención de los dispositivos con la apariencia final. En este proceso se utiliza un horno “Carbolite CBCWF11/23P16” (Afora, España) que trabaja en atmósfera de aire. La aplicación de calor se hace de acuerdo a las indicaciones del fabricante de las cerámicas verdes, y durante este proceso la temperatura no se mantiene constante, si no que se administra de manera controlada mediante una rampa de temperaturas que tiene una duración de 5 horas. En la figura 5.7 se muestra un esquema de la rampa de temperaturas utilizada:

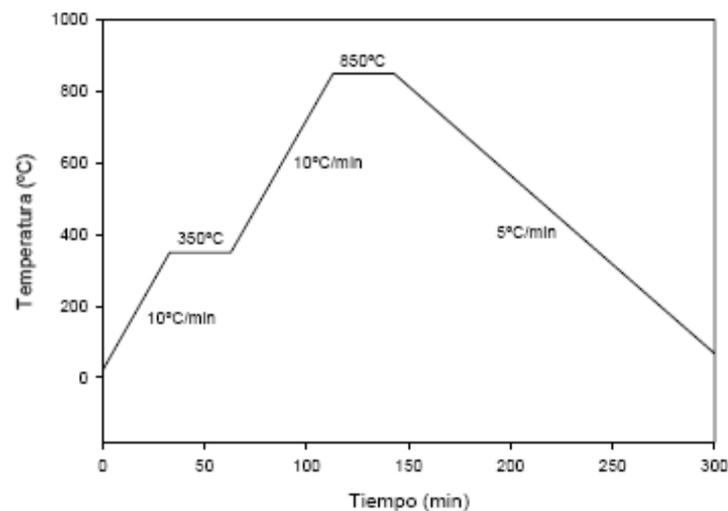


Fig. 5.7 Esquema del perfil de temperaturas aplicado durante el proceso de sinterización.

El motivo de la aplicación de un perfil de temperaturas es debido a que las cerámicas verdes están constituidas por varios materiales, los cuales sufren transformaciones a temperaturas diferentes. Entre 200 y 400°C se volatilizan por completo los componentes

orgánicos. Entre 600 y 900°C se produce la interpenetración de alúmina entre capas. El enfriamiento también se realiza de manera controlada en escalones de 5°C/min.

En la figura 5.8 se muestra el análisis termogravimétrico realizado a una capa de cerámica verde. De este análisis se desprende que a las temperaturas de 231,8°C y 388,4°C se produce la pérdida de la mayor parte de los disolventes orgánicos. Posteriormente se estabiliza el peso de la cerámica.

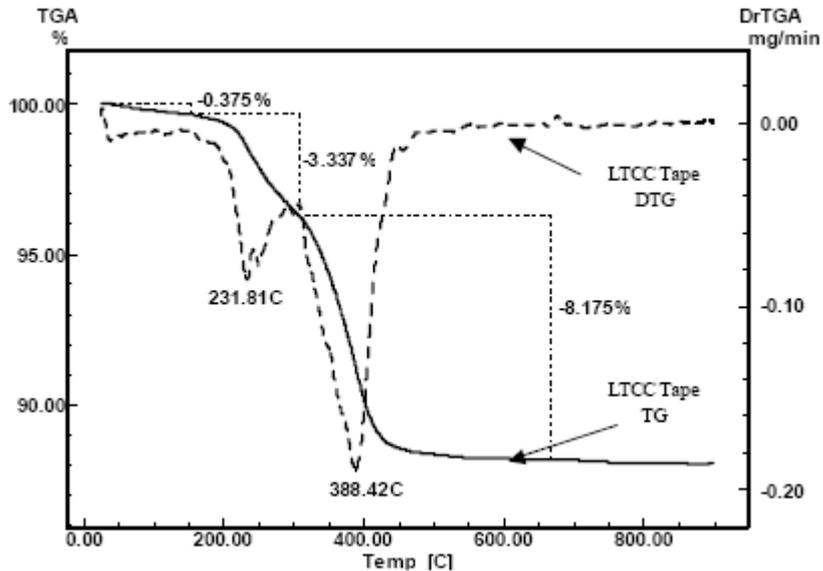


Fig. 5.8 Análisis termogravimétrico de una capa de cerámica verde.

El efecto de la pérdida de materiales durante el proceso de sinterización se traduce en una notable reducción del tamaño de la cerámica. En la figura 5.9 se muestra una imagen donde aparecen algunas piezas de cerámica construidas. La diferencia entre las piezas de la izquierda respecto a las de la parte derecha es que todavía no han recibido el tratamiento de sinterización. Puede observarse como las cerámicas de la derecha presentan un tamaño más reducido después de ser sometidas al proceso de sinterizado.



Fig. 5.9 Imagen de piezas de cerámica antes y después del proceso de sinterizado.

Las capas de cerámica verde utilizadas en la fabricación de los dispositivos han sido suministradas por Dupont (ref.: 951AX). A continuación, en la tabla 5.2 se muestran algunas de las características principales de este material.

Tabla 5.2 Algunas de las características principales de las cerámicas verdes utilizadas (Dupont, 2003).

Características de las cerámicas verdes Dupont 951AX	
Espesor:	$254 \pm 13 \mu\text{m}$
Contracción en el eje X-Y:	$12,7 \pm 0,3\%$
Contracción en el eje Z:	$15 \pm 0,5\%$
Rugosidad superficial:	$< 0,34 \mu\text{m}$

Para que nos podamos hacer una idea del tamaño final de los dispositivos en la figura 5.10 se muestra un dispositivo al que ya se le ha sometido a todos los procesos explicados anteriormente.

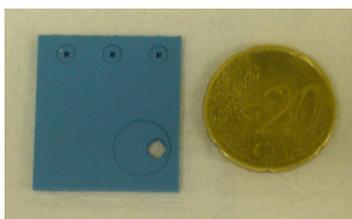


Fig. 5.10 Apariencia final de una cerámica después de haber sido sometida a los procesos de fabricación.

En esta imagen puede observarse como el tamaño de un dispositivo es comparable al de una moneda.

5.2 Comparación de celdas de flujo

En este estudio se ha evaluado la respuesta obtenida por los cuatro dispositivos construidos. Cabe recordar que los cuatro diseños son idénticos, y que únicamente difieren entre sí en la geometría y tamaño de la celda de flujo. Por lo cual, la longitud del camino óptico es la misma para todos ellos, siendo éste de $1400 \mu\text{m}$. De esta manera, las geometrías diseñadas han sido dos, círculo y rombo; y, los tamaños, dos también, siendo comparables los tamaños de rombo y círculo para ambos tamaño grande y pequeño. Esta diferencia puede observarse en la figura 5.11, donde aparecen los cuatro dispositivos cerámicos fabricados.

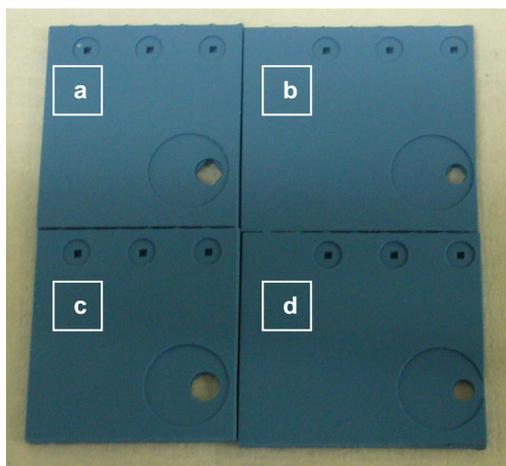


Fig. 5.11 Fotografía de los cuatro dispositivos evaluados en el estudio de comparación de celdas: a) *rombo grande*, b) *rombo pequeño*, c) *círculo grande* y d) *círculo pequeño*.

5.2.1 Condiciones

Durante los análisis realizados en este estudio, se han mantenido todos los parámetros constantes (caudal, volumen de inyección y concentración). El grado de conversión de la reacción también se ha mantenido constante, y para ello se ha empleado en todas las determinaciones una disolución de colorante azoico obtenida previamente. Esta disolución se ha preparado a partir de una alícuota de 20 mL de una disolución de 100 ppm de ión nitrito, a la que se ha añadido 10 mL del reactivo de Griess-Ilosvay y luego se ha enrasado a 100 mL con agua MilliQ. La disolución resultante equivale a 20 ppm de ión nitrito.

Las condiciones de trabajo se han establecido para un caudal de 4,16 $\mu\text{L/s}$ y un tiempo de aspiración de colorante de 2 s, que equivalen a un volumen de inyección de 8,3 μL . Como solución portadora se ha utilizado agua desionizada MilliQ. En la tabla 5.3 se muestra la secuencia utilizada.

Tabla 5.3 Secuencia seguida en el estudio de comparación de celdas.

SECUENCIA			
Tiempo (s)	Operación	Canal	Adquisición de datos
10	Aspiración de agua	5	No
2	Aspiración de colorante azoico	4	Sí
45	Aspiración de agua	5	Sí
57	Impulsión para vaciado	S	No

5.2.2 Resultados

En la figura 5.12 se han representado los resultados obtenidos para los cuatro dispositivos cerámicos fabricados.

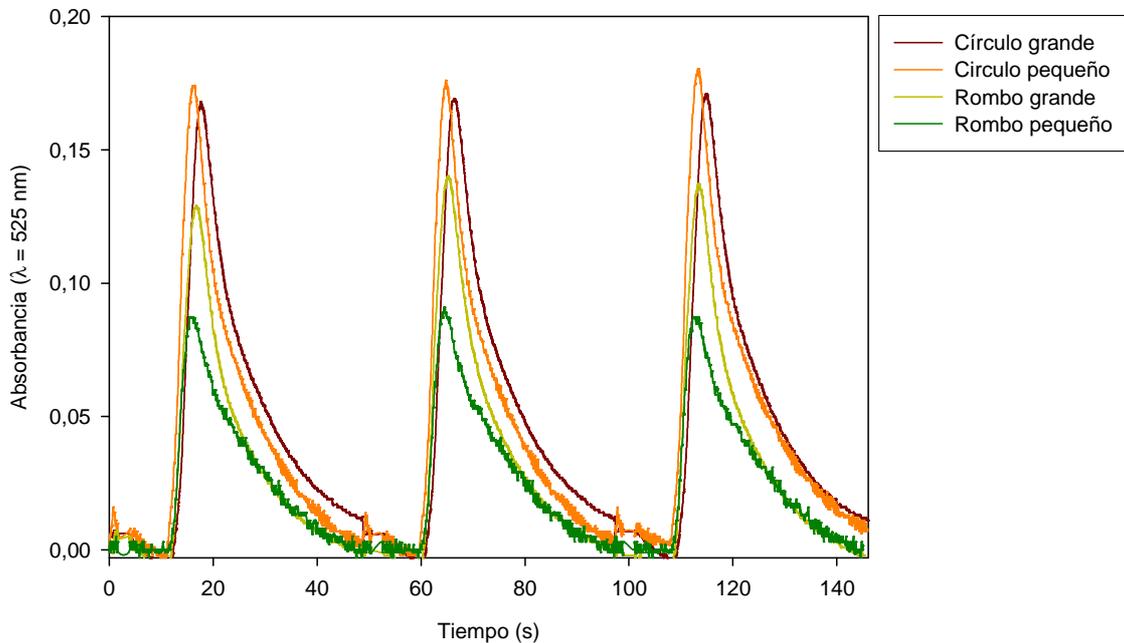


Fig. 5.12 Resultado obtenidos en el estudio de comparación de celdas.

De los resultados mostrados se desprende que las respuestas obtenidas para las dos geometrías en rombo han sido inferiores respecto a los círculos. Por el tipo de respuesta obtenida, se piensa que la geometría en rombo aumenta la dispersión porque la celda de flujo actúa como una cámara de mezcla. Esto evidencia una disminución de la altura de pico y una más rápida recuperación de la línea base.

En cambio, en las geometrías en círculo las respuestas obtenidas han sido muy iguales. Incluso para el caso del *círculo pequeño* la absorbancia ha sido ligeramente mayor. La respuesta del *círculo grande* presenta una mayor dispersión respecto al *pequeño*, probablemente debido a un volumen mayor de cámara de detección y un mayor tiempo de residencia dentro de la celda de flujo.

Vistas estas observaciones, pese a que se considera mejor la respuesta obtenida para la celda *círculo pequeño*, por obtenerse una mayor absorbancia y una mejor recuperación de la línea base, se descarta este dispositivo para la realización de los estudios posteriores, pues existe una gran dificultad a la hora de realizar el alineamiento de la celda del dispositivo con el sistema de detección, cosa que complica bastante el trabajo. Por lo cual, para proseguir con el proyecto, se estima mejor la elección del dispositivo *círculo grande*, por presentar una respuesta de absorbancia aceptable, y también por ser más manejable la operación de alineamiento con el sistema de detección.

6 Optimización

En este capítulo se describen los experimentos realizados con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de trabajo del analizador que permitan un grado de reacción óptimo y una mayor señal analítica. En primer lugar se ha hecho un estudio preliminar para definir las condiciones límite de operación del microsistema y poder concretar los valores extremos para la definición posterior de un diseño de experimentos. Finalmente, se ha realizado una comparación más acotada en cuanto a condiciones de operación. Todos estos estudios, y de aquí en adelante, se ha hecho utilizando el dispositivo con círculo grande, seleccionado en el capítulo anterior.

6.1 Características microfluídicas

Con el objetivo de obtener una descripción de las características microfluídicas del microsistema, se realiza un estudio para conocer como influyen los parámetros de caudal y volumen de inyección.

Para ello, se han realizado dos experimentos que consiste en obtener la respuesta del sistema a diferentes volúmenes de inyección manteniendo el caudal y la concentración constantes.

El primero ha consistido en un estudio previo donde se ha tenido en cuenta un rango más amplio de volúmenes de inyección. En el segundo experimento, este rango se ha reducido en función de los primeros resultados.

6.1.1 Estudio previo

6.1.1.1 Condiciones

En este caso se ha utilizado una disolución patrón de 10 ppm de ión nitrito y un caudal de 5,83 $\mu\text{L/s}$. La selección del volumen de inyección se obtiene por variación del tiempo de obertura de la válvula que deja pasar la disolución patrón. En la tabla 6.1 se muestra la secuencia general utilizada para este experimento.

Tabla 6.1 Secuencia general seguida en el experimento previo de determinación de características microfluídicas.

SECUENCIA			
Tiempo (s)	Operación	Canal	Adquisición de datos
5	Aspiración de reactivo	5	Sí
t_i	Aspiración de patrón (10 ppm)	4	Sí
37 - t_i	Aspiración de reactivo	5	Sí
42	Impulsión para vaciado	S	No

Según muestra la tabla 6.1, la duración del ciclo de análisis es de 42 s, o 84 s si se suma el tiempo necesario para el vaciado de la jeringa. Se comienza con la aspiración de 5 s de reactivo para la estabilización de la línea base. A continuación, se aspira disolución patrón de 10 ppm durante un tiempo igual a t_i , el cual dependerá del volumen de inyección; y, posteriormente se aspira de nuevo reactivo hasta llegar a los 42 s. En la siguiente tabla se resumen los diferentes tiempos utilizados para t_i y su conversión a volumen de inyección (v_i):

Tabla 6.2 Tiempos de inyección utilizados asociados a los volúmenes de inyección.

t_i (s)	1	2	3	4	5	6	7
v_i (μL)	5,8	11,7	17,5	23,3	29,2	35,0	40,8

6.1.1.2 Resultados

A continuación en la figura 6.1 se muestran los resultados obtenidos para este experimento. Se observa como la altura y la amplitud de los picos aumenta conforme se incrementa el

volumen de inyección. Además, a partir de 23,3 μL se puede apreciar como empiezan a aparecer picos dobles. Esto se debe a un defecto de reactivo en la parte central al haber un mayor volumen de disolución patrón.

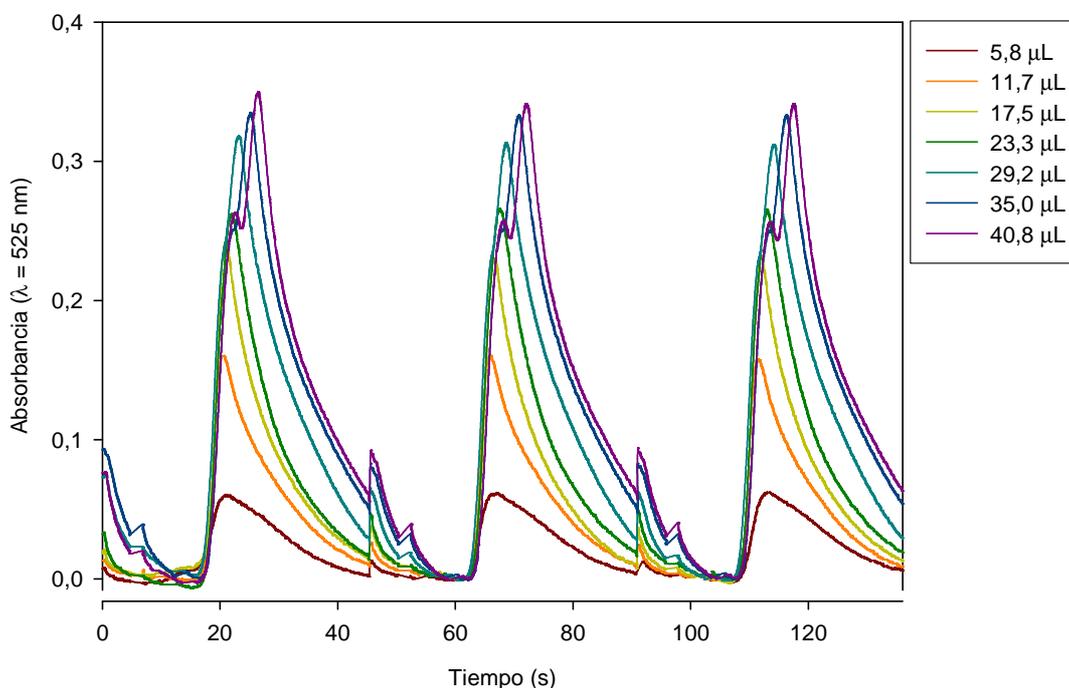


Fig. 6.1 Resultados obtenidos para el caudal de 5,83 $\mu\text{L/s}$ y diferentes volúmenes de inyección.

6.1.2 Evaluación de las características microfluídicas del microsistema

Para proseguir con este estudio, se realizan más experimentos a tres caudales diferentes, pero esta vez se establece omitir volúmenes de inyección altos para evitar la aparición de picos dobles no deseados.

6.1.2.1 Condiciones

En la tabla 6.3 se muestran los volúmenes de inyección empleados para los tres caudales estudiados.

Tabla 6.3 Resumen de las condiciones para realizar el estudio de caracterización.

Caudal ($\mu\text{L/s}$)	Volumen de inyección (μL)					Duración del ciclo de análisis (s)
2,50	5,0	12,5	17,5	25,0	30,0	100
6,25	6,2	12,5	18,7	25,0	31,2	40
6,66	6,7	12,7	18,0	24,6	30,0	37,5

De acuerdo con los datos facilitados en la tabla, los volúmenes de inyección no son idénticos para los diferentes caudales. Esto es debido a las propias limitaciones de la microbureta (ver apartado 3.2.4). Para cada caudal y volumen de inyección ha sido necesario crear una secuencia de programación diferente.

6.1.2.2 Resultados

Los resultados obtenidos se muestran a continuación. Aunque los análisis se han realizado por triplicado, sólo se ha representado un pico por experimento para hacer la comparación entre condiciones. En la comparación también se han incluido los resultados para el caudal de 5,83 μL , excluyendo los volúmenes de inyección altos.

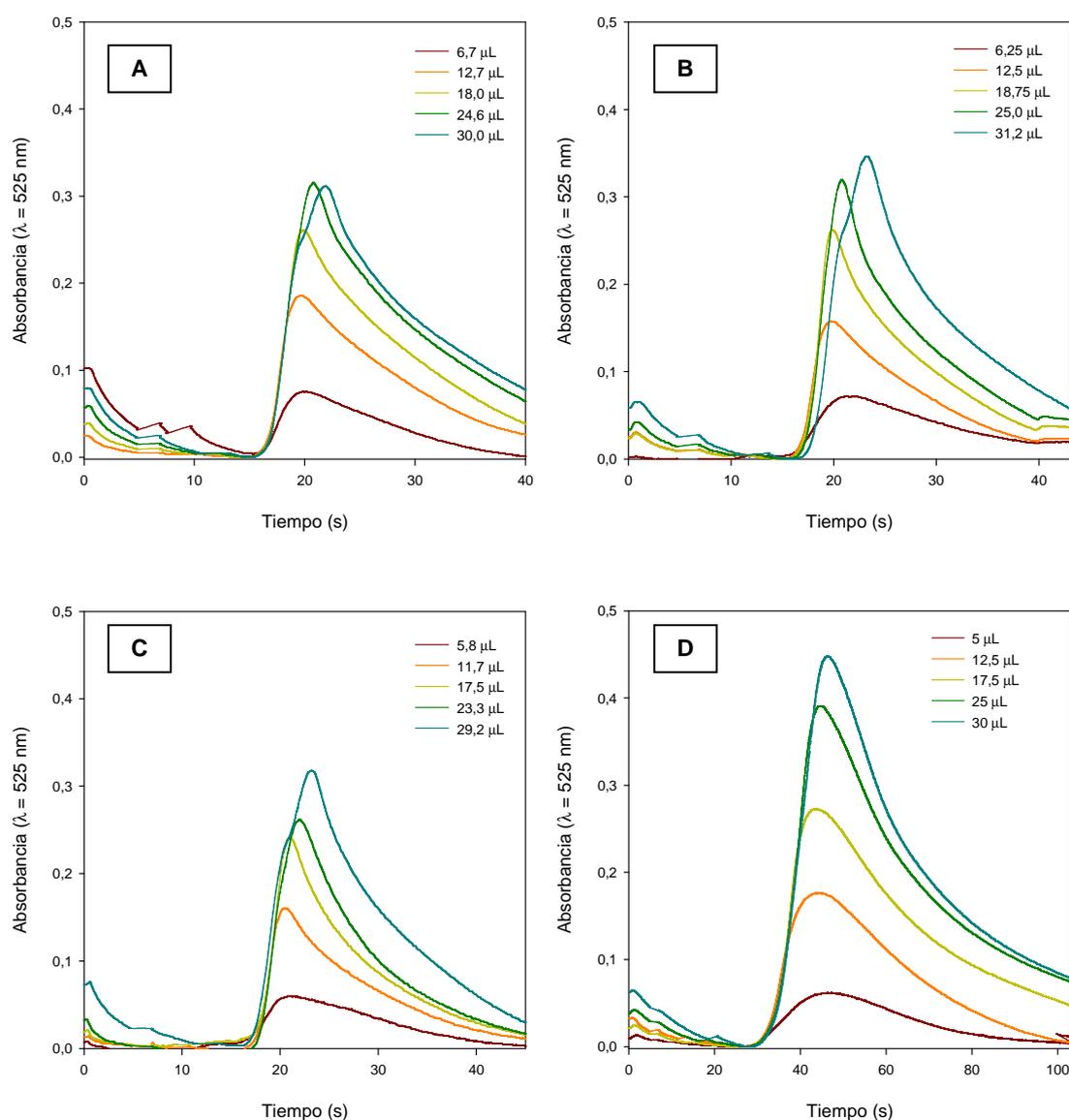


Fig. 6.2 Resultados obtenidos en el estudio de características microfluídicas para cada caudal: A) 6,66 $\mu\text{L/s}$, B) 6,25 $\mu\text{L/s}$, C) 5,83 $\mu\text{L/s}$ y D) 2,50 $\mu\text{L/s}$.

A caudales bajos, como el de 2,50 $\mu\text{L/s}$, la altura de pico es mayor para todos los volúmenes que para el resto de caudales. Este hecho se puede apreciar sobre todo para volúmenes de inyección altos. En cambio, para volúmenes de inyección bajos, se obtiene más altura de pico para el caudal más alto. Estas observaciones nos dicen que a caudales bajos y volúmenes de inyección altos, un mayor tiempo de residencia favorece la formación del producto coloreado azoico obteniéndose absorbancias mayores. Por otra parte, la dispersión es mayor cuanto más bajo es el caudal. Por ese motivo, a volúmenes de inyección bajos y caudales bajos el tiempo de residencia favorece la dispersión de la menor cantidad de producto formado y se obtienen menores absorbancias que a caudales altos.

Para valores medios de caudal, 5,83 y 6,25 $\mu\text{L/s}$, y volúmenes de inyección medio-bajos (11,7-12,5 μL), prácticamente no se observan diferencias. Esto significa que las diferencias entre los tiempos de residencia y dispersión en estas condiciones quedan compensadas. Pero a volúmenes de inyección medio-altos, ocurre que a mayor caudal, mayor altura de pico. Esto es debido al efecto del caudal en la dispersión que hace que el producto formado a caudales mayores tenga menos tiempo para dispersarse. Este hecho se vuelve más evidente para los volúmenes de inyección mayores.

Por otro lado, a caudales altos, 6,66 $\mu\text{L/s}$, y volúmenes de inyección altos se obtienen menores absorbancias que para el caso de caudales medio-altos. En el caso del caudal 6,66 $\mu\text{L/s}$ aunque la dispersión es menor, el tiempo de residencia también lo es. Por lo cual, en este extremo, un tiempo de residencia inferior hace que se obtengan absorbancias menores.

Se observa que el tiempo al que sale el pico tiene que ver con el caudal, pues a mayor caudal el pico sale a menor tiempo. También se observa, que en general la altura de pico es mayor cuando se incrementa el volumen de inyección. En cambio, para el volumen de inyección más alto se comprueba que la altura de pico disminuye con el aumento de caudal. Ya que aunque la dispersión a caudales altos es menor, el tiempo de residencia se ve realmente desfavorecido por los caudales altos y los volúmenes de inyección altos, disminuyendo notablemente el tiempo de reacción.

En la figura 6.3 D, las absorbancias para los dos caudales medios son prácticamente iguales. También se puede apreciar como las amplitudes de los picos aumentan cuanto menor es el caudal, debido a una mayor dispersión.

La recuperación de la línea de base es más lenta a volúmenes de inyección altos. Esto es debido a que la cantidad de producto azoico formado es mayor, por lo cual para estos casos sería necesario un tiempo de aspiración del segundo turno de reactivo mayor, suponiendo un ciclo de análisis más largo.

6.2 Estudio de la respuesta del microsistema

El estudio de la respuesta del sistema tiene por finalidad el estudio de la interacción de los parámetros relacionados mediante un diseño de experimentos. En este caso, los parámetros estudiados han sido el caudal, el volumen de inyección y la concentración.

6.2.1 Diseño de experimentos

El diseño de experimentos se ha hecho según la metodología de Box-Wilson para tres factores y cinco niveles (Box y col., 1951; Park, 1996), dando lugar a un conjunto de quince experimentos con ocho replicados del punto central. *Los niveles normalizados son $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $y + \alpha$, siendo α igual a 1.68; y, los tres factores son el caudal, el volumen de inyección y la concentración.* Para el estudio se han establecido valores máximos y mínimos para estos factores, que vienen definidos (tabla 6.4) con las propias limitaciones del microsistema,

Tabla 6.4 Rango de valores de los tres factores estudiados.

Factor	Valor mínimo	Valor máximo
Caudal ($\mu\text{l/s}$)	2,5	6,25
Volumen (μl)	5	30
$[\text{NO}_2^-]$ (ppm)	0,1	10

Para describir la respuesta del sistema se ha utilizado la Metodología de Respuesta de Superficie (MSR), ajustándose el modelo a un polinomio de segundo orden con interacciones:

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^3 A_i X_i + \sum_{i=1}^3 A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 A_{ij} X_i X_j \quad \text{Ecuación 6.1}$$

donde,

Y : valor de la respuesta (UA)

A_0 : coeficiente constante

A_i : coeficiente lineal

A_{ii} : coeficiente cuadrático

A_{ij} : coeficiente con interacciones

$X_i X_j$: valores codificados de los factores

Luego, es necesario hacer la asignación de los niveles normalizados anteriores a los valores experimentales. Para ello se ha utilizado la siguiente ecuación:

$$x_i^* = \frac{x_i - c_x}{d_x} \cdot d^* \quad \text{Ecuación 6.2}$$

donde,

x : factor (caudal, volumen de inyección, concentración); c_x : corresponde al punto central calculado ($c_x = (v.máx + v.mín) / 2$); x_i^* : valor normalizado del nivel; x_i : valor experimental del nivel; d^* : 1.68+1.68; y d_x : $|v.máx - v.mín|$.

Debido a las limitaciones experimentales los valores experimentales obtenidos de esta manera han tenido que ser ajustados a condiciones disponibles del sistema. Por ejemplo, si obtenemos con la fórmula un valor experimental de 3,258 $\mu\text{L/s}$, nos encontramos que no se trata de un caudal de los disponibles en el microsistema, debido a las limitaciones de la microbureta comentadas anteriormente (apartado 3.2.4). Por lo cual, ha sido necesario escoger el valor inmediatamente más próximo, para este ejemplo un caudal de 3,33 $\mu\text{L/s}$. Esta desviación también se ha tomado en cuenta en la introducción de datos para la obtención de la superficie de respuesta teniendo en cuenta el valor real normalizado. En la tabla 6.5 se muestran las condiciones utilizadas en este estudio.

Tabla 6.5 Resumen de las condiciones de análisis en el estudio de la respuesta del microsistema.

Experimento	Caudal ($\mu\text{L/s}$)	Volumen de inyección (μL)	Concentración (ppm)
1 (8 replicados)	4,17	17,5	5
2	4,17	5	5
3	4,17	30	5
4	2,5	17,5	5
5	6,25	17,5	5
6	4,17	17,5	0,1
7	4,17	17,5	10
8	5,42	25	8
9	5,42	25	2
10	5,42	10	8
11	3,33	25	8
12	3,33	10	8
13	3,33	25	2
14	5,42	10	2
15	3,33	10	2

6.2.2 Resultados del estudio de respuesta del microsistema

Los resultados de absorbancia obtenidos en los 23 experimentos han sido utilizados para establecer un modelo de respuesta del microsistema. Los coeficientes fueron evaluados usando los valores codificados para cada factor con el objetivo de determinar el peso relativo de cada uno de ellos en la respuesta. El modelo normalizado obtenido indica que todos los factores considerados tienen influencia significativa en la respuesta del sistema porque todos los coeficientes lineales (A_i) son significativos (ecuación 6.3). El coeficiente correspondiente al factor caudal tiene signo negativo y los correspondientes a volumen y concentración positivo. De manera que el aumento de caudal tendrá un efecto de disminución de la respuesta, a diferencia de volumen y concentración que son positivos y cuyo aumento proporcionará un incremento de la respuesta del microsistema. Los efectos cuadráticos (A_{ii}) son significativos para todos los factores. El efecto de las interacciones (A_{ij}) es significativo sólo para las interacciones de caudal-volumen (A_{12}) y volumen-concentración (A_{23}). Por tanto, el término relativo a la interacción de caudal-concentración (A_{13}), con un valor de 0.00062, no ha sido incluido en el polinomio. La ecuación codificada obtenida se muestra a continuación:

$$Abs = 0.1319 - 0.0056 \cdot Q + 0.0547 \cdot V + 0.0853 \cdot [NO_2^-] + 0.0047 \cdot Q^2 - 0.0113 \cdot V^2 + 0.0049 \cdot [NO_2^-]^2 + 0.0055 \cdot Q \cdot V + 0.0437 \cdot V \cdot [NO_2^-]$$

Ecuación 6.3

El análisis estadístico de varianza (tabla 6.6) para los tres factores considerados, confirma que la respuesta del sistema (absorbancia) puede ser descrita por un polinomio de segundo orden con interacciones donde la contribución de los factores (test 2 correcto) es más importante que el error experimental con un 99% de confianza (test 1 correcto). A pesar de ser un modelo correcto no describe todo el dominio experimental ($F_{2tab} << F_{2exp}$, test 3 es incorrecto). Este resultado está asociado con las dificultades experimentales propias del sistema en cuanto a la modificación de caudales y volúmenes de inyección [Climent, 2005].

Tabla 6.6. Resultados estadísticos del modelo de respuesta ajustado.

Factores no significativos	Coeficiente de regresión	Resultados estadísticos (99% confianza)
A_{13} (interacción $Q \cdot NO_2^-$)	0.998	Test 1: $F_{1exp}=226.42 > F_{2exp}=26.69$ Test 2: $F_{1exp}=226.42 > F_{1tab}=4.39$ Test 3: $F_{2tab}=7.01 << F_{2exp}=26.69$

Una vez establecido el modelo óptimo para explicar la respuesta experimental (ecuación 6.3), se procede a la obtención de la ecuación polinómica no codificada utilizando como

datos de entrada los valores reales de los factores sin codificar y los valores de absorbancia obtenidos. El modelo sin codificar (ecuación 6.4) es el que se ha utilizado para determinar los valores óptimos de operación (caudal y volumen).

$$Abs = 0.1423 - 0.0506 \cdot Q + 0.0016 \cdot V + 0.0141 \cdot [NO_2^-] + 0.0038 \cdot Q^2 - 0.0002 \cdot V^2 + 0.0005 \cdot [NO_2^-]^2 + 0.0007 \cdot Q \cdot V + 0.0019 \cdot V \cdot [NO_2^-]$$

Ecuación 6.4

En la figura 6.4 se muestra el efecto en la respuesta del caudal (A_1) y el volumen de inyección (A_2) frente a la concentración de ión nitrito. En ambos casos se ha comparado simultáneamente el efecto de la variación de caudal y el volumen manteniendo constante el tercer factor: concentración de ión nitrito (A_3). En las dos superficies de respuesta obtenidas para dos concentraciones de ión nitrito se observa que un aumento de volumen de inyección provoca un aumento de la respuesta del sistema en todo el rango de volúmenes estudiados.

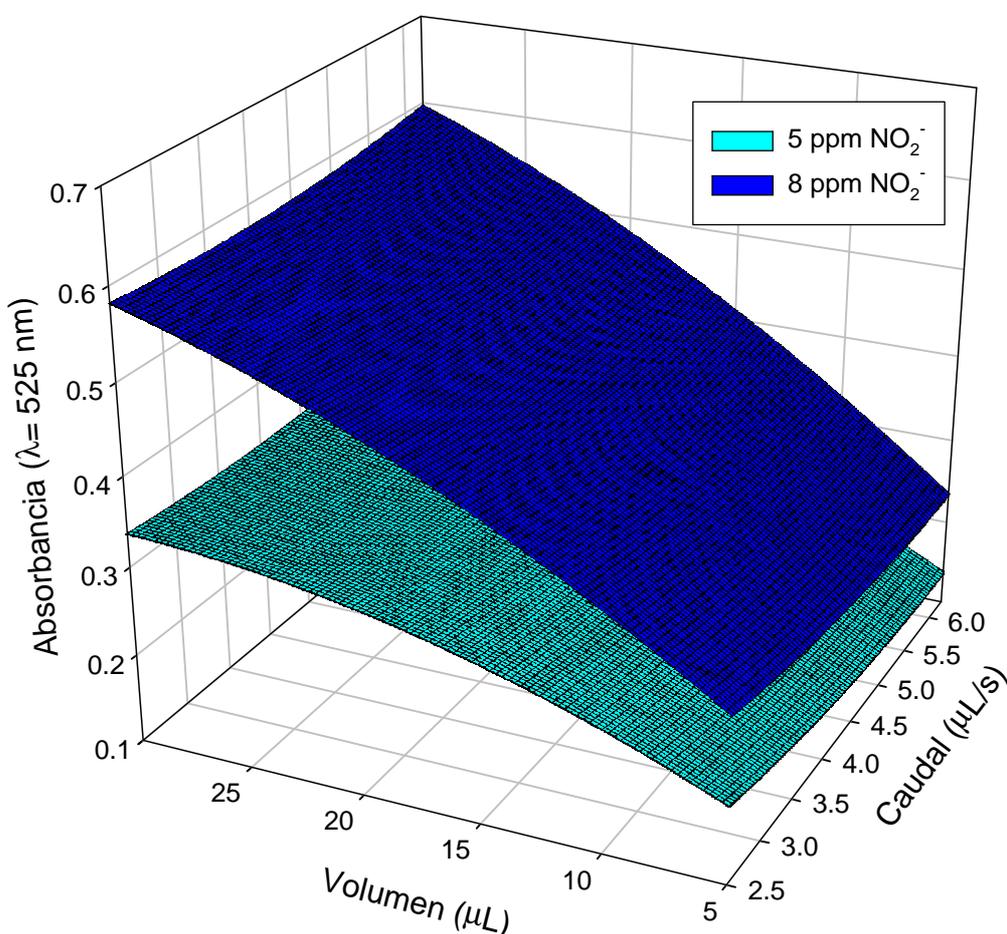


Fig. 6.3 Efecto del volumen y el caudal en la señal analítica (absorbancia) para dos concentraciones de ión nitrito.

El efecto del caudal no está tan definido. A concentraciones bajas (5 ppm) se observa una respuesta ligeramente superior a caudales bajos (2,5 μL/s) respecto a los caudales altos (6,25 μL/s). Este hecho parece estar asociado con un mayor tiempo de reacción a caudales

bajos y una mayor dispersión del producto azo formado a caudales mayores. A concentraciones altas (8 ppm) el efecto del caudal es menos importante. Como se puede observar en la figura la respuesta obtenida es prácticamente igual a caudales bajos que caudales altos.

La limitación de las condiciones experimentales aplicadas se evidencia en la superficie de respuesta obtenida ya que es difícil establecer unas condiciones que permitan definir un valor máximo de la respuesta. A pesar de que la respuesta máxima se ha obtenido para mayores volúmenes de muestra, las complicaciones adicionales que el uso de volúmenes grandes conlleva, desde el punto de vista de funcionamiento del equipo ya que utiliza una jeringa de 250 μL , hizo considerar más factible el uso de volúmenes y caudales medios para la aplicación. Estas condiciones facilitan la operación del sistema y aumentan el intervalo de respuesta lineal del método propuesto, tal como se detalla en el apartado 6.1.2.

6.3 Selección de las condiciones óptimas de operación

Finalmente, con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de operación para el análisis de muestras reales en un intervalo de 0-50 p.m. de ión nitrito, se ha realizado un estudio para definir el volumen de inyección y el caudal que amplían el rango lineal de repuesta. Se ha evaluado el efecto en la respuesta de tres volúmenes de inyección a dos caudales.

6.3.1 Condiciones

Las condiciones estudiadas se resumen en la tabla 6.7.

Tabla 6.7 Condiciones utilizadas en el estudio de selección de las condiciones óptimas.

Caudal ($\mu\text{L/s}$)	Tiempo de aspiración de disolución patrón para un volumen de (s):			Tiempo total de aspiración (s)
	5 μL	10 μL	17,5 μL	
4,17	1,2	2,4	4,2	60
6,25	0,8	1,6	2,8	40

El estudio se ha hecho para cuatro concentraciones de disolución patrón: 2, 5, 10 y 20 ppm de ión nitrito. Es decir, se han probado 6 condiciones diferentes para cada concentración.

6.3.2 Resultados

A continuación en la figura 6.4 se muestran los calibrados para las seis condiciones. Las figuras de la columna de la izquierda corresponden al caudal de 4,16 $\mu\text{L/s}$ y las mostradas en la izquierda al caudal de 6,25 $\mu\text{L/s}$.

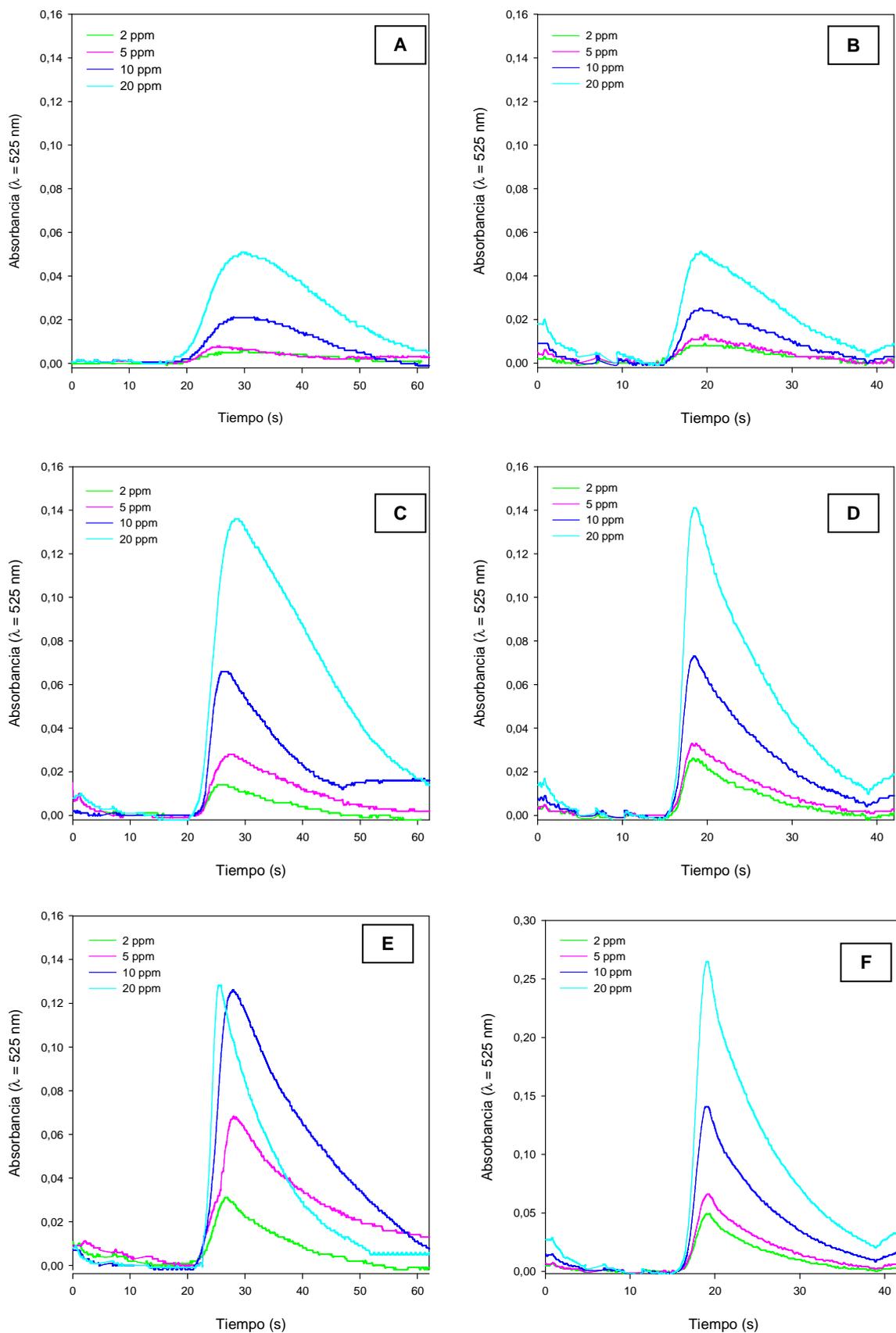


Fig. 6.4 Respuesta para el caudal de 4,17 μL/s y volumen de aspiración de: **A** 5 μL, **C** 10 μL y **E** 17,5 μL. Respuesta para el caudal de 6,25 μL/s y volumen de aspiración de: **B** 5 μL, **D** 10 μL y **F** 17,5 μL.

Se vuelve a comprobar que a volúmenes de aspiración pequeños se obtienen alturas de pico inferiores, como se puede comprobar en los casos A y B, donde las respuestas obtenidas para el volumen de aspiración de 5 μL para ambos caudales han sido menores. En el caso E, para 17,5 μL y caudal de 4,16 $\mu\text{L/s}$, se ha obtenido saturación de la respuesta, puesto que los picos correspondientes a 10 y 20 ppm presentan prácticamente la misma altura de pico.

Este hecho también se puede ver en la siguiente figura 6.5, donde se han representado los tres calibrados para el caudal de 4,16 $\mu\text{L/s}$. Puede observarse como se produce una pérdida de la linealidad de la respuesta para el volumen de inyección de 17,5 μL . En cambio, en estas mismas condiciones de volumen de inyección, pero para el caso del caudal de 6,25 $\mu\text{L/s}$, tal y como se representa en la figura 6.6, no se produce pérdida de linealidad debido a una disminución de la dispersión provocada por el aumento de caudal.

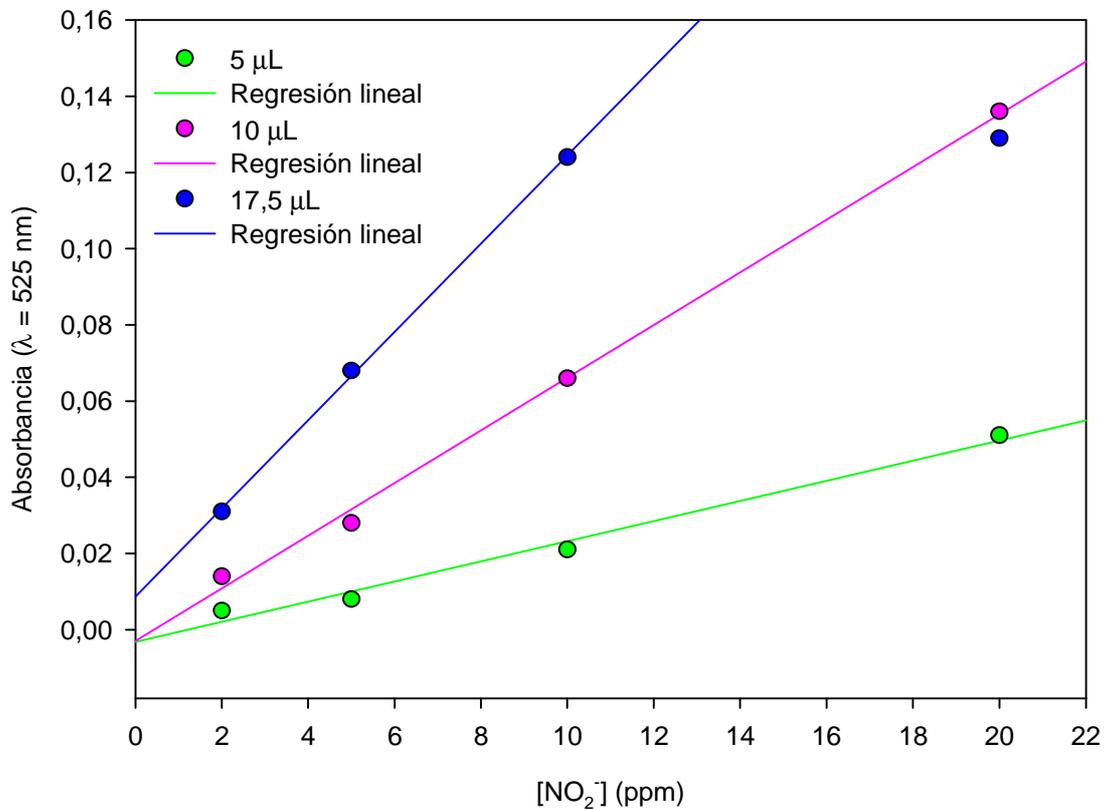


Fig. 6.5 Rectas de calibración para cada volumen aspirado de disolución patrón a un caudal de 4,17 $\mu\text{L/s}$.

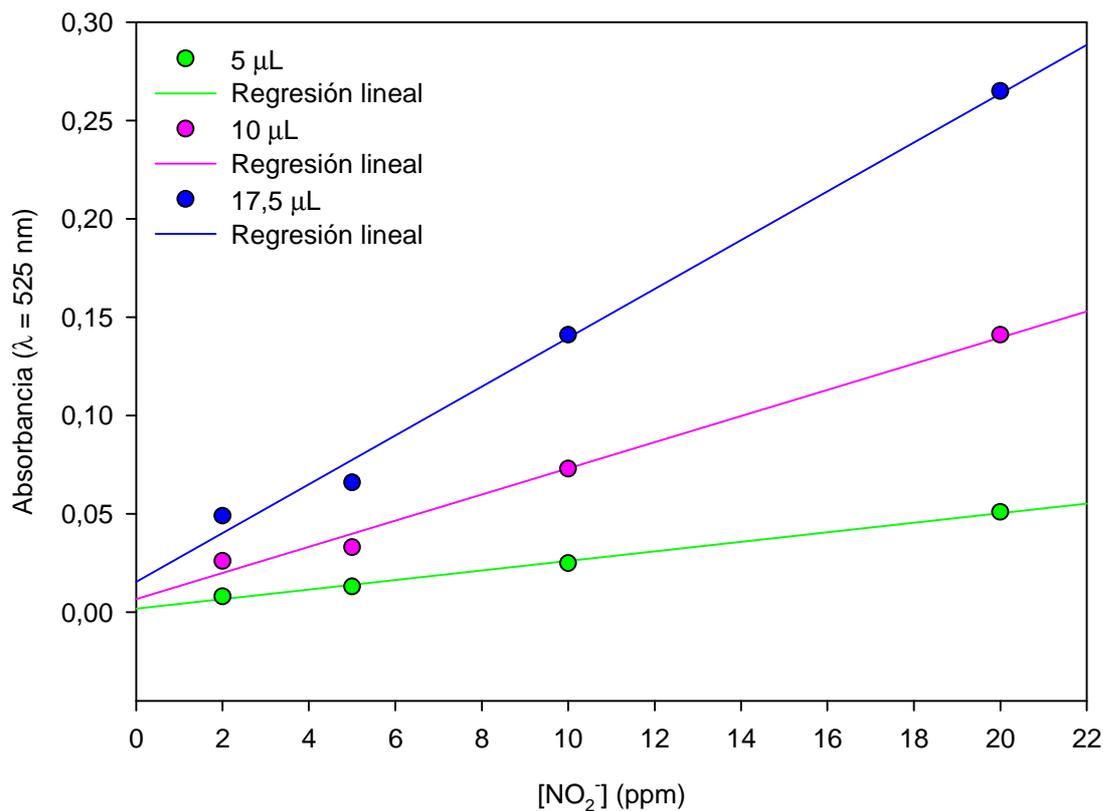


Fig. 6.6 Rectas de calibración para cada volumen aspirado de disolución patrón a un caudal de 6,25 $\mu\text{L/s}$.

En ambos casos se puede observar como las rectas de regresión para el caso del volumen de inyección de 5 μL presentan una menor pendiente como consecuencia de la disminución de la señal obtenida a volúmenes de inyección pequeños.

Finalmente, se concluye que las condiciones óptimas de trabajo corresponden a una situación intermedia de caudal y volumen de inyección. Como son el caudal de 4,16 $\mu\text{L/s}$ y volumen de inyección de 10 μL , ya que el intervalo de respuesta lineal se encuentran en el rango deseado de 0 – 20 ppm. Estas condiciones también presentan un mejor ajuste lineal de los datos que para los casos de 10 y 17,5 μL del caudal de 6,25 $\mu\text{L/s}$.

7 Caracterización del microsistema

La caracterización del microsistema construido ha consistido en la determinación del límite de detección y la evaluación de la repetitividad.

7.1 Límite de detección

El límite de detección se ha calculado con el objetivo de determinar la concentración mínima detectable, de acuerdo a la IUPAC (Inczedy, 1998). Para ello se ha utilizado agua MilliQ como blanco. En primer lugar se ha hallado el promedio (S_b) y la desviación estándar (s_b) de 20 medidas del blanco para luego calcular la señal mínima detectable (y_L) como:

$$y_L = S_b + k \cdot s_b \quad \text{Ecuación 7.1}$$

Después sustituyendo y_L en 3 rectas de calibrado se ha obtenido el promedio de la concentración mínima detectable (L_D), obteniéndose $L_D = 1,5 \pm 0,4 \text{ ppm}$, para un nivel de confianza del 95%.

7.2 Repetitividad

La repetitividad se ha calculado como la desviación estándar relativa (RSD (%)) y se ha utilizado una disolución patrón de 5 ppm de ión nitrito. Para la determinación de la RSD se ha calculado el cociente entre la desviación estándar y la media de 33 medidas. $RSD = (s/x) \cdot 100$, obteniéndose una $RSD = 3,4\%$. Por lo tanto, la repetitividad del sistema es aceptable porque es menor al 5%, que es el valor máximo aceptable en técnicas instrumentales. En la figura 7.1 se muestra un gráfico de las señales analíticas obtenidas en el estudio de repetitividad.

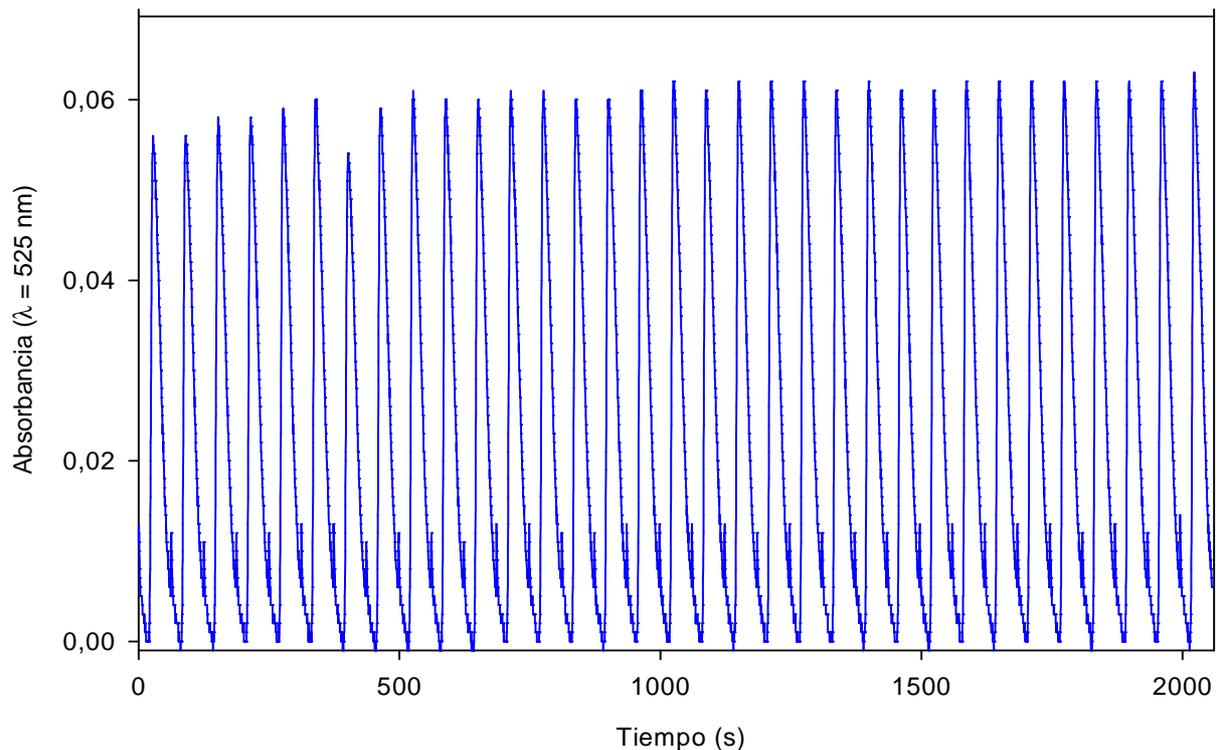


Fig.7.1 Registro de las señales de los picos obtenidos en el estudio de repetitividad para una concentración de 5ppm de ión nitrito.

Finalmente, en la tabla 7.1 se muestra un resumen de las principales características de respuesta del microsistema desarrollado. Tanto la sensibilidad como el límite de detección se han calculado para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 7.1 Resumen de las principales características del microsistema.

Parámetro	Resultado
Sensibilidad (n=6)	0,009 ± 0,001
Límite de detección (ppm) (n=20)	1,5 ± 0,4
Intervalo lineal (ppm)	0 – 20 ppm
Repetitividad (%) (n=33)	3,4
Consumo M/R (µL)	10/240
Frecuencia de análisis (h ⁻¹)	30

8 Validación del microsistema

Para llevar a cabo la validación del microsistema, se han analizado muestras reales procedentes de una EDAR piloto. El rango de concentraciones se encuentra comprendido entre 13 y 133 ppm de ión nitrito (4 – 40 ppm de nitrógeno en forma de nitrito). Como método de referencia para la validación del microanalizador se utilizó la electroforesis capilar.

8.1 *Análisis de muestras reales*

8.1.1 Condiciones

Las muestras reales han tenido que ser diluidas en una relación 1:10 en agua MilliQ para poder trabajar dentro del rango de respuesta lineal, siendo éste de 0 - 20 ppm. Tanto las muestras como las disoluciones patrón se han analizado por triplicado bajo las mismas condiciones. En la tabla 8.1 se muestra la secuencia correspondiente a los tiempos de operación.

Tabla 8.1 Secuencia seguida para el análisis de muestras reales que corresponden a un caudal de 4,16 $\mu\text{L/s}$ y un volumen de inyección de 10 mL.

SECUENCIA				
Tiempo (s)	Operación	Canal	Adquisición de datos	
5	Aspiración de reactivo	5	Sí	
2,4	Aspiración de muestra diluida 1:10	4	Sí	
52,6	Aspiración de reactivo	5	Sí	
60	Impulsión para vaciado	S	No	

8.1.2 Resultados

En la figura 8.1 se muestra el calibrado obtenido bajo las condiciones indicadas en el apartado anterior. Las concentraciones de las disoluciones patrón utilizadas son 2, 5, 7.5, 10, 15 y 20 ppm de ión nitrito.

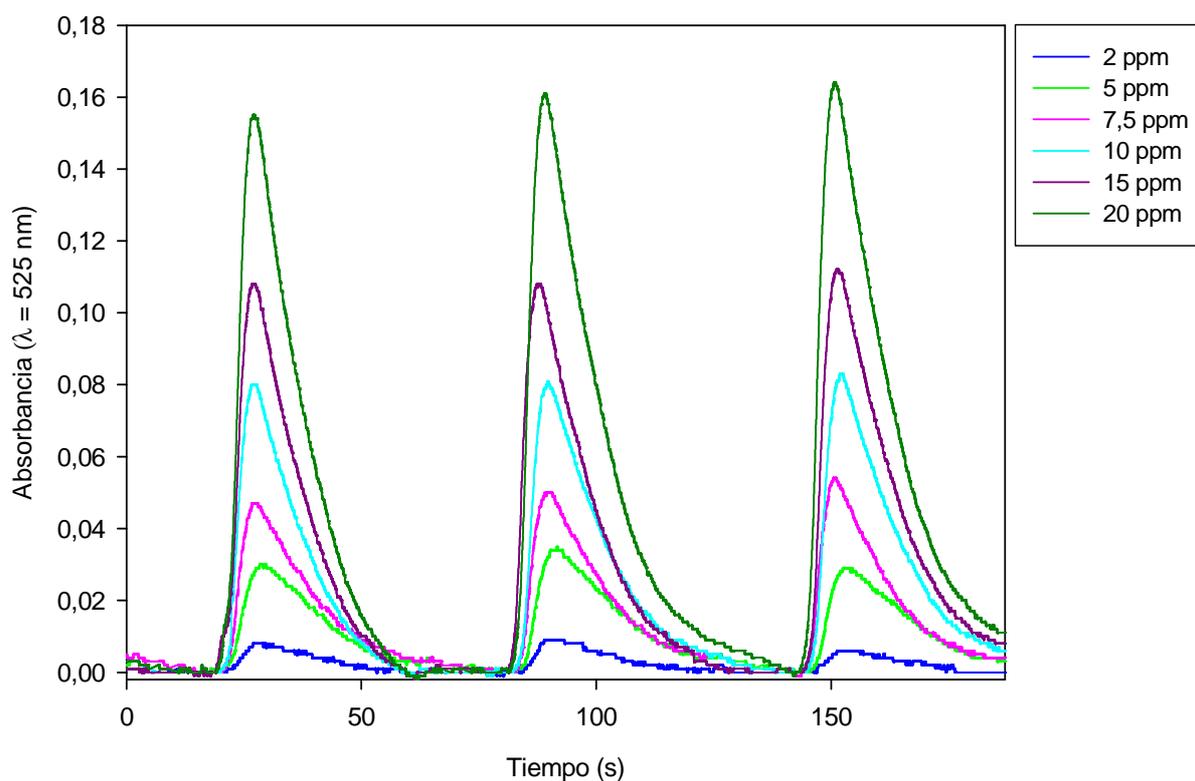


Fig. 8.1 Registro de calibrado (2-20 ppm)

A continuación en la figura 8.2 se muestra un ejemplo del registro de las señales de muestras. El ruido observado en el registro está provocado por disminución de señal analítica que se produce al diluir la muestra.

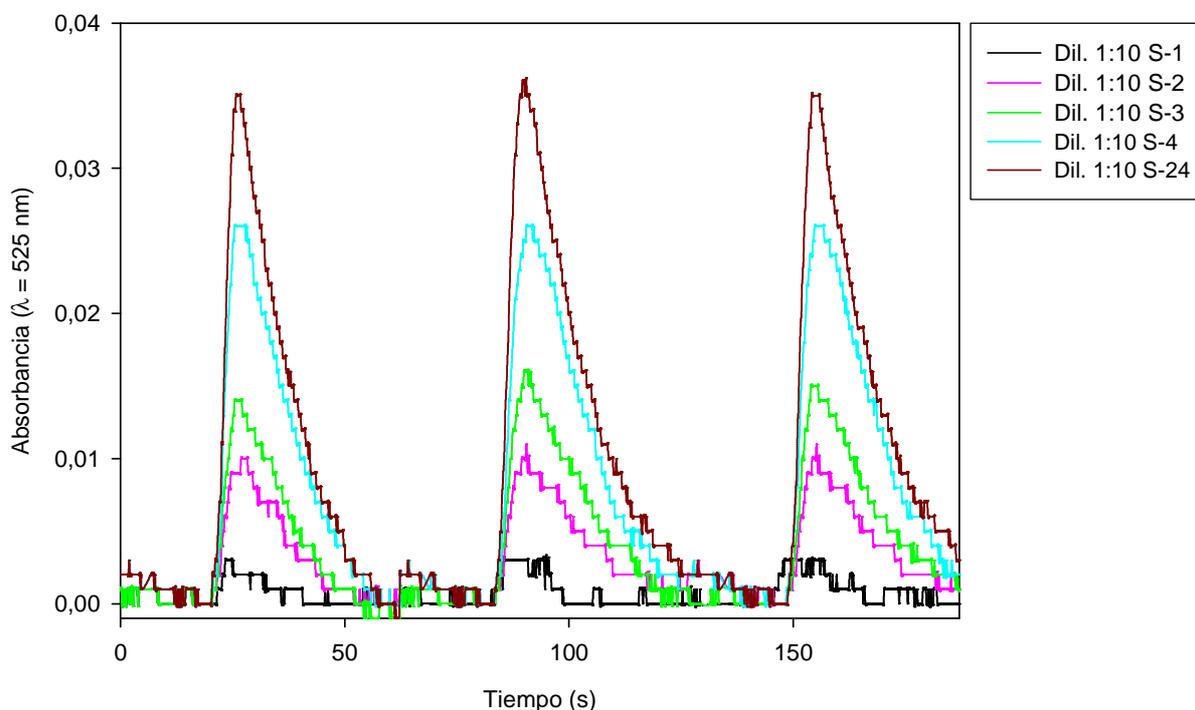


Fig. 8.2 Registro de señales de algunas muestras reales.

Puede observarse como en los picos de la figura 8.2 correspondientes a algunos de los análisis de muestras reales, se evidencia más el ruido de fondo debido al cambio de escala. Las muestras han tenido que ser diluidas previamente a su análisis para llevar sus concentraciones dentro del rango de respuesta lineal del microsistema. La disminución de señal analítica repercute en una disminución de la relación señal ruido (S/N) y por lo tanto en un aumento del ruido obtenido en la respuesta.

Los resultados se han expresado como nitrógeno en forma de nitrito (N-NO_2^-) para poderlos comparar posteriormente con sus valores de referencia. Se han tomado como valores de referencia los resultados facilitados del análisis de las muestras por electroforesis capilar. De manera que en los análisis realizados los resultados se han calculado primeramente en ión nitrito (NO_2^-), y luego se ha hecho la conversión a nitrógeno en forma de nitrito ($1 \text{ ppm NO}_2^- = 0,3043 \text{ ppm N-NO}_2^-$). En la tabla 8.2 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de las muestras reales. El error de cada resultado se ha calculado como el intervalo de confianza con un nivel del 95%, $I_{n-1}^{95\%} = s_{n-1} \cdot t_{n-1} \cdot n^{1/2}$, donde $n = 3$.

Tabla 8.2 Resultados analíticos de las muestras reales (n=24).

Muestra	[N-NO ₂] ppm ± I _{n-1} ^{95%}	Muestra	[N-NO ₂] ppm ± I _{n-1} ^{95%}
S-1	5,3 ± 0,5	S-13	41 ± 2
S-2	7,7 ± 0,5	S-14	9 ± 3
S-3	9,6 ± 0,9	S-15	9,5 ± 0,5
S-4	13,3 ± 0,5	S-16	11 ± 1
S-5	16 ± 1	S-17	12 ± 1
S-6	22,7 ± 0,8	S-18	15 ± 2
S-7	27 ± 2	S-19	17 ± 1
S-8	34,5 ± 0,7	S-20	20 ± 2
S-9	34 ± 2	S-21	20 ± 7
S-10	35 ± 1	S-22	21,8 ± 0,5
S-11	40 ± 1	S-23	9 ± 1
S-12	41 ± 5	S-24	16,9 ± 0,5

8.2 Análisis estadístico

Con el objetivo de realizar el análisis estadístico de las 24 muestras se han aplicado dos métodos estadísticos: la regresión lineal entre los dos métodos y la prueba t para medias de dos muestras emparejadas (Miller y Miller, 1993).

8.2.1 Test de la regresión lineal

La comparación por regresión lineal se ha hecho suponiendo que existe realmente una relación lineal entre los valores experimentales (y) y los de referencia (x); los valores de y están normalmente distribuidos y son estadísticamente independientes; y , los valores de la variable independiente (x) son fijos, medidos sin error.

En la figura 8.3 se muestran los valores de abscisas y ordenadas que corresponden a los valores de referencia y a los obtenidos en este estudio, respectivamente. Los resultados experimentales se muestran con el error asociado. En la misma figura se ha incluido la recta teórica ($y=0+1\cdot x$), que representa la ausencia de cualquier tipo de desviación entre los resultados de referencia y experimentales.

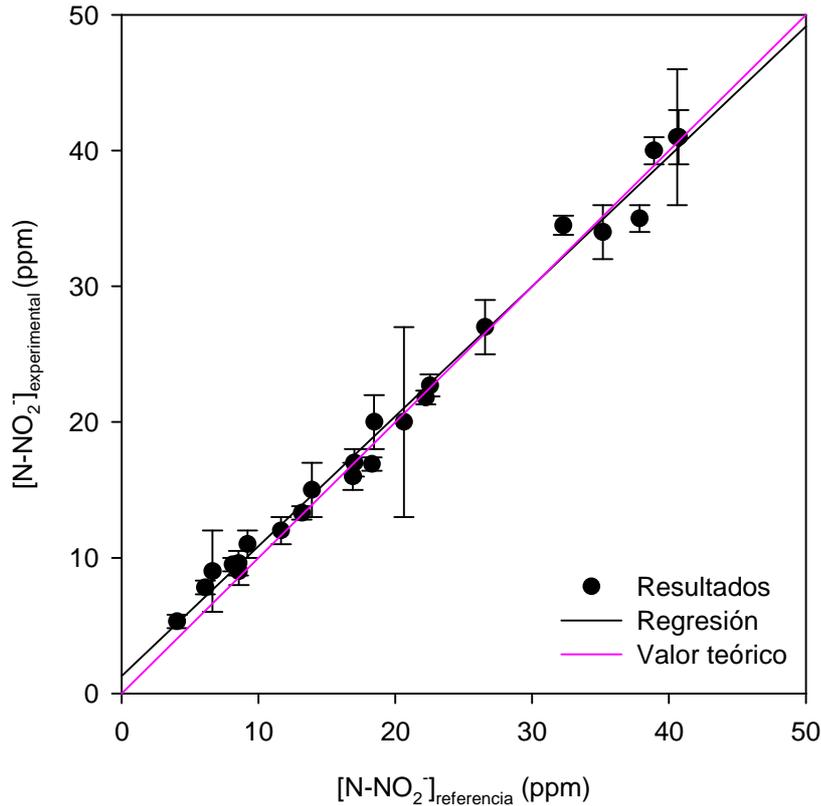


Fig. 8.3 Comparación de los valores experimentales frente a los teóricos.

Del análisis estadístico se desprende que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el método de referencia y los resultados obtenidos con el método propuesto, con un nivel de confianza del 95%, ya que tanto la pendiente como la ordenada en el origen no se desvían de forma significativa de los valores de la recta teórica, 1 y 0, respectivamente (tabla 8.3).

8.2.2 Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

La prueba t de muestras emparejadas consiste en comparar los valores de la t calculada (t_{cal}) y el valor crítico de t (t_{tab}). La t_{cal} se obtiene como:

$$t_{cal} = \sqrt{x_d(n)} / s_d \quad \text{Ecuación 8.1}$$

y para este caso ha sido de $t_{cal} = 1,71$ valor inferior al de t_{tab} , que es de 2,07 para 23 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95%. Esto indica que tanto la serie de valores experimentales como la serie de valores de referencia proceden de distribuciones con medias de población iguales, y que, por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre ambos métodos. En la tabla 8.3 se muestra un resumen de los resultados:

Tabla 8.3 Resultados obtenidos del análisis estadístico.

Método estadístico	Resultados (95%) (n=24)
Regresión lineal	$a = 1 \pm 2$ $b = 0,96 \pm 0,08$ $r = 0,99$
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	$t_{cal} = 1,71$ $t_{tab} = 2,07$ $t_{cal} < t_{tab}$

9 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este proyecto han permitido demostrar que la tecnología LTCC es idónea para construir dispositivos en un espacio relativamente corto de tiempo y de manera sencilla, eliminando la necesidad del uso de salas blancas, como es el caso de otros materiales como silicio. De manera que se simplifica el proceso de micro construcción, se disminuyen los costes de operación y se favorece la construcción de dispositivos en masa. Adicionalmente, las cerámicas verdes presentan una gran versatilidad para la integración de otros elementos como sensores amperométricos o potenciométricos, lo que amplía las posibilidades de aplicación.

En el dispositivo construido se ha comprobado que a pesar del pequeño tamaño de los microcanales, donde el régimen del flujo es laminar, la presencia de codos consecutivos de 90° ha favorecido puntos de mezcla caótica, obteniéndose un grado de mezcla suficiente para la reacción utilizada en la determinación de ión nitrito. Ello elimina la necesidad de recurrir a estrategias de mezcla adicionales como la técnica de multiconmutación o el diseño de sofisticados mezcladores internos.

Se ha establecido con éxito la influencia de la geometría de la celda en la etapa de detección. Se ha podido comprobar que la geometría de la celda de flujo juega un papel importante en las determinaciones espectrofométricas, ya que está directamente relacionada con la dispersión del producto formado en la etapa de detección. En función de la geometría interna se produce una mayor dispersión del bolo de producto en el detector, lo que directamente implica la disminución de señal analítica y, por tanto, de sensibilidad. Se

ha comprobado que la mejor geometría es la de círculo ya que disminuye considerablemente la dispersión en la etapa de detección.

Se ha comprobado que el hecho de trabajar con volúmenes pequeños de muestra y reactivo da lugar a niveles de respuesta menores, pero suficientes para la aplicación final. Además, se ha comprobado que la reducción de estos volúmenes se encuentra relacionada directamente con el aumento del rango de respuesta lineal del analizador. Otro factor destacable relacionado con los volúmenes pequeños de muestra y reactivo, es que de esta manera se genera mucho menos residuo. Lo cual conlleva a una minimización de los gastos destinados a la gestión y tratamiento de los residuos. A la vez que se reducen los costes de operación.

El microanalizador desarrollado resulta adecuado para la determinación de ión nitrito en aguas con concentraciones igual o superiores a 1,5ppm, como por ejemplo, aguas residuales o procesos de nitrificación/desnitrificación. En el caso de aguas residuales tratadas en EDAR o potables, no se espera encontrar niveles de concentración de nitrito superiores al límite de detección del microsistema, por lo tanto, no sería posible su aplicación. Se ha de destacar que la validación del analizador con aguas residuales ha permitido verificar la viabilidad del microsistema como analizador de muestras con matriz compleja ya que no se han detectado problemas de interferencias de matriz, no encontrándose diferencias significativas con el método de referencia.

10 Bibliografía

APHA-AWWA-WPCF. *“Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales”*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1992.

Baeza, M. "Nuevas estrategias para la gestión de fluidos en sistemas automatizados de análisis". *Tesis correspondiente al Programa de Doctorado en Química (Universitat Autònoma de Barcelona)*, 2004.

Baeza, M.; Ibáñez-García, N.; Baucells, J.; Bartrolí, J.; Alonso, J. "Microflow injection system based on a multicommutation technique for nitrite determination in wastewaters". *The Analyst*, **131**, 1109-1115, (2006).

Baeza, M.; Montesinos, J.L.; Alonso, J.; Bartrolí, J. "Simple modeling of the physical simple dispersion process in rectangular meso (micro) channels with pressure-driven flows". *Anal Bioanal Chem*, **393**, 1233-1243, (2009).

Bau, H.H.; Zhu, J.; Qian, S.; Xiang, Y. "A Magneto-Hydrodynamically Controlled Fluidic Network". *Sensors and Actuators*, **88**, 205-216, (2003).

Betteridge, D.; Sly, T.J.; Wade, A.P. "Versatile automatic development system for flow injection analysis". *Analytical Chemistry*, **58**, 2258-2265 (1986).

Bermejo Martínez, F.; Bermejo Barrera, M.P.; Bermejo Barrera, A. "Química Analítica General, Cuantitativa e Instrumental". Ed. Editorial Paraninfo, 6ª edición, 1991.

Böhm, S.; Greiner, K.; Schlautmann, S.; de Vries, S.; van den Berg, A. "A rapid vortex micromixer for studying highspeed chemical reactions". In: J.M. Ramsey, A. van den Berg (eds.); Micro Total Analysis Systems 2001, Proceedings of the μ TAS 2001 Symposium, Monterey, CA, USA, October 21-25, (2001).

Box, G.E.P.; Wilson, K.B. "On the experimental attainment of the optimum conditions". *Journal Royal of the Statistical Society*, **13**, 1-45, (1951).

Climent, M. "Estudio y evaluación de diferentes pretratamientos para la mejora del proceso de digestión anaerobia de lodos de EDAR". *Tesina correspondiente al Programa de Doctorado en Tecnología Ambiental (Universitat Autònoma de Barcelona)*, 2004.

Dupont ®. "Dupont Microcircuit Materials. Dupont Green Tape™ Material System. Design and Layout Guidelines". (2003).

Dupont®. "Dupont Microcircuit Materials. 951 Green Tape™. Thick Film Composición. (2003).

Ehrfeld, W. ; Golbing, K. ; Hessel, V. Löwe, H.; Richter, T. "Characterization of mixing in micro mixers by a test reaction: single mixing units and mixer arrays". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **38**, 1075-1082, (1999).

Erickson, D.; Li, D. "Integrated microfluidic devices". *Analytica Chimica Acta*, **507 (1)**, 11-26, (2004).

Góngora-Rubio, M.R. ; Espinoza-Vallejos, P.; Sola-Laguna, L.; Santiago-Avilés, J.J. "Overview of low temperature co-fired ceramics tape technology for meso-system technology (MsST)". *Sensors & Actuators*, **89**, 222-241, (2001).

http://www2.dupont.com/MCM/en_US/uses_apps/military.html, consultada en agosto de 2009.

Ibáñez-García, 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 cofired ceramic technology. Integrated potentiometric detection based on solventpolymeric ion-selective electrodes". *Analytical Chemistry*, **78 (9)**, 2985-2992, (2006).

Ibáñez-García, 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 & Actuators B-Chemical*, **118 (1-2)**, 67-72, (2006).

Ibáñez-García, N. "Miniaturización de analizadores químicos mediante la tecnología LTCC" *Tesis correspondiente al Programa de Doctorado en Química Universitat Autònoma de Barcelona*, 2007.

Ibáñez-García, N.; Martínez-Cisneros, C.S.; Valdés, F.; Alonso, J. "Green-tape ceramics. New technological approach for integrating electronics and fluidics in microsystems". *Trends in Analytical Chemistry*, **27 (1)**, 24-33, (2008).

Inczedy, J., Lengyel, T., Ure, A.M. "Compendium of Analytical Nomenclature (definite rules 1997)". 3^a Edition. *Blackwell Science* (1998).

Li, S.; Floriano, P. N.; Christodoulides, N.; Fozdar, D. Y.; Shao, D.B.; Ali, M. F.; Dharshan, P.; Neikirk, D.; McDevitt, J. T.; Chen, S. C. "Disposable Polydimethylsiloxane/Silicon Hybrid Chips for Protein Detection", *Biosensors and Bioelectronics*, **21(4)**, 574-580, (2005).

Liu, R. H.; Stremler, M. A.; Sharp, K. V.; Olsen, M. G.; Santiago, J. G.; Adrian, R. J.; Aref, H.; Beebe, D. J. "Passive mixing in a three-dimensional serpentine microchannel". *Journal of Microelectromechanical Systems*, **9**, 190-197, (2000).

Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H.M. "Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing". *Sensors and Actuators B*, **1**, 244-248, (1990).

Miller, J.C.; Miller, J.N. "Estadística para Química Analítica". Wilmington: E.d. Addison-Wesley Iberoamerican, S .A., 1993.

Park, S.H. "Robust Design and Analysis for Quality Engineering". London: *Chapman & Hall*, 1996.

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. "Fabrication of 165 μm pitched PDP back panel based on LTCC-M Technology". *Society for Information Display (SID)*, 478 – 481, (2000).

Ruzicka, J. Hansen, E.H. "Flow Injection Analysis, Part I: A new concept of fast continuous flow analysis". *Analytica Chimica Acta*, **78**, 145, (1975).

Sawyer, L.N.; McCarty, P.L.; Parfin, G.F. "Chemistry for Environmental Engineering". McGraw Hill, 1994.

Schmid, U. "A robust flow sensor for high pressure automotive applications". *Sensors & Actuators*, **97**, 253-263, (2002).

Teterycz, H.; Kita, J.; Bauer, R.; Golonka, L.J.; Licznarski, B.W.; Nitsch, K.; Winiewski, K. "New design of an SnO₂ gas sensor on low temperature cofiring ceramics". *Sensors & Actuators*, **47**, 100-103, (1998).

Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D. *“Análisis por inyección en flujo”*. Murcia: Imprenta San Pablo, 1984.

Wilde, J.; Lai, Y. “Design optimization of an eddy current sensor using the finite-elements method”. *Microelectronics Reliability*, **43**, 345-349, (2003).

WPFC (The Water Pollution Control Federation). *“Nutrient control”*. Washington: Manual of practice FD-7, WPCF, 1983.

11 Anexos

Anexo I: *Diseño de experimentos Box-Wilson (3 factores, 5 niveles)*

Se trata de 15 experimentos y 8 replicados del punto central.

Los niveles son: $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$

$\alpha=1.68$

Factor	Valor mínimo	Valor máximo
Caudal ($\mu\text{L/s}$)	2.5	6.25
Volumen (μL)	5	30
$[\text{NO}_2^-]$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.1	10

- *Fórmulas:*

$$x_i^* = \frac{x_i - c_x \cdot d^*}{d_x}$$

c_x corresponde al punto central (calculado: $c_x = \frac{v.máx + v.mín}{2}$)

$$d^* = 1.68 + 1.68$$

x_i^* valor normalizado del nivel

x_i valor experimental del nivel

- *Valores encontrados a partir de la fórmula anterior:*

Factor	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Q ($\mu\text{L/s}$)	2.5	3.258	4.375	5.49	6.25
V (μL)	5	10.06	17.5	24.94	30
$[\text{NO}_2^-]$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.1	2.10	5.05	7.99	10

- *Ejemplo de cálculo (para el factor -1 del caudal):*

$$-1 = \frac{(x_i - 4.375)}{(6.25 - 2.5)} \cdot (1.68 + 1.68) \quad x_i = 3.258$$

- *Valores reales (en función de la disposición experimental):*

Factor	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Q (μL/s)¹	2.5	3.33	4.16	5.42	6.25
V (μL)²	5	10	17.5	25	30
[NO₂] (mg·L⁻¹)³	0.1	2	5	8	10

¹ Todos los caudales se realizan con la jeringa de 250μL

² El volumen se conseguirá calculando los tiempos de aspiración necesarios en cada caso (se puede utilizar un decimal).

³ Se determinarán teniendo en cuenta el uso preferencial de pipetas de vidrio para la preparación de cada patrón.

- *Cálculos de las concentraciones:*

- 500 mL de 1000 ppm de NO₂⁻ (disolución madre): 0,3825 g

- El resto de patrones:

$$1000 \text{ ppm} \xrightarrow{25/250} 100 \text{ ppm (pipeta)}$$

$$100 \text{ ppm} \xrightarrow{10/100} 10 \text{ ppm (pipeta)}$$

$$1000 \text{ ppm} \xrightarrow{0.8/100} 8 \text{ ppm (micropipeta)}$$

$$100 \text{ ppm} \xrightarrow{5/100} 5 \text{ ppm (pipeta)}$$

$$10 \text{ ppm} \xrightarrow{20/100} 2 \text{ ppm (pipeta)}$$

$$10 \text{ ppm} \xrightarrow{1/100} 0.1 \text{ ppm (micropipeta)}$$

- *Cálculo de los coeficientes reales de los factores (x_i^{*}):*

$$x_i^* = \frac{(4.16 - 4.375)}{(6.25 - 2.5)} \cdot (1.68 + 1.68) = -0.193$$

Factor	-	-	-	-	-	-	0	0.936	+1.001	+1.008	+1.68
Q ($\mu\text{L}/\text{min}$)	2.5			3.33	4.16			5.42			6.25
V (μL)	5		10				17.5			25	30
[NO ₂] ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.1	2				5			8		10

- *Combinación de experimentos (usando factores “teóricos”):*

Experimento	X ₁ (Caudal)	X ₂ (Volumen)	X ₃ ([RF])
1	0	0	0
2	0	-1.68	0
3	0	+1.68	0
4	-1.68	0	0
5	+1.68	0	0
6	0	0	-1.68
7	0	0	+1.68
8	1	1	1
9	1	1	-1
10	1	-1	1
11	-1	1	1
12	-1	-1	1
13	-1	1	-1
14	1	-1	-1
15	-1	-1	-1

- *Combinación de experimentos (usando factores “reales”):*

Experimento	X ₁ (Caudal)	X ₂ (Volumen)	X ₃ ([NO ₂])
1	-0.193	0	-0.017
2	-0.193	-1.68	-0.017
3	-0.193	+1.68	-0.017
4	-1.68	0	-0.017
5	+1.68	0	-0.017
6	-0.193	0	-1.68
7	-0.193	0	+1.68
8	0.936	+1.008	+1.001
9	0.936	+1.008	-1.035
10	0.936	-1.008	+1.001
11	-0.936	+1.008	+1.001
12	-0.936	-1.008	+1.001
13	-0.936	+1.008	-1.035
14	0.936	-1.008	-1.035
15	-0.936	-1.008	-1.035

- *Datos experimentales:*

Orden del experimento	Exp.	X ₁ (Caudal)	X ₂ (Volumen)	X ₃ ([NO ₂])	t iny. (s)	t limp. (s)	t ₄ (s)
6	1	4.16	17.5	5	4,2	50,8	60
7	2	4.16	5	5	1,2	53,8	60
8	3	4.16	30	5	7,2	47,8	60
9	4	2.5	17.5	5	7,0	88,0	100
10	5	6.25	17.5	5	2,8	32,2	40
1	6	4.16	17.5	0.1	4,2	50,8	60
15	7	4.16	17.5	10	4,2	50,8	60
11	8	5.42	25	8	4,6	36,4	46
2	9	5.42	25	2	4,6	36,4	46
12	10	5.42	10	8	1,8	39,2	46
13	11	3.33	25	8	7,5	62,5	75
14	12	3.33	10	8	3,0	67,0	75
3	13	3.33	25	2	7,5	62,5	75
4	14	5.42	10	2	1,8	39,2	46
5	15	3.33	10	2	3,0	67,0	75

Las condiciones de las experiencias se han considerado limitadas por las condiciones que dan un mayor tiempo a recuperar la línea base. Y por ello siempre se definen las secuencias de análisis con el tiempo máximo de trabajo para cada caudal.

- *Resultados obtenidos:*

Experimento	X₁ (Caudal)	X₂ (Volumen)	X₃ ([RF])	Absorbancia
1	-0.193	0	-0.017	0,133
2	-0.193	-1.68	-0.017	0,029
3	-0.193	+1.68	-0.017	0,181
4	-1.68	0	-0.017	0,156
5	+1.68	0	-0.017	0,131
6	-0.193	0	-1.68	0,015
7	-0.193	0	+1.68	0,283
8	0.936	+1.008	+1.001	0,313
9	0.936	+1.008	-1.035	0,070
10	0.936	-1.008	+1.001	0,100
11	-0.936	+1.008	+1.001	0,311
12	-0.936	-1.008	+1.001	0,115
13	-0.936	+1.008	-1.035	0,088
14	0.936	-1.008	-1.035	0,032
15	-0.936	-1.008	-1.035	0,034
Replicados del punto central				
1.1	-0.193	0	-0.017	0,133
1.2	-0.193	0	-0.017	0,132
1.3	-0.193	0	-0.017	0,130
1.4	-0.193	0	-0.017	0,131
1.5	-0.193	0	-0.017	0,130
1.6	-0.193	0	-0.017	0,133
1.7	-0.193	0	-0.017	0,131
1.8	-0.193	0	-0.017	0,133

Anexo II: *Protocolo general de utilización del equipo Protolaser®*

La guía rápida mostrada a continuación contiene la información general de utilización del equipo Protolaser®. Siguiendo a la guía rápida se encuentra cada paso detallado.

1. Guía rápida de encendido del equipo

1. Encender el compresor.
2. Abrir la línea de aire.
3. Encender el sistema de secado de aire.
4. Activar la llave de encendido general de Protolaser.
5. Activar el botón *START* de Protolaser (password: useruser)
6. Encender el equipo de aspiración
7. Comprobar que el botón *START* está iluminado
8. Abrir el software *Protolaser 200 (Microline)*.
10. Enviar el cabezal a posición pausa y minimizar el programa.
12. Girar la llave del láser de la posición 0 a 1.
13. Pulsar el icono *Shutter Open* (en la pantalla o en el frontal de Protolaser).
14. Esperar 10 minutos para calentamiento de láser. Pasados los 10 minutos, comprobar que el botón *START* está encendido.
15. Microline: import→file→*.plt. El cabezal láser bajará hasta la posición de trabajo.

1. Encendido de los equipos auxiliares

- 1.1. Encender el compresor (girando el interruptor blanco situado en el lateral izquierdo del compresor).
- 1.2. Abrir la línea del aire (llave roja situada entre el compresor y el Protolaser).
- 1.3. Encender el sistema de secado de aire (interruptor verde del módulo BOGE).
- 1.4. Activar la llave de encendido general del Protolaser (girar 90° llave circular roja en la parte frontal del equipo).
- 1.5. Activar botón *START* de Protolaser (botón azul en la parte superior derecha del equipo). En este momento se encenderá el PC y el láser (se puede comprobar abriendo el compartimiento inferior del equipo). Password: useruser.
- 1.6. Encender el limpiador de filtros (módulo auxiliar a la derecha del Protolaser), apretando y girando el botón central sobre el cual hay una luz naranja parpadeando). Después de encendido, la luz es de color verde.

2. Encendido del equipo láser

- 2.1. Encender el software Protolaser 200 (Microline). Mientras que esté esta posición, aparecerán mensajes de error que indican que no se puede mover el láser: decir OK y apretar el botón *START*.
- 2.2.1. Enviar el cabezal a la posición *PAUSA* para que se pueda bajar el láser.
- 2.3. Iniciar *CONTROLLER CONSOLE*, que marca el estado del láser. En este diálogo van apareciendo las órdenes que se han de seguir. Son las siguientes:
 - 2.3.1. Girar la llave del láser.
 - 2.3.2. Apretar el icono *SHUTTER OPEN* (en la consola) o bien el botón verde en la puerta del láser. El botón parpadeará durante los 10 minutos de calentamiento del láser; después se quedará permanentemente iluminado. Si a partir de este calentamiento, en algún momento, el láser deja de funcionar durante más de 5 minutos, será necesario volver a pulsar este botón para que el equipo se recaliente. En esta ocasión, sin embargo, tan sólo requerirá de 20 segundos.
- 2.4. En Protolaser 100: Extras→Settings→Conversión TAB→Offset Z: 191.3 mm. Este valor está evaluado para permitir un buen mecanizado de la cerámica. Indica la distancia entre el punto más alto en el que se puede situar el láser, y el que se escoge como punto de trabajo. Tiene un margen de error de unos 100 µm. Esta altura es válida cuando se sitúa la cerámica

justo encima del *honeycomb* (sustrato polimérico sacrificial). Si el sustrato es más grueso o se coloca encima de cualquier otra capa sacrificial, debe tenerse en cuenta el grosor de ambos y restarlo de la altura 191.3 mm, para hacer que el cabezal láser suba más y no quemé en exceso el material. Existe un material polimérico poroso de 5 mm de espesor que es muy útil como capa sacrificial. En este caso, la altura predefinida sería de 186.3 mm.

2.5. Si el equipo láser tiene el botón *START* encendido (permanentemente iluminado), en el momento de importar un fichero *.plt (ver siguiente punto), el cabezal bajará automáticamente a su posición de trabajo (191.3 mm por defecto).

3. Situación del sustrato y mecanizado láser (con *Microline*)

3.1. Import→File (tendrán extensión: *.plt). Durante el proceso de importación pueden aparecer diálogos en los que se advierte sobre la apertura de la puerta. Se puede ir diciendo *OK* hasta que vayamos a mecanizar, momento en el cual se deberá apretar *START* (el botón dejará de parpadear).

3.2. Edit→Center: sirve para centrar el diseño en medio del área de trabajo.

3.3. Producción→Show limits (ctrl+L): el láser marca sobre la mesa de trabajo el área que ocupa el motivo a mecanizar. De esta manera se puede situar la cerámica (o el material que sea) en la zona iluminada. Toda la zona de la mesa de trabajo (*honeycomb*) debería estar tapada (con papel de filtro o otro sustrato poroso) para bien sujeta.

3.4. Producción→Only selected: si esta opción está activada, tan sólo los motivos seleccionados por el usuario serán mecanizados. Si no hay nada seleccionado, el láser no hará nada.

3.5. Encender el limpiador de filtros: regular la intensidad de aspiración.

3.6. Cerrar la cabina y pulsar *START*.

3.7. Production→Single (ctrl+S): para iniciar el mecanizado. El programa que se abre por defecto contiene ciertos parámetros de potencia, velocidad y frecuencia que ya son aptos para el mecanizado de la cerámica en verde. Los parámetros pueden alterarse en la parte de la derecha de la pantalla en *MASK*. En *ENTITY INFO (Mark loop count)* pueden indicarse el número de *runs* que se desea realizar con los mismos parámetros.

4. Conversión de archivos con *CIRCUIT CAM*.

4.1. Una vez se tengamos las capas en *.dxf:

a) File→New→Protolaser.cat.

b) File→Import→*.dxf.

c) Se abre un diálogo en el cual se han de escoger las siguientes opciones:

- File type: DXF
- Layer: Bottom layer
- List of aperture: DXF mm unit

Deseleccionamos la opción que aparece a la izquierda del diálogo “Dxf-import: filled circles”.

d) Se selecciona todo el dibujo con el mouse.

e) En los diálogos de la parte superior de la pantalla se escogen las siguientes opciones:

- Protolaser_Top: Contour
- HPGL Pens
- Protolaser Beam 0.025 mm

f) Esc.

g) File→Export→HP-GL→Protolaser-HPGL.

h) Save.

i) Aparece un mensaje informando de que el archivo *.plt ha sido exportado.

h) Cerramos la pantalla de la capa para poder importar otra nueva. A la pregunta que aparece sobre si se desea guardar el archivo *.cam, contestar “NO”.

5. Apagado del equipo

5.1. Comprobar que el equipo láser tenga el botón *START* encendido, apagamos el software Protolaser 200 (Microline). Con ello, el cabezal volverá a su posición $z=0$, muy lentamente. Se puede guardar el trabajo si se desea. Si se han modificado parámetros de trabajo, también quedará guardado.

5.2. Pulsar *SHUTTER CLOSE* en la consola.

5.3. Girar llave del láser.

5.4. Cerrar consola (*EXIT*).

5.6. Apagar Windows.

5.7. Apagar filtro.

5.8. Apagar interruptor principal de la máquina.

5.9. Apagar compresor.

5.10. Cerrar llave de aire (roja).

5.11. Apagar módulo BOGE.

