



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Diseño, construcción y evaluación de
analizadores miniaturizados para su
aplicación aeroespacial,
medioambiental, alimentaria,
biomédica e industrial**

Antonio Calvo López

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorat en Química

Dirigida por Julián Alonso Chamarro

**Departament de Química
Facultat de Ciències**

2017

Memòria presentada per aspirar al Grau de Doctor per

Antonio Calvo López

Vist i plau

Julián Alonso Chamarro
Catedràtic de Química Analítica

Bellaterra, 6 de Juny de 2017

Financiación

El trabajo descrito en la presente tesis ha sido posible gracias a las siguientes fuentes de financiación tanto públicas como privadas:

Beca predoctoral para Personal Investigador en Formación (PIF). Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). 1/10/2010 - 30/09/1014.

Nuevas plataformas microfluídicas para la miniaturización de sistemas (bio)analíticos integrados e intensificación de procesos de producción de nanomateriales (CTQ2009-12128). Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) con cofinanciación FEDER. 14/09/2009 - 14/09/2012.

Miniaturización, integración y paralelización de ensayos químicos y biológicos mediante nuevas plataformas de microfluídica (CTQ2012-36165). Ministerio de Economía y Competitividad con cofinanciación FEDER 01/02/2013 - 31/01/2016.

Convocatòria de suport als Grups de Recerca de Catalunya. Grup de Sensors i Biosensors (2009 SGR0323). Conselleria d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya. 25/09/2009 - 30/04/2014.

Ajuts per donar suport a les activitats dels Grups de Recerca. Grup de Sensors i Biosensors (2014 SGR 837). Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya. 01/01/2014 - 31/12/2016.

Preliminary definition of on-line chemical water quality analysis equipment (TEC-MMG/2010/20). European Space Agency (ESA). 04/02/2011 - 03/08/2012.

On line ammonium analysis for water recycling systems (CO215271-EA-OF-0001-OLAA.). European Space Agency (ESA). 27/03/2015 - 26/03/2017.

Desarrollo de un prototipo industrial de una plataforma tecnológica de (bio)sensores para la medida de (bio)marcadores de interés clínico en sangre. Global Health Home Devices SL. 16/04/2015 - 30/06/2017.

Publicaciones

El trabajo descrito en la presente tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Antonio Calvo-López, Eva Arasa-Puig, Mar Puyol, Joan Manel Casalta, Julián Alonso-Chamarro. **Biparametric potentiometric analytical microsystem for nitrate and potassium monitoring in water recycling processes for manned space missions.** *Anal. Chim. Acta*, **804**, 190–196 (2013). doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.013.

Antonio Calvo-López, Oriol Ymbern, Mar Puyol, Joan Manel Casalta, Julián Alonso-Chamarro. **Potentiometric analytical microsystem based on the integration of a gas-diffusion step for on-line ammonium determination in water recycling processes in manned space missions.** *Anal. Chim. Acta*, **874**, 26–32 (2015). doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.038.

Antonio Calvo-López, Oriol Ymbern, David Izquierdo, Julián Alonso-Chamarro. **Low cost and compact analytical microsystem for carbon dioxide determination in production processes of wine and beers.** *Anal. Chim. Acta* **931**, 64–69 (2016). doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.010.

Antonio Calvo-López, Mar Puyol, Julián Alonso-Chamarro. **Multiparametric COC-based analytical microsystem for potentiometric determination of nitrate, chloride and potassium ions in water recycling processes in manned spacecrafts.** en: 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, San Antonio, Texas, USA, 2014, pp. 1921-1923.

Antonio Calvo-López, Mar Puyol, Joan Manel Casalta, Julián Alonso-Chamarro. **Multi-parametric polymer-based potentiometric analytical microsystem for future manned space missions.** *Anal. Chim. Acta* (Enviado a la revista).

Antonio Calvo-López, Oriol Ymbern, Mar Puyol, Julián Alonso-Chamarro. **Autonomous, automated and highly versatile analytical microsystem for ammonium monitoring in different aqueous samples.** *Anal. Chim. Acta* (En preparación).

Antonio Calvo-López, Oriol Ymbern, Mar Puyol, Julián Alonso-Chamarro. **Automatic and autonomous analytical microsystem with optical determination of soluble reactive phosphorous in wastewater treatment plants.** *Anal. Chim. Acta* (En preparación).

Participación en otras publicaciones relacionadas con este trabajo y en colaboración con otros proyectos son:

Oriol Ymbern, Natalia Sánchez., Antonio Calvo-López, Mar Puyol, Julian Alonso-Chamarro. **Gas diffusion as a new fluidic unit operation for centrifugal microfluidic platforms.** *Lab Chip* **14**, 1014–1022 (2014). doi: 10.1039/c3lc51114f

Ymbern, O., Berenguel-Alonso, M., Calvo-López, A., Gómez-de Pedro, S., Izquierdo, D. & Alonso-Chamarro, J. **Versatile lock and key assembly for optical measurements with microfluidic platforms and cartridges.** *Anal. Chem.* **87**, 1503–1508 (2015). doi: 10.1021/ac504255t

Comunicaciones en congresos

El trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis ha sido presentado en diversos congresos tanto de ámbito nacional como internacional:

“Biparametric potentiometric analytical microsystem based on LTCC technology with simultaneous detection of nitrate and potassium in treated waters”, XVI Transfrontier Meeting - Sensors and Biosensors, Toulouse, Francia. Septiembre 2011 (Oral).

“Analytical on-line microsystem based on polymer technology with gas-diffusion membrane and ammonium potentiometric detection”, III International Workshop on Analytical Miniaturization and NANOTECHNOLOGIES, Barcelona, España. Junio 2012 (Póster).

“Continuous flow analytical microsystem for ammonium determination incorporating a gas-diffusion membrane and potentiometric detection”, 8th Ibero-American Congress on Sensors (Ibersensor 2012), Puerto Rico, Puerto Rico. Octubre 2012 (Póster).

“Development of a Gas-Diffusion Flow Injection System for the Determination of Carbon Dioxide in Seawater Samples”, XVIII Transfrontier Meeting - Sensors and Biosensors, Alès, Francia. Septiembre 2013 (Póster).

“Analytical microsystem with gas-diffusion step for the optical determination of carbon dioxide in wine and beer samples”, XII Eurotrode - Conference on optical chemical sensors and biosensors, Atenas, Grecia. Abril 2014 (Póster).

“Development of miniaturized analyzers, using green tape ceramics and polymer technology, for environmental, food and industrial applications”, Jornades doctorals 2014, Bellaterra, España. Mayo 2014 (Oral).

“Analytical microsystem with gas-diffusion step for the optical determination of carbon dioxide in wine and beer samples”, Jornades doctorals 2014, Bellaterra, España. Mayo 2014 (Póster).

“Analytical microsystem integrating a membrane separation unit for on-line ammonium determination in manned aerospace missions”, 9th ESA round table on micro and nano technologies for space applications, Lausana, Suiza. Junio 2014 (Póster).

“Green Tape Ceramics as suitable material for the development of analytical microsystems in space applications”, 9th ESA round table on micro and nano technologies for space applications, Lausana, Suiza. Junio 2014 (Póster).

“COC-based analytical microsystem with potentiometric detection of multiple parameters for space applications”, 19th Transfrontier Meeting of Sensors and Biosensors, Bellaterra, España. Septiembre 2014 (Póster).

“Development of analytical microsystems for space applications”, 9th Ibero-american congress on sensors (IBERSENSOR), Bogotá, Colombia. Octubre 2014 (Oral).

“Multi-parametric COC-based potentiometric analytical microsystem with miniaturized fluid control elements for aerospace applications”, 9th Ibero-american congress on sensors (IBERSENSOR), Bogotá, Colombia. Octubre 2014 (Póster).

“Photometric analytical microsystem with gas-diffusion step for the monitoring of carbon dioxide in seawater”, 9th Ibero-american congress on sensors (IBERSENSOR), Bogotá, Colombia. Octubre 2014 (Póster).

“Multiparametric COC-based analytical microsystem for potentiometric determination of nitrate, chloride and potassium ions in water recycling processes in manned spacecrafts”, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), San Antonio, Texas, EEUU. Octubre 2014 (Póster).

“COC-based analytical microsystem with spectrophotometric determination of phosphate ion in wastewater”, 20th Transfrontier Meeting of Sensors and Biosensors, Perpiñán. Septiembre 2015 (Póster).

“Photometric determination of phosphate ion in wastewater by an automatic analytical microsystem”, EUROPT(R)ODE XIII - Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors, Graz, Austria. Marzo 2016 (Póster).

“Biomedical point-of-care microanalyzer for potentiometric determination of ammonium ion in blood”, 22nd Transfrontier Meeting of Sensors and Biosensors, Barcelona, España. Septiembre 2016 (Póster). Premio al mejor poster.

“Point-of-care microanalyzer for ammonium determination in blood of patients with diseases in the urea cycle”, 10th Ibero-american Congress on Sensors, Valparaíso, Chile. Octubre 2016 (Póster).

“Robust and versatile microanalyzer for on-line ammonium determination in water treatment processes”, 10th Ibero-american Congress on Sensors, Valparaíso, Chile. Octubre 2016 (Póster).

Agradecimientos

El contenido de la presente tesis ha podido realizarse gracias a la colaboración de:

Ignasi Villarroya y Josep Maria Paulís del Servei d'Anàlisi Química (SAQ) de la Universitat Autònoma de Barcelona, España.

Raquel Palencia y M^a Ángeles Benítez del Laboratori d'Ambient Controlat (Sala blanca) de la Universitat Autònoma de Barcelona, España.

Maria Owen y Nicola de la empresa Gwent Group, Newport, Reino Unido.

Christophe Lasseur, Pierre Rebeyre y Brigitte Lamaze del European Space Research and Technology Centre (ESTEC) (Noordwijk, Países Bajos), perteneciente a la Agencia Espacial Europea (ESA).

Javier García, Adrián Castellanos, Jaume Solè y Oscar Maroto de la empresa SENER, Cerdanyola del Vallès, España.

Marià Pérez de la empresa Catalonia Adventures, Sant Sadurní d'Anoia, España.

Javier Torras, Pedro Vinuesa, Jordi Cardona y Jordi Martín de la empresa Leventon, Sant Esteve Sesrovires, España.

Carolina Arnau, Vanessa García y su grupo que trabajan en la planta piloto MELiSSA, UAB, España.

Dolors Montlló de la empresa EVONIK, Granollers, España.

Rafael Artuch y su equipo del Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, España.

Ana Blasco de la estación depuradora de aguas residuales de Guardamar del Segura, Alicante, España.

Agradecimientos

No querría dejar pasar esta ocasión sin acordarme de todos los miembros del GSB con los que, en un momento u otro, he compartido algún instante a lo largo de esta etapa de mi vida. En concreto, a dos de las personas que directa e indirectamente han tenido una relevancia especial en el devenir del trabajo que recoge esta tesis. Sus nombres son Eva Arasa y Oriol Ymbern. Ellos me introdujeron en el mundo de las cerámicas verdes y los polímeros, respectivamente, y con ellos di los primeros pasos en estos emocionantes campos. Una parte de esto también es vuestra.

Destacar, también, a Miguel Berenguel, Pedro Couceiro, Natàlia Sáñez, Sara Gómez, Cynthia Martínez, Álex Nofuentes, Xavi Canalias, Mariona Boronat, Jose Muñoz, Raquel Montes y Mar Puyol, con los que he compartido momentos de aprendizaje, de sufrimiento y satisfacciones, tanto dentro como fuera de las cuatro paredes del laboratorio.

Dar las gracias, especialmente, a Julian Alonso, por haber sabido ver en mí el potencial necesario en aquellos momentos en los que aún no sabía qué dirección tomaría mi vida y por reclutarme para formar parte de un gran grupo de investigación. Gracias por enseñarme que la ciencia va despacio pero va.

Finalmente, agradecer a mis padres todo el apoyo que me han proporcionado a lo largo de mi vida y que, de una manera u otra, me ha permitido llegar hasta este punto, desde donde escribo estas líneas.

Por último, agradecer a Maria todo el apoyo, siempre incondicional, y su aliento en los momentos menos buenos. Sin ti todo sería más complicado...

Abreviaturas y acrónimos

% CV	Porcentaje del coeficiente de variación
§	Capítulo o Sección
γ	Coeficiente de actividad
ϵ	Coeficiente de absortividad molar
μSA	Microsistema analítico
μTAS	Microsistema de análisis total
12-MPA	Ácido 12-molibdofosfórico
A o Abs	Absorbancia
a_i	Actividad del ión i
BBPA	Adipato de bis(1-butilpentilo)
BP	Bomba peristáltica
BS	Bomba solenoide
BTB	Azul de bromotimol
c	Concentración
CAD	Diseño asistido por ordenador
CAM	Fabricación asistida por ordenador
CI	Cromatografía iónica
COC	Copolímero de Olefina Cíclica
Ct.	Constante
DAQ	Tarjeta de adquisición de datos
DCU	Desordenes en el ciclo de la urea
Déc.	Década de concentración
DIC	Carbono Inorgánico Disuelto
DOS	Sebacato de bis(2-etilhexilo)
E	Potencial

EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESA	Agencia Espacial Europea
ESI	Electrodo Selectivo de Iones
F	Filtración
FIA	Análisis por inyección en flujo
FRP	Fósforo reactivo particulado
FRS	Fósforo reactivo soluble
FRT	Fósforo reactivo total
GSB	Grupo de Sensores y Biosensores
GTF	Grupo de tecnologías Fotónicas
HDT/B	Temperatura de deflexión térmica
I	Fuerza iónica
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente
IPCC	Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático
ISS	Estación Espacial Internacional
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
$K_{i,j}^{pot}$	Coefficiente de selectividad potenciométrico
KtpClPB	Tetrakis(4-colorofenil) borato de potasio
L	Longitud
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LED	Diodo emisor de luz
LIRL	Límite inferior de respuesta lineal
LOC	Lab on a chip
LSRL	Límite superior de respuesta lineal
LTCC	Low Temperature Co-Fired Ceramics
MCFA	Sistemas de análisis por inyección en flujo con multiconmutación

MELiSSA	Micro-Ecological Life Support System Alternative
MPFS	Sistemas de flujo multibomba
mS	milisiemens
NASA	Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio (EEUU)
NTU	Unidad Nefelométrica de Turbidez
O.O.	Ordenada al origen
OI	Osmosis inversa
PC	Policarbonato
PCB	Placa de circuito impreso
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMB	Azul de fosfomolibdeno
PMMA	Polimetilmetacrilato
POC	<i>Point-of-care</i>
PS	Poliestireno
PTFE	Politetrafluoroetileno o teflón
PVC	Cloruro de polivinilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Q	Caudal
R	Constante de los gases
r²	Coefficiente de correlación
Re	Número de Reynolds
RL	Rango lineal
ROSCOSMOS	Agencia Federal Espacial Rusa
SSV	Sistema de soporte vital.
t	Tiempo
T	Transductor
T12	Nitrato de tertaoctilamonio
T8	Nitrato de tridocecilmetilamonio
TAS	Sistema de análisis total
TBD	Por determinar

Abreviaturas y acrónimos

TEHP	Fosfato de tris(2-etilhexilo)
T_g	Temperatura de transición vítrea
THF	Tetrahidrofurano
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano
UTO	Unidad de tratamiento de orina
V o VS	Válvula solenoide
VI	Volumen de inyección
z_i	Carga del ión i

Abstract

The high demand for real-time, on-site and quality information to monitor multiple (bio)chemical parameters in areas such as aerospace, environmental, industrial, food or biomedical has promoted the development of an analytical instrumentation with a high level of integration, miniaturization and automation. In this way, the so-called total analysis microsystems (μ TAS) or Lab-on-a-Chip (LOC) have appeared.

Thus, the main objective of this thesis is the development of automated microanalyzers, using LTCC and polymer technologies, for the determination, using potentiometric and optical measurements, of different chemical parameters in selected applications, where miniaturization is a must to address the problem.

For this purpose, different analytical microsystems have been designed, constructed and evaluated where different essential unit operations to carry out the analytical procedure have been integrated.

First of all, three analytical devices have been developed in the framework of two projects funded by the European Space Agency (ESA) with the aim of developing analyzers to monitor the water recycling process and its quality in long-term manned space missions. The first one is a robust potentiometric microanalyzer, based on LTCC technology, to simultaneously monitor the presence of potassium and nitrate ions using the FIA technique. The microdevice monolithically integrates the microfluidics and the detection system, based on two ISEs, one for potassium and the other one for nitrate, and a screen-printed Ag/AgCl reference electrode. The second one improves the performance of the first device and consists of a microanalyzer, made of COC, for the simultaneous monitoring of potassium, chloride and nitrate ions. This new device minimizes the chloride interference on the nitrate electrode and miniaturizes and automates the fluid management system incorporating micropumps and microvalves. The last one is a robust and highly selective potentiometric microanalyzer fabricated in COC for the determination of ammonium ion. It integrates the microfluidics, a gas-diffusion module and the detection system into a single monolithic substrate. The gas-diffusion module is composed of a hydrophobic PVDF membrane and the potentiometric detection system consists of an ammonium ion selective electrode and a screen-printed Ag/AgCl reference electrode.

The latter device has also been applied to the analysis of ammonia in aqueous samples of diverse origin (drinking water and wastewater from WWTPs, both

urban and industrial) and in blood and plasma samples of patients diagnosed with disorders in the urea cycle. Another developed analytical microsystem, made of COC, incorporates a gas-diffusion step for the spectrophotometric determination of CO₂ using a colorimetric acid-base indicator. The small size of the device, coupled with the reduced size and simplicity of the detection system, give a high portability to the overall system. It has been applied to CO₂ analysis in wine and beers and for the monitoring of ocean acidification.

Finally, an autonomous and automated analytical microsystem has been developed for spectrophotometric determination of phosphate in wastewater. The microanalyzer, made of COC, integrates a miniaturized optical detection system and an automatic fluid management system that give it portability and autonomous operation capacity.

All microsystems developed have shown excellent analytical features, fulfilling the requirements of the applications for which they were designed and demonstrating the potential of miniaturization in analytical systems.

Resumen

La gran demanda de información en tiempo real, in situ y de calidad, para llevar a cabo el control y la monitorización de múltiples parámetros (bio)químicos en ámbitos como el aeroespacial, medioambiental, industrial, alimentario o biomédico, ha fomentado en los últimos años el desarrollo de instrumentación analítica con un alto nivel de integración, miniaturización y automatización. De esta manera, han aparecido los denominados microsistemas de análisis total (μ TAS) o *Lab-on-a-Chip* (LOC).

Así, el trabajo realizado en esta tesis tiene como objetivo principal el desarrollo de microanalizadores automatizados, usando las tecnologías LTCC y de polímeros, para la determinación, mediante medidas potenciométricas y ópticas, de diversos parámetros químicos, en aplicaciones seleccionadas, donde la miniaturización es condición indispensable para poder abordar el problema.

Para ello, se han diseñado, construido y evaluado microsistemas donde se han integrado diferentes operaciones unitarias del procedimiento analítico, imprescindibles para la realización de este.

Así, en primer lugar se presentan tres dispositivos analíticos desarrollados en el marco de dos proyectos financiados por la Agencia Espacial Europea (ESA) con el objetivo de desarrollar analizadores para monitorizar el proceso de reciclado de agua, y la calidad de esta, en misiones espaciales tripuladas de larga duración. El primero de ellos es un microanalizador potenciométrico robusto, basado en la tecnología LTCC, para monitorizar simultáneamente la presencia de iones potasio y nitrato usando la técnica FIA. El microdispositivo integra, monolíticamente, la microfluídica y el sistema de detección, basado en dos ESIs de membrana polimérica, uno para potasio y otro para nitrato, y un electrodo de referencia de Ag/AgCl serigrafiado. El segundo de ellos, mejora las prestaciones del primero y consiste en un microanalizador, fabricado en COC, para la monitorización simultánea de iones potasio, cloruro y nitrato. Este nuevo dispositivo minimiza la interferencia de cloruro sobre el electrodo de nitrato y miniaturiza y automatiza el sistema de gestión de fluidos incorporando microbombas y microválvulas. El último de ellos es un microanalizador potenciométrico robusto y altamente selectivo fabricado en COC para la determinación de ión amonio. Este integra la microfluídica, un módulo de difusión gaseosa y el sistema de detección en un único sustrato monolítico. El módulo de difusión gaseosa lo compone una membrana hidrófoba de PVDF y el sistema de detección potenciométrico está formado por un

electrodo selectivo de ión amonio de membrana polimérica y un electrodo de referencia de Ag/AgCl serigrafiado.

También se ha aplicado este último dispositivo al análisis de amonio en muestras acuosas de diversa procedencia (agua de red de distribución y aguas residuales de EDARs, tanto urbanas como industriales) y en muestras de sangre y plasma de pacientes diagnosticados de desordenes en el ciclo de la urea.

Otro de los microsistemas analíticos desarrollados, fabricado en COC, incorpora una etapa de difusión gaseosa para la determinación espectrofotométrica de CO₂ utilizando un indicador ácido-base colorimétrico. El tamaño reducido del microsistema analítico, unido al tamaño reducido y a la simplicidad del sistema de detección, dotan al equipo global de una gran portabilidad. Se ha aplicado al análisis de CO₂ en vino y cervezas y para la monitorización de la acidificación oceánica.

Por último, se ha desarrollado un microsistema analítico autónomo y automatizado para la determinación espectrofotométrica de fosfato en aguas residuales. El microanalizador, fabricado en COC, integra un sistema de detección óptica miniaturizado y un sistema de gestión de fluidos automático que le dota de portabilidad y capacidad de funcionamiento autónomo.

Todos los microsistemas desarrollados han mostrado unas características analíticas excelentes, cumpliendo los requisitos de las aplicaciones para las que fueron diseñados y demostrando la potencialidad de la miniaturización en los sistemas analíticos.

Índice de contenidos

FINANCIACIÓN	i
PUBLICACIONES	iii
COMUNICACIONES EN CONGRESOS	v
AGRADECIMIENTOS	vii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	ix
ABSTRACT	xiii
RESUMEN	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Miniaturización en química analítica	3
1.1.1. Plataformas microfluídicas	6
1.1.2. Integración de operaciones unitarias básicas	8
1.1.2.1. Introducción de reactivos y muestra	9
1.1.2.2. Gestión de fluidos	11
1.1.2.3. Pre-tratamiento de la muestra	13
1.1.2.4. Sistemas de detección	14
1.1.2.4.1. Métodos electroquímicos	15
1.1.2.4.2. Métodos ópticos	20
1.2. Materiales utilizados en la construcción de microsistemas	24
1.2.1. Polímeros	24
1.2.1.1. Copolímero de Olefina Cíclica (COC)	26
1.2.2. Cerámicas verdes o <i>Low Temperature Co-Fired Ceramics</i> (LTCC)	28
1.3. Tecnologías de microfabricación	31
1.3.1. Técnicas de microestructuración	31
1.3.2. Técnicas de integración de electrodos	33
1.3.3. Técnicas de sellado	34
1.4. Áreas y campos de aplicación de los microsistemas	35
1.5. Referencias	36
2. OBJETIVOS	49
3. METODOLOGÍAS DE MICROFABRICACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS ANALÍTICOS	51

3.1. Tecnología de cerámicas verdes o LTCC	52
3.1.1. Diseño	53
3.1.2. Micromecanizado	55
3.1.3. Serigrafiado	56
3.1.4. Laminación multicapa	57
3.1.5. Proceso de sinterización	59
3.1.6. Integración de otros componentes	60
3.2. Tecnología de polímeros sobre sustrato de Copolímero de Olefina Cíclica (COC)	60
3.2.1. Diseño	61
3.2.2. Micromecanizado	63
3.2.3. Integración de otros componentes	64
3.2.4. Proceso de laminación	65
3.2.5. Dispositivo final	67
3.3. Referencias	68
4. MICROSISTEMAS PARA LA MONITORIZACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD EN PROCESOS DE RECICLADO DE AGUA EN MISIONES ESPACIALES TRIPULADAS	71
4.1. Microsistema potenciométrico biparamétrico para la monitorización de iones potasio y nitrato	73
4.1.1. Materiales y reactivos	74
4.1.2. Montaje experimental	76
4.1.3. Diseño y optimización del microsistema analítico	76
4.1.3.1. Configuración de las cámaras de detección	78
4.1.3.2. Integración de los electrodos indicadores y de referencia	79
4.1.3.3. Optimización del proceso de deposición de membrana	81
4.1.3.4. Evaluación de las variables químicas e hidrodinámicas	83
4.1.4. Características analíticas del sistema	88
4.1.5. Análisis de muestras reales	91
4.1.6. Conclusiones	92
4.2. Microsistema potenciométrico automatizado multiparamétrico para la monitorización de iones potasio, nitrato y cloruro	93
4.2.1. Materiales y reactivos	94
4.2.2. Montaje experimental	95
4.2.3. Diseño y optimización del sistema analítico	96

4.2.3.1. Integración del electrodo de Ag/AgCl como electrodo indicador y de referencia	98
4.2.3.2. Optimización del proceso de deposición de membrana	103
4.2.3.3. Evaluación de variables químicas e hidrodinámicas	104
4.2.4. Sistema de flujo automatizado	107
4.2.5. Características analíticas del sistema	111
4.2.6. Análisis de muestras sintéticas	115
4.2.7. Otras aplicaciones del microsistema	116
4.2.8. Conclusiones	116
4.3. Microsistema potenciométrico basado en la integración de una etapa de difusión gaseosa para la monitorización de ión amonio	117
4.3.1. Materiales y reactivos	118
4.3.2. Montaje experimental	119
4.3.3. Diseño y optimización de la plataforma microfluídica	120
4.3.3.1. Diseño del micromezclador	122
4.3.3.2. Configuración del módulo de difusión de gas	123
4.3.3.3. Integración del electrodo indicador	133
4.3.3.4. Evaluación de variables químicas e hidrodinámicas	134
4.3.4. Características analíticas del sistema	138
4.3.5. Análisis de muestras reales	140
4.3.6. Test en condiciones de microgravedad	141
4.3.6.1. Montaje experimental	142
4.3.6.2. Diseño de la plataforma microfluídica	144
4.3.6.3. Ensayos en condiciones de microgravedad	146
4.3.7. Conclusiones	150
4.4. Referencias	151
5. OTRAS APLICACIONES DEL MICROSISTEMA ANALÍTICO PARA LA MONITORIZACIÓN DE IÓN AMONIO	157
5.1. Determinación de amonio en aguas residuales, tanto industriales como urbanas, y en agua potable	158
5.1.1. Montaje experimental automatizado	158
5.1.2. Rediseño y optimización de la plataforma microfluídica y de las variables hidrodinámicas	160
5.1.3. Características analíticas del sistema	163
5.1.4. Análisis de muestras reales	167
5.1.5. Simulación de validación en campo. Test de operatividad en funcionamiento autónomo	170

5.1.6. Conclusiones	172
5.2. Determinación de amonio en sangre y plasma en pacientes diagnosticados con desordenes en el ciclo de la urea	173
5.2.1. Montaje experimental	173
5.2.2. Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas y características analíticas del sistema	174
5.2.3. Análisis de muestras reales	175
5.2.4. Conclusiones	178
5.3. Referencias	179
6. MICROSISTEMA ANALÍTICO CON ETAPA DE DIFUSIÓN GASEOSA INTEGRADA PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE DIÓXIDO DE CARBONO EN VINO Y CERVEZA	181
6.1. Materiales y reactivos	182
6.2. Montaje experimental	183
6.3. Diseño y optimización de la plataforma microfluídica	185
6.3.1. Verificación de la configuración del módulo de difusión	187
6.3.2. Configuración de la celda de flujo del sistema de detección	188
6.3.3. Evaluación de las variables químicas e hidrodinámicas	188
6.4. Características analíticas del microsistema	196
6.5. Análisis de muestras reales	198
6.6. Otras aplicaciones: monitorización de la acidificación del océano	200
6.6.1. Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas	202
6.6.2. Características analíticas del microsistema	207
6.6.3. Análisis de muestras reales	207
6.7. Conclusiones	208
6.8. Referencias	209
7. MICROSISTEMA ANALÍTICO AUTOMATIZADO PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FÓSFORO EN ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDARS)	213
7.1. Materiales y reactivos	216
7.2. Montaje experimental	217
7.3. Diseño y optimización de la plataforma microfluídica	220
7.3.1. Optimización de los micromezcladores	221
7.3.2. Evaluación de variables instrumentales, químicas e hidrodinámicas	222
7.4. Sistema de flujo automatizado	232
7.5. Características analíticas del sistema	233
7.6. Análisis de muestras reales	235

7.7. Conclusiones	237
7.8. Referencias	238
8. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	241

Capítulo 1

Introducción

La química analítica es la disciplina científica que se encarga de obtener información sobre la composición, la estructura y la naturaleza de la materia, en el espacio y en el tiempo, mediante la aplicación y el desarrollo de metodologías, estrategias e instrumentación.¹⁻³ En las últimas décadas, dicha disciplina ha experimentado una gran evolución, impulsada en gran medida por el objetivo de satisfacer la creciente demanda de información, de calidad y en tiempo real, por parte de todos los ámbitos de la sociedad.⁴ La elaboración y aprobación de legislaciones y normativas en materia medioambiental, biomédica, alimentaria e industrial, cada vez más rígidas y estrictas, unido el aumento de la demanda de productos con mayores estándares de calidad, han potenciado una importante actualización y mejora de la instrumentación analítica clásica. Parte de esta evolución se ha sustentado gracias al alto nivel de integración alcanzado por los métodos analíticos, entendiéndose como integración al hecho de unir, mediante conexiones fluidicas, las diferentes etapas del procedimiento analítico (muestreo, transporte de muestra, separación, reacción, medida, transducción y adquisición de señal y procesamiento) en un todo, con el fin de obtener características y funcionalidades que no estaban presentes en cada una de las etapas por separado.⁵⁻⁷ De esta integración, y su consiguiente conectividad, nace el concepto de sistemas de análisis total (TAS).⁸ Estos presentan numerosas ventajas con respecto a los métodos clásicos, como son la automatización de las distintas etapas del proceso analítico (hecho que minimiza la intervención de personal cualificado y el posible error asociado a dicha intervención), la robustez, la simplicidad, la reproducibilidad, la reducción del tiempo de análisis y la reducción de costes. Sin embargo, estos sistemas analíticos presentan algunos inconvenientes para satisfacer las demandas analíticas actuales, como son una reducida portabilidad, un mantenimiento frecuente y complejo, un transporte lento de la muestra, baja eficiencia de separación, necesidad de fabricar interfaces para cada uno de los distintos elementos integrados y un elevado consumo de reactivos, que se traduce en un elevado coste económico y un importante impacto medioambiental a causa de los residuos generados.^{9,10}

Para superar estos inconvenientes se recurre a la miniaturización de estos sistemas, surgiendo así los ampliamente conocidos microsistemas de análisis total

(μ TAS)^{11,12} o posteriormente llamados también Lab-on-a-Chip (LOC).¹³ Estos dispositivos se caracterizan por contener estructuras o gestionar volúmenes a escala micrométrica.⁷ El término μ TAS, acuñado por Manz y Widmer a principios de la década de los 90, abrió el camino de un nuevo campo multidisciplinar, actualmente consolidado y sobre el que se concentran gran cantidad de esfuerzos dirigidos al desarrollo de sistemas analíticos miniaturizados en ámbitos tan diversos como el análisis clínico, la monitorización medioambiental, la seguridad, la industria alimentaria y la biomedicina. Prueba de ello son las numerosas y extensas revisiones publicadas en los últimos años sobre esta temática, en las que se desgranar los continuos avances en cuanto a materiales y técnicas de microfabricación utilizadas, las diferentes etapas del proceso analítico miniaturizadas e integradas, los nuevos fenómenos aplicables a escala micrométrica para extraer información y las numerosas aplicaciones propuestas.^{14–23} Los sistemas analíticos miniaturizados presentan gran cantidad de ventajas con respecto a sus antecesores no escalados.²⁴ Su reducido tamaño, peso y consumo de energía, aumentan su portabilidad y por tanto hacen factible la realización de medidas analíticas en continuo e in situ. También se caracterizan por una alta eficiencia, robustez y rapidez de análisis. Asimismo, el concepto de miniaturización permite reducir considerablemente el consumo de reactivos y muestra y por tanto la generación de residuos, haciendo estos sistemas más ecológicos o “verdes” que los convencionales. Por su parte, el uso de técnicas de microfabricación de bajo coste, asequibles y bien consolidadas, fomenta el uso de estos dispositivos analíticos e introduce el concepto de microsistema analítico desechable, reduciendo los costes de mantenimiento y la necesidad de personal cualificado. Además, su reducido tamaño y su bajo coste de fabricación permiten el uso de enfoques de multiplexación, haciendo posible la determinación multiparamétrica simultánea en una misma muestra. Todas estas ventajas contribuyen a minimizar el coste total del proceso de análisis, permitiendo el desarrollo de un sinnúmero de sistemas personalizados y hechos bajo demanda con numerosas aplicaciones.

En este sentido, la presente tesis se enfoca al desarrollo de instrumentación analítica, que se adapte a los requisitos de las aplicaciones planteadas, aprovechando las ventajas derivadas de la integración, la simplificación, la automatización y la miniaturización de sistemas analíticos mediante técnicas de flujo en continuo con detección tanto potenciométrica como espectrofotométrica.

Con la finalidad de contextualizar la temática de la tesis, el presente capítulo introductorio se ha organizado en tres partes. La primera de ellas está destinada a la miniaturización de los sistemas analíticos, presentando conceptos básicos de microfluídica y las operaciones unitarias más frecuentes que suelen conformar un microsistema analítico. En la segunda parte se muestran los diferentes tipos de materiales utilizados para fabricar dichos dispositivos analíticos, prestando

especial atención a los utilizados para fabricar los microanalizadores que se presentaran a lo largo de la memoria. Por último, se recopilan las tecnologías de microfabricación más comúnmente utilizadas, a nivel de prototipado, para la construcción de los dispositivos.

1.1. Miniaturización en química analítica

La gran demanda de información en tiempo real, in situ y de calidad para llevar a cabo el control y la monitorización de múltiples parámetros (bio)químicos en otros tantos ámbitos, ha fomentado en los últimos años el desarrollo de instrumentación portátil, automatizada y capaz de proporcionar información fuera del entorno de los laboratorios convencionales, dando lugar al concepto de los μ TAS o LOC (Figura 1.1).

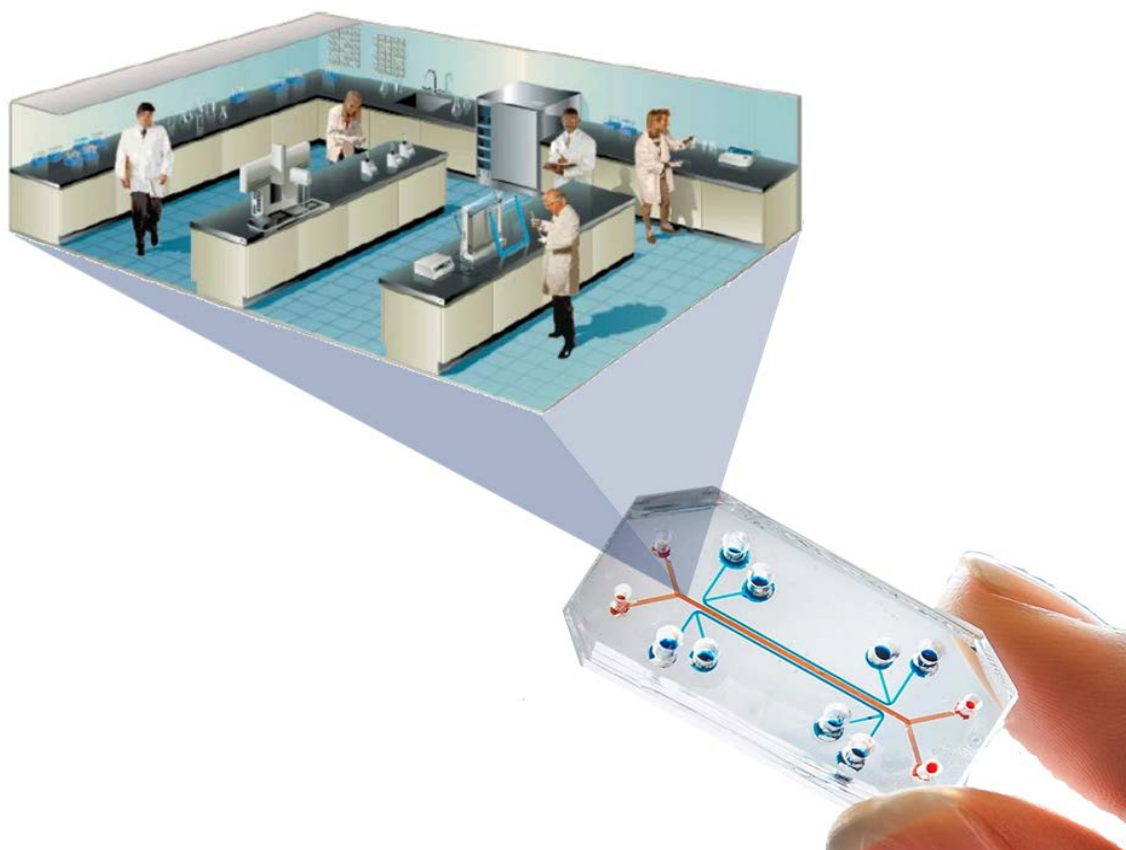


Figura 1.1. Figura ilustrativa del proceso de miniaturización e integración que permite concentrar las diferentes etapas del procedimiento analítico llevado a cabo en un laboratorio en un solo chip de reducidas dimensiones. (Imagen rediseñada y adaptada)²⁵

Estos sistemas miniaturizados, mediante la conectividad que proporcionan las plataformas microfluídicas, permiten llevar a cabo la mayor parte de las etapas del proceso analítico en estructuras de pequeñas dimensiones, obteniendo múltiples beneficios asociados a este proceso de escalado. Ventajas como la portabilidad, la

fiabilidad de los resultados, el bajo coste unitario de los análisis, el bajo consumo de reactivos y muestra, con su consiguiente limitada generación de residuos, o la explotación de los fenómenos solo viables en la escala micrométrica, resumen las potencialidades alcanzadas por este tipo de microsistemas analíticos. El origen de muchas de estas ventajas está relacionado con el comportamiento diferencial y característico de los líquidos en la microescala.²⁶ Habitualmente, a escala macroscópica, las propiedades de los fluidos están controladas por fenómenos de volumen, como fuerzas gravitacionales e inerciales. Sin embargo, a medida que disminuyen las dimensiones de los canales fluídicos, la relación área superficial/volumen crece considerablemente, por lo que a escala microscópica estos fenómenos de volumen pierden importancia, ganando preponderancia los fenómenos de superficie como la viscosidad y la tensión superficial.²⁶⁻²⁸ Los regímenes de flujo en la macro y microescala difieren, entonces, debido a la mayor influencia de la energía cinética, en el primer caso, y de la energía de fricción, en el segundo caso. En este sentido, el número de Reynolds (Re) representa la relación entre estos fenómenos. Este número adimensional viene determinado por la siguiente ecuación:

$$Re = \frac{\rho v D_h}{\eta} \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

donde ρ y η son la densidad y la viscosidad del fluido, respectivamente, v es la velocidad del fluido y D_h es el diámetro hidráulico del canal. El diámetro hidráulico del canal es un número característico que depende de la geometría de la sección transversal del canal y viene determinado por la siguiente expresión:

$$D_h = \frac{4A}{P} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

donde A y P son el área de la sección transversal y el perímetro húmedo del canal, respectivamente.²⁹

Con valores de Re altos ($Re > 2500$), el flujo está dominado por fuerzas inerciales y se caracteriza por ser turbulento.²⁴ En este contexto, el fluido presenta un movimiento que es aleatorio tanto en el espacio como en el tiempo, y hay transportes de masa convectiva en todas las direcciones (Figura 1.2.A). Sin embargo, con valores bajos de Re ($Re < 1500$) los efectos de viscosidad dominan frente a los inerciales y se produce un flujo completamente laminar. En este contexto, las capas de líquido fluyen paralelas entre sí y la velocidad en cualquier lugar dentro de estas es invariable con el tiempo (Figura 1.2.B). Esto implica que la transferencia de masa convectiva solamente se produce en la dirección del flujo y el proceso de mezcla se puede lograr sólo por difusión.^{30,31}

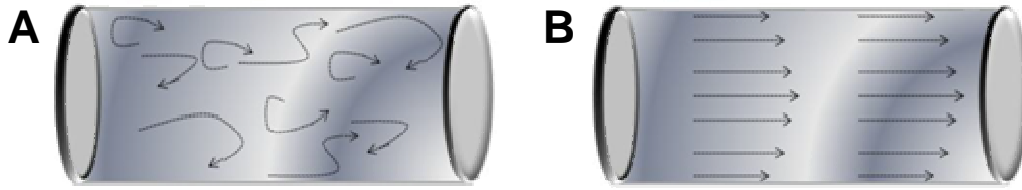


Figura 1.2. Figura mostrando el comportamiento del flujo turbulento, característico de la macroescala (A) y del flujo laminar, característico de la microescala (B), en el interior de un canal.²⁸

Habitualmente en los sistemas microfluídicos, el valor de Re es típicamente inferior a 100 y, por lo tanto, el flujo se considera esencialmente laminar.²⁷ Esta característica, como se ha comentado, tiene una consecuencia directa sobre el proceso de mezcla dentro de los dispositivos microfluídicos. Los regímenes de flujo turbulento permiten una mezcla rápida, en cambio, el proceso de mezcla en regímenes de flujo laminar es menos eficiente debido a su naturaleza difusiva entre las distintas interfases fluidicas. La difusión se define como el proceso de propagación de moléculas de una región de mayor concentración a una de menor concentración mediante movimiento browniano, lo que resulta en una mezcla gradual, considerada como un mecanismo de transporte lento macroscópicamente.^{26,27,31} Este fenómeno está descrito por la ley de Fick:

$$j = -D \frac{d\varphi}{dx} \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

donde φ es la concentración de la especie, x es la posición de la especie y D es el coeficiente de difusión.

A pesar de la falta de eficiencia de mezcla en los regímenes de flujo laminar, este se ve extraordinariamente favorecido por la reducción del tamaño. Gracias a la miniaturización de los sistemas analíticos, la sección de los canales se reduce y el tiempo de difusión también disminuye drásticamente.^{26,29,31} Así, el tiempo de difusión se puede derivar de la ley de Fick:

$$t_D = \frac{l^2}{D} \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

donde t_D es el tiempo promedio para que las partículas se difundan a lo largo de la anchura del canal l , siendo D el coeficiente de difusión.

En el ámbito de la microfluídica, la anchura del canal suele ser relativamente pequeña, haciendo que el tiempo de difusión sea extremadamente reducido. Por lo tanto, la difusión se convierte en un método factible para mover partículas y mezclar fluidos en sistemas microfluídicos.

Existen otros muchos parámetros que sirven para entender los fenómenos que rigen el comportamiento de los fluidos en la microescala, como los relacionados con

la transferencia térmica. Sin embargo, se han omitido deliberadamente en esta memoria, con el fin de aligerarla, por no tener especial relevancia en el funcionamiento de los microsistemas analíticos desarrollados.

1.1.1. Plataformas microfluídicas

Las plataformas microfluídicas son un elemento esencial en el desarrollo de dispositivos analíticos miniaturizados. Son las estructuras que permiten unir y dar conectividad, mediante canales microfluídicos, al conjunto de operaciones unitarias miniaturizadas, correspondientes a las distintas etapas del procedimiento analítico llevado a cabo en el laboratorio.^{32,33} Este conjunto de operaciones unitarias están diseñadas para poder combinarse e integrarse fácilmente en las plataformas microfluídicas, utilizándose una tecnología de fabricación bien establecida y definida. Así, en la actualidad, la microfluídica dispone de un amplio catálogo de estas operaciones unitarias, que pueden combinarse en función de las necesidades planteadas por la aplicación estudiada, con el fin de obtener múltiples soluciones en forma de μ TAS o LOC.

No obstante, las plataformas microfluídicas requieren a menudo de instrumentación externa asociada para poder ser completamente funcionales, ya que, a día de hoy, aún existen numerosas dificultades para solucionar, por ejemplo, ciertos problemas que surgen de la integración monolítica, sobre dichas plataformas, de algunos sistemas de gestión de fluidos. En este contexto, es posible clasificar las plataformas microfluídicas según el principio de propulsión que se utiliza para mover los fluidos. Así, se puede utilizar la capilaridad³⁴ o actuadores externos o integrados que muevan los fluidos mediante gradientes de presión positiva o negativa (generalmente microjeringas o microbombas tanto peristálticas como piezoeléctricas y neumáticas),^{32,35} por centrifugación,³⁶ por ondas magnéticas,³⁷ por ondas acústicas,³⁸ por la generación electroquímica de burbujas,³⁹ electrocinéticamente,⁴⁰ entre otros.^{32,41,42} En la presente tesis se han utilizado plataformas microfluídicas gestionadas por impulsión mediante gradiente de presión positiva.

Por otra parte, como es de esperar, una mezcla rápida de los distintos reactivos con la muestra es esencial en múltiples aplicaciones (bio)químicas. Según los fundamentos de la microfluídica vistos previamente, una mezcla eficiente se puede conseguir reduciendo el tamaño de los canales al orden de la decena de micras. Sin embargo, una reducción tan drástica en el tamaño de los canales no siempre es posible, debido a la propia aplicación analítica o a la dificultad que conllevaría la impulsión de los líquidos en el interior del microsistema. Por este motivo, para mejorar la mezcla en las plataformas microfluídicas, se introducen elementos mezcladores, que provocan la aparición de regímenes de flujo turbulento o un

aumento de la relación área superficial/volumen.²⁷ Estas estructuras pueden clasificarse según su naturaleza de funcionamiento en micromezcladores activos o pasivos.^{43–46}

Los mezcladores activos aprovechan el uso de partes móviles o algún tipo de energía para inducir una perturbación en el flujo. Por este motivo suelen producir una mezcla muy eficiente. Sin embargo, la necesidad de instrumentación periférica asociada, como fuentes de energía externas, y el complejo y costoso proceso de fabricación, limitan la implementación de estos tipos de micromezcladores en los dispositivos microfluídicos.²⁷ Algunos ejemplos de microanalizadores activos son los que utilizan una bomba de impulsión externa para dejar pasar uno u otro reactivo, generando un flujo segmentado (Figura 1.3.A). También se encuentran los que utilizan una fuente de presión externa para perturbar el flujo laminar propiciando una mayor mezcla (Figura 1.3.B). Otro tipo son aquellos que utilizan un microagitador para provocar un régimen de flujo turbulento (Figura 1.3.B). Por último, destacar que hay también una tipo de mezcladores activos que utilizan campos eléctricos o cambios en el voltaje aplicado para promover una mejor mezcla mediante perturbaciones electrohidrodinámicas (Figura 1.3.D), dielectroforéticas (Figura 1.3.E) o electrocinéticas (Figura 1.3.F).

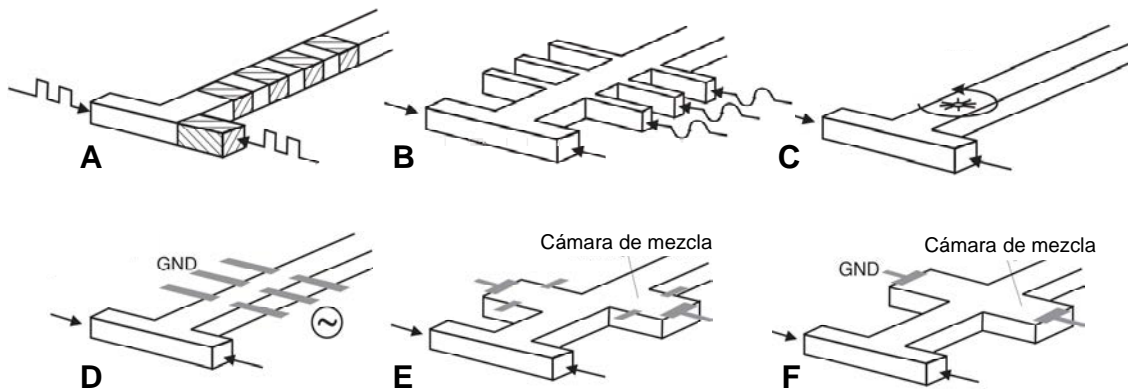


Figura 1.3. Diseños de micromezcladores activos: (A) segmentación en serie; (B) perturbación por presión a lo largo del canal de mezcla; (C) microagitador integrado en el canal de mezcla; (D) alteración electrohidrodinámica del flujo; (E) alteración dielectroforética del flujo; (F) perturbación electrocinética en la cámara de mezcla.⁴⁴

Por el contrario, los mezcladores pasivos no requieren de ninguna fuente de energía externa, ya que se basan en el uso de diferentes geometrías para conseguir una mezcla más efectiva. Ejemplos de este tipo de mezcladores son los que recurren a la reducción de la longitud de mezcla aumentando la superficie de contacto entre los fluidos a mezclarse, haciendo más eficiente la mezcla por difusión. Claros ejemplos de este tipo de mezcladores son los de laminación en paralelo (Figura 1.4.A,B y D), aumentando la eficiencia de la mezcla cuanto mayor sea el número interfases entre los fluidos. En el concepto de enfoque hidrodinámico (otra variante de laminación

en paralelo), tanto en dos como en tres dimensiones (*hydrodynamic focusing*),⁴⁷ se puede modular el flujo de las entradas laterales para crear un flujo muy estrecho en el canal central (Figura 1.4.E), hecho que favorece la rapidez de la mezcla por difusión. Por otro lado, se encuentran una serie de diseños de micromezcladores dirigidos a promover la turbulencia en los fluidos mediante geometrías especiales, ya sea mediante configuraciones en zigzag o serpentin en dos dimensiones (Figura 1.4.A,C), en tres dimensiones (Figura 1.4.F) o introduciendo obstáculos en los canales (Figura 1.4.G,H e I). Los micromezcladores basados en la generación de flujo turbulento en regímenes de flujo laminar con estructuras bidimensionales y tridimensionales son probablemente el tipo de micromezcladores pasivos más eficientes y fácilmente integrables en sistemas complejos. Por este motivo son los que se han utilizado en el desarrollo de los microsistemas construidos.

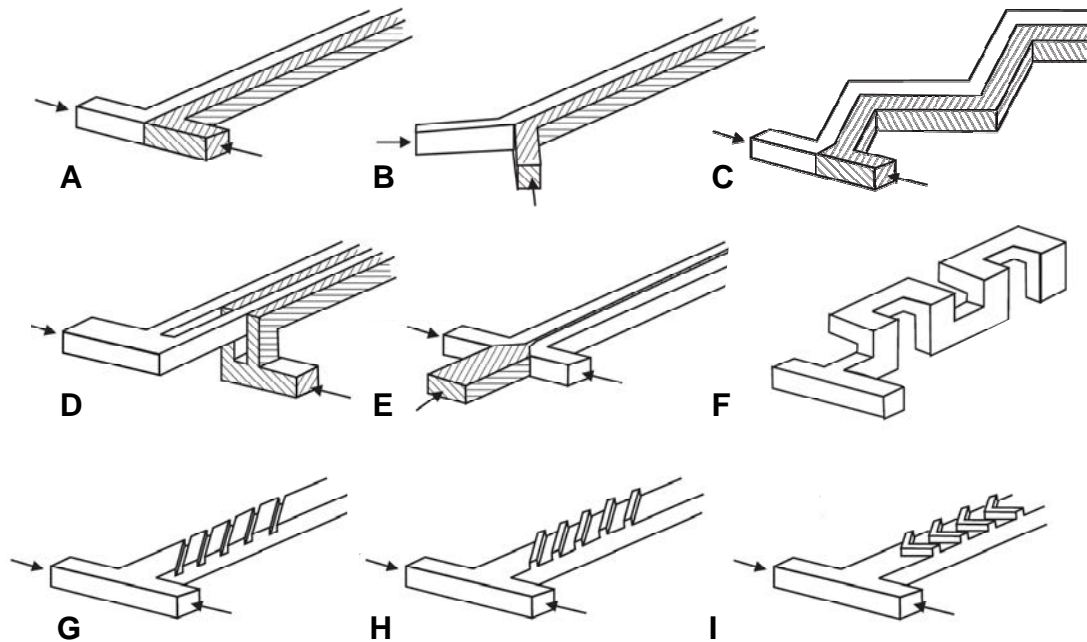


Figura 1.4. Diseños de micromezcladores pasivos: (A) básico en forma de T (laminación en paralelo); (B) básico en forma de Y (laminación en paralelo); (C) en zigzag generando flujo turbulento; (D) usando concepto de laminación en paralelo múltiple; (E) usando concepto de enfoque hidrodinámico (*hydrodynamic focusing*); (F) en forma de serpentin tridimensional; (G) usando salientes inclinados; (H) usando surcos inclinados; (I) usando ranuras en forma de espiga.⁴⁴

1.1.2. Integración de operaciones unitarias básicas

Como se ha descrito anteriormente, el desarrollo de microsistemas analíticos implica la miniaturización e integración en las plataformas microfluídicas de las diferentes etapas del procedimiento analítico, dando lugar a la aparición de las operaciones unitarias. Las más destacadas son las que se muestran en la figura 1.5.

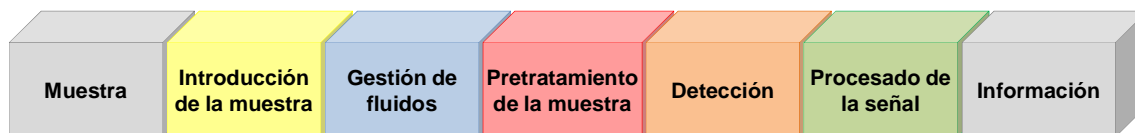


Figura 1.5. Diagrama con las principales operaciones unitarias que integran los sistemas analíticos miniaturizados.

Además de las indicadas, otras muchas operaciones unitarias pueden ser necesarias en función de la complejidad de la aplicación del microsistema analítico desarrollado. El concepto radica en que entre la muestra y la información útil que queremos obtener, existe un hueco que se puede rellenar con todos los bloques necesarios, correspondientes cada uno de ellos a una operación unitaria. Así, los μ TAS deberían incorporar como mínimo elementos para introducir y gestionar tanto muestra como reactivos a lo largo de la plataforma microfluídica, sistemas de detección y componentes electrónicos para la adquisición y procesamiento de la señal.^{7,14,30,33,43} Sin embargo, como se ha indicado con anterioridad, no siempre es posible integrar o miniaturizar todos los componentes que conforman estas operaciones unitarias. La integración de sistemas de gestión de fluidos sigue siendo un desafío, comportando algunas dificultades técnicas, al igual que ocurre con la integración de algunos sistemas de detección.^{39,48} Por este motivo, no es extraño encontrar en la bibliografía numerosos ejemplos de sistemas analíticos híbridos, donde algunos elementos no están integrados en la plataforma microfluídica, a pesar de que se hacen todos los esfuerzos posibles por miniaturizarlos.⁴⁹⁻⁵²

A continuación se describen con más detalle las operaciones unitarias básicas constituyentes de un μ TAS, algunas de las cuales están incluidas en los microanalizadores desarrollados a lo largo del presente trabajo. Estas son la introducción de los reactivos y la muestra en el microsistema analítico, la gestión de los fluidos en su interior, algunas etapas de pretratamiento de muestra y los sistemas de detección.

1.1.2.1. Introducción de reactivos y muestra

El sistema de introducción de reactivos y muestra es una de las operaciones unitarias más importantes para conseguir un microsistema analítico operativo y funcional. Consiste en tener una interfaz fluídica adecuada entre la plataforma microfluídica y el mundo exterior (bombas peristálticas, válvulas, conducciones fluídicas, etc).⁵³ Estas interfaces se conocen habitualmente como conexiones del mundo macro al micro y a veces son el elemento responsable de comprometer el rendimiento de los microsistemas analíticos debido a fugas y otros problemas asociados. No existe un tipo de conexión fluídica universal (a pesar de existir algunos intentos para conseguirlo, como el uso de Luer-Lock), por lo que hay que

diseñarla en función de la aplicación del microanizador. Generalmente en el diseño de una conexión fluidica se tienen que considerar algunos aspectos como que sea de fácil montaje, que tenga el mínimo volumen muerto, que evite la contaminación entre muestras, que tenga compatibilidad química con los reactivos usados, que no presente fugas, que permita trabajar en una amplia gama de caudales y presiones, que sea compatible con otros elementos fluidicos comerciales y que sea de bajo coste.^{53,54} Una vez diseñadas y construidas se debe verificar que no existen fugas u obstrucciones que comprometan la confiabilidad global del microsistema.

Algunos ejemplos de las conexiones reportadas en la bibliografía en cuanto a sistemas de flujo impulsado por gradiente de presión positiva son conectores reversibles insertados en PDMS sin utilizar adhesivos (Figura 1.6.A), conectores que utilizan el magnetismo para presionar una junta tórica y fijarse sobre las entradas de los canales microfluídicos (Figura 1.6.B), conectores integrados en la plataforma microfluídica en el mismo proceso de fabricación (principalmente en el moldeo de polímeros) (Figura 1.6.C), conectores adheridos o soldados sobre la superficie de los puertos de entrada y salida de fluidos de los dispositivos (Figura 1.6.D y E) y conectores modulares usando soportes anclados a presión o con tornillos que permiten una unión hermética entre el tubo fluidico y el puerto de entrada y salida de fluidos mediante el uso de juntas tóricas (Figura 1.6.F).

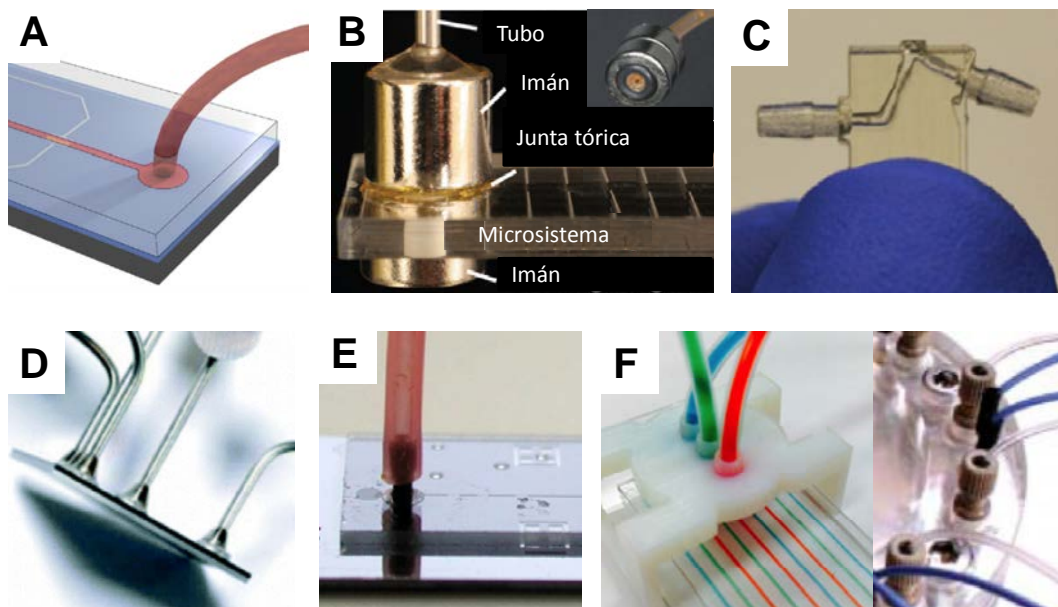


Figura 1.6. Algunos ejemplos de conectores para la introducción de los reactivos y la muestra a los microsistemas analíticos: (A) conexiones a través de PDMS reversibles; (B) conectores magnéticos; (C) conectores integrados; (D) conectores soldados; (E) conectores adheridos con epoxi; (F) conectores modulares con soportes anclados a presión o con tornillos. (Figura adaptada y modificada).⁵³

En el desarrollo de los dispositivos que se presentaran a lo largo de esta memoria se han utilizado conectores modulares para introducir la muestra y los reactivos y evacuar los desechos.

1.1.2.2. Gestión de fluidos

Como se ha comentado anteriormente, a lo largo del trabajo se han utilizado plataformas microfluídicas donde la gestión de los fluidos se realiza mediante sistemas de impulsión por gradiente de presión positiva. Existen en la bibliografía algunos ejemplos de dispositivos que integran monolíticamente los actuadores necesarios para ejercer como microbombas peristálticas o de diafragma y microválvulas.⁴² Sin embargo, su integración monolítica sigue suponiendo un reto tecnológicamente complicado, no solo por la propia miniaturización del actuador, sino por su integración real y compacta con el resto de elementos del microsistema analítico, sin necesidad de periféricos externos voluminosos, y además, mostrando, el conjunto, características y rendimiento adecuados.³² En su lugar, se suelen utilizar sistemas híbridos en los que se combinan las plataformas microfluídicas con los elementos de propulsión a escala macro, como bombas peristálticas y válvulas de inyección manual, ampliamente utilizadas en técnicas de flujo continuo convencionales.⁵⁵ Estas técnicas, que constituyen la base de la mayoría de los sistemas de análisis total convencionales, han sido una herramienta básica para la automatización de procedimientos analíticos y es el referente macro de los μ TAS impulsados por gradiente de presión. Una parte sustancial del conocimiento técnico acumulado en este campo puede ser trasladado, aunque no directamente, a la escala micro. En este sentido, el Grupo de Sensores y Biosensores (GSB) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) tiene una amplia experiencia en el diseño, construcción y evaluación de TAS, basados en técnicas de flujo continuo, que ha sido aprovechada a lo largo de la realización de esta tesis.

De entre las técnicas de flujo existentes, la que ha tenido mayor impacto por su simplicidad es el análisis por inyección en flujo (FIA) (Figura 1.7.A).⁵⁶ Conceptualmente, la técnica consiste en la inserción de un volumen pequeño de muestra en un canal, por donde circula una disolución portadora, que impulsa la muestra hacia el detector, donde llega tras mezclarse con una o varias disoluciones auxiliares que confluyen en el canal principal tras el punto de inserción de la muestra.⁵⁷ El elevado tamaño y la limitada adaptabilidad de este tipo de sistemas ha promovido la aparición de nuevas metodologías de inyección en flujo que pretenden resolver estos problemas.⁵⁶ Así, se ha extendido el uso de microbombas y microválvulas solenoides en lugar de las bombas peristálticas y válvulas de inyección convencionales, lo que proporciona una gran versatilidad a la gestión de fluidos.⁵⁸

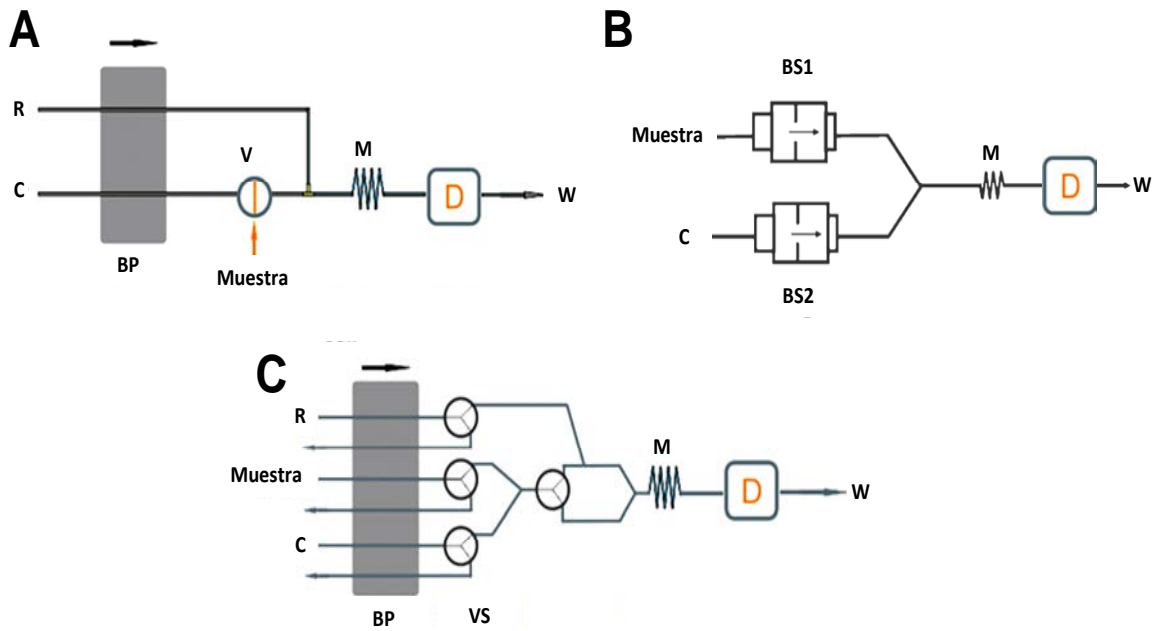


Figura 1.7. Esquemas de sistemas de inyección en flujo básicos: **A)** sistema FIA convencional;⁵⁶ **B)** sistema MPFS;⁵⁹; **C)** sistema MCFIA.⁵⁶ En los cuatro sistemas la leyenda es la misma siendo (R) reactivo, (C) disolución portadora, (BP) bomba peristáltica, (BSx) bomba solenoide, (V) válvula de inyección, (VS) válvula solenoide de tres vías, (M) mezclador, (D) detector y (W) desecho. (Figura adaptada y modificada de sus fuentes originales)

Estos elementos fluidicos son de funcionamiento muy simple mediante la actuación de un solenoide, hecho que proporciona un volumen dispensado discreto de fluido (Figura 1.8.A). Tienen una membrana o diafragma flexible que separa la trayectoria del fluido y el mecanismo de accionamiento. Cuando el solenoide se acciona, el diafragma se retrae, actuando como un émbolo, creando un vacío parcial que hace que el líquido entre a la cavidad de entrada a través del puerto de entrada. Cuando el solenoide deja de estar energizado, un resorte empuja el diafragma hacia abajo, expulsando a través del puerto de salida el volumen

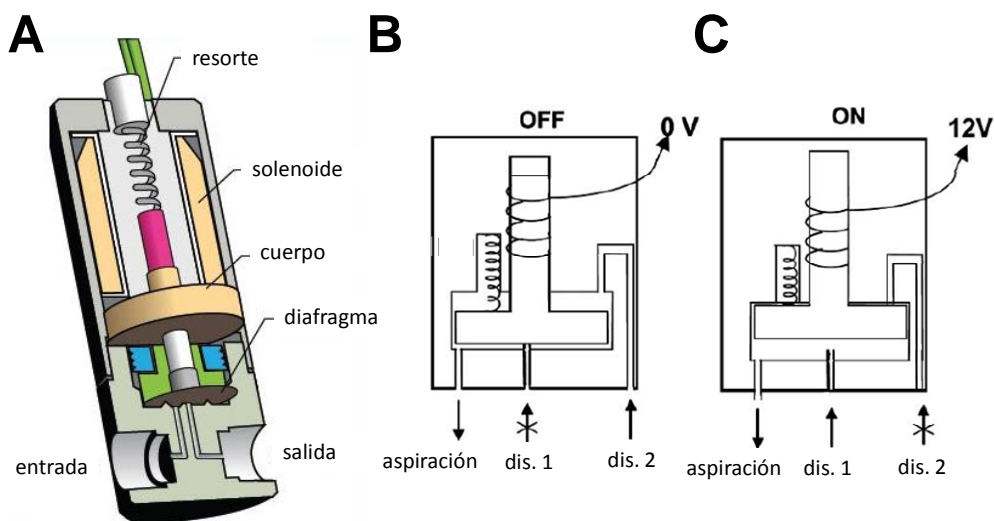


Figura 1.8. Figura de la estructura de una microbomba solenoide **(A)**⁶⁰ y de una microválvula solenoide de tres vías **(B y C)**⁶¹. (Figura adaptada y modificada de las fuentes originales)

discreto de líquido previamente succionado, creando así el gradiente de presión positiva que impulsa el fluido a lo largo del micrositsema.⁶² Las válvulas solenoides, por su parte, están basadas en el mismo fundamento teórico, pero en este caso dejan pasar liquido o no (en función de si se acciona o no el solenoide), en el caso de las de dos vías, o en el caso de las de tres vías (Figura 1.8.B y C), si se utiliza aspiración a través de uno de los puertos, se puede seleccionar entre cualquiera de las otras dos puertos según si el solenoide se acciona o no.⁶¹

Desde que Weeks y Johnson hicieran uso, por primera vez, de microbombas solenoides en 1996,⁵⁸ se han descrito numerosos sistemas en los que se integran estos dispositivos como elementos de gestión de fluidos, controlados por ordenador. Su uso ha dado lugar a la aparición de nuevas técnicas de flujo como los sistemas de flujo multibomba (MPFS) (Figura 1.7.B) o los sistemas de análisis por inyección en flujo con multiconmutación (MCFIA) (Figura 1.7.C), por citar algunos ejemplos.^{59,63-73} Los sistemas propuestos incorporan solo microbombas solenoides o una combinación de estas con microválvulas solenoides. De esta manera, las disoluciones no están fluyendo continuamente por los distintos canales que conforman los microsistemas. Algunas de las ventajas que presentan este tipo de configuraciones son que permiten una mezcla más eficiente de la muestra y reactivos - debido al flujo pulsante-, tienen un menor consumo de energía y de reactivos, requieren un menor mantenimiento, simplifican la completa automatización y funcionamiento autónomo del sistema analítico -permitiendo introducir el concepto de adaptabilidad en el funcionamiento de los equipos diseñados (fácil reconfiguración del caudal, volumen de inyección, etc.)- y el equipamiento utilizado es mucho más ligero y miniaturizable.^{64,68}

Con todo esto, a pesar de no conseguir sistemas de gestión de fluidos integrados en la misma plataforma microfluídica, si se pueden conseguir sistema híbridos altamente miniaturizados y sencillos, por lo que las ventajas obtenidas son similares.

1.1.2.3. Pre-tratamiento de la muestra

En numerosas ocasiones, el analito de interés presente en la muestra se puede encontrar en una forma que resulte difícil de determinar por las técnicas analíticas establecidas, o la propia matriz de la muestra puede ser tan compleja que de por sí, comprometa la selectividad del método de detección o la integridad del microanalizador debido a partículas grandes que pueden obturar los microcanales fluídicos. En estos casos, se requiere de la integración de una o varias etapas de pretratamiento de la muestra para adecuarla antes de ser conducida al detector. Las técnicas de pretratamiento de muestra que se pueden integrar en microsistemas analíticos se pueden agrupar en cuatro grandes grupos: separación

del analito de la matriz de la muestra, derivatización, pretratamiento bioquímico y preconcentración del analito.⁷⁴

En el primer grupo se engloban aquellas técnicas destinadas a mejorar la selectividad del método o eliminar partículas. Algunos ejemplos son la diálisis, la filtración por retención de partículas, la extracción líquido-líquido, la precipitación, la electroforesis de flujo libre (*free-flow electrophoresis*) o la difusión gaseosa.⁷⁵⁻⁷⁹

Por su parte, la derivatización implica la transformación química del analito para hacerlo detectable por el sistema de detección utilizado. En el ámbito bioquímico, el marcaje específico o no específico (*labeling*) de biomoléculas con marcadores fluorescentes es una técnica bastante común, así como técnicas de complejación.⁸⁰

También en el ámbito de la bioquímica, a veces es necesario descomponer moléculas complejas para poder manejar mejor la muestra o para obtener un compuesto para medir indirectamente el analito en cuestión. Esto se puede llevar a cabo gracias a técnicas de pretratamiento bioquímico como la digestión enzimática. En este mismo sentido, a veces es necesario determinar analitos, usualmente patógenos, que se encuentran presentes en la muestra pero a tan bajas concentraciones que los límites de detección de los sistemas de detección usados no permiten determinar. En estos casos se recurre a la técnica de amplificación, utilizada en ensayos PCR, para poder realizar la determinación.⁸¹⁻⁸³

Por último, si el analito se encuentra en una concentración muy pequeña, su determinación se puede hacer imposible debido a la sensibilidad del equipo. La preconcentración del analito antes del análisis, ya sea mediante extracción en fase sólida (SPE) o por técnicas como la isotacoforesis, puede posibilitar su determinación, concentrándolo en un volumen inferior.^{84,85}

1.1.2.4. Sistemas de detección

Los sistemas de detección son la operación unitaria más importante de los microsistemas analíticos, ya que son los responsables de la identificación y la cuantificación del analito a determinar. En general, priman los sistemas de detección cuya selectividad permite simplificar el tratamiento previo de la muestra y con ello reducir la complejidad del microsistema analítico, aumentando su robustez, aunque esto no siempre es posible. De entre la gran variedad de métodos analíticos utilizados como sistema de detección en microsistemas analíticos, el GSB tiene una amplia experiencia en el desarrollo de microanalizadores integrando métodos electroquímicos, como la potenciometría,^{49,51,86-88} y ópticos, como la espectrofotometría de absorción UV-Vis y fluorescencia.^{52,89-95}

1.1.2.4.1. Métodos electroquímicos

En el caso de los sistemas de detección basados en métodos electroquímicos se aprovecha el formato conceptual de sensor químico. De este modo, la simplificación alcanzada en el diseño del microanalizador es máxima. Los sensores químicos se pueden definir como dispositivos de medida que responden de manera selectiva a un analito, transformando información química en una señal analíticamente útil.⁹⁶ La estructura de un sensor químico se puede dividir en dos o tres partes fundamentales, según los autores (Figura 1.9).^{7,97,98} La primera de las partes corresponde al elemento de reconocimiento (R), encargado de generar una señal primaria (electroquímica, eléctrica, óptica, másica, térmica, etc.) como consecuencia de la interacción selectiva con el analito presente en la muestra. La segunda de las partes corresponde al transductor (T), que se encarga de transformar la señal primaria en una señal secundaria, generalmente del dominio eléctrico. La tercera de las partes corresponde a la amplificación (A) de la señal, aunque no es indispensable en todos los casos. Posteriormente, esta señal eléctrica debe ser procesada por otra operación unitaria (normalmente de adquisición y procesamiento de la señal) para obtener la información analítica útil sobre la muestra. Por lo general, la señal suministrada es proporcional a la concentración del analito presente en la muestra.

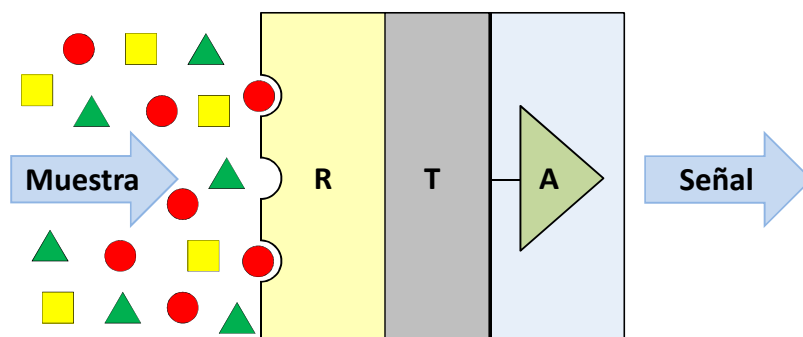


Figura 1.9. Esquema básico de un sensor químico. R) elemento de reconocimiento; T) transductor; A) amplificador de la señal.⁷

Los sensores químicos se pueden clasificar según el principio de funcionamiento del transductor. De esta manera se pueden encontrar sensores ópticos, electroquímicos, eléctricos, másicos, magnéticos, térmicos, entre otros.^{7,43,96}

Los métodos electroquímicos son fácilmente integrables en sistemas microfluídicos, debido a su sencillez de fabricación, y proporcionan una gran sensibilidad. Dentro de los sensores electroquímicos, los sensores potenciométricos, han experimentado un gran desarrollo debido, entre otros motivos, a que son económicamente accesibles, robustos y han demostrado su validez siendo integrados en analizadores de flujo en equipos miniaturizados y autónomos.^{86,99,100}

La potenciometría permite extraer información cualitativa y cuantitativa sobre la composición de una muestra, de manera rápida y sencilla. La técnica se basa en el establecimiento de una diferencia de potencial entre la superficie de un electrodo indicador y la de uno de referencia, bajo condiciones de corriente prácticamente nula.¹⁰¹ El electrodo indicador proporciona un potencial, cuya magnitud se relaciona con la actividad del ión principal (analito) mediante la ecuación de Nernst:

$$E = E^o + \frac{RT}{z_i F} \cdot \ln a_i^{z_i} \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

donde E es el potencial del electrodo (mV), E^o es el potencial estándar del electrodo cuando la actividad del elemento electroactivo es la unidad (mV), R es la constante de los gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta (K), F es la constante de Faraday (96487 C mol^{-1}), z_i es la carga del ión y a_i es la actividad del ión que interviene en el proceso.

El potencial generado depende de la concentración pero no de la superficie del electrodo indicador, por lo que su miniaturización no implica ninguna pérdida de características analíticas.

Los electrodos indicadores más utilizados en potenciometría son los electrodos selectivos de iones (ESIs) y de estos, los más fáciles de miniaturizar e integrar, presentando numerosas ventajas en cuanto a las características de respuesta, son los electrodos selectivos de iones de membrana polimérica (o portador móvil) de estado sólido (all-solid-state).^{102,103} Estos, están basados en membranas permselectivas que contienen un portador móvil (elemento de reconocimiento), el cual es capaz de interactuar de forma selectiva y reversible con el analito presente en la muestra acuosa, generando un potencial de membrana. A su vez las membranas están depositadas sobre un soporte conductor o transductor sólido, de ahí su nombre de “estado sólido”, eliminando la disolución de referencia interna utilizada en la configuración convencional.^{104,105} Este transductor, es el encargado de generar la señal de dominio eléctrico que con posterioridad será procesada para obtener la información útil.

Las membranas poliméricas están compuestas por distintos elementos, los cuales desempeñan diferentes funciones en el seno de la membrana: el elemento de reconocimiento, el solvente mediador o plastificante, la matriz polimérica y, en algunos casos, el aditivo. La matriz polimérica, generalmente PVC,¹⁰⁶ es la encargada de proporcionar un soporte sólido para el resto de los componentes de la membrana. Sus características principales son poseer una elevada estabilidad mecánica y química, y tener elevada resistencia eléctrica. El plastificante o solvente mediador tiene que cumplir diferentes requisitos para ser adecuado, como solubilizar el resto de componentes de la membrana, ser inmiscible en agua, ser químicamente estable e inerte y tener una viscosidad y una constante dieléctrica

adecuadas.¹⁰⁷ En cuanto al aditivo, este se utiliza en ciertas ocasiones para mejorar la selectividad frente a compuestos interferentes presentes en la matriz de la muestra, reducir el tiempo de respuesta del electrodo e incrementar la sensibilidad del elemento de reconocimiento, así como para reducir la resistencia eléctrica de la membrana.¹⁰⁷ Por último, el elemento de reconocimiento es, como se ha comentado anteriormente, el material electroactivo responsable del reconocimiento del analito. Existen dos tipos familias: los de portador cargado y los de portador neutro. Los cargados presentan un mecanismo de respuesta parecido a las resinas iónicas, en que se forman pares iónicos que pueden ser extraídos hacia el medio orgánico de la membrana. Los neutros, también llamados ionóforos por su origen, son compuestos de origen natural o sintético (como macrociclos) que forman complejos cargados de alta selectividad, solubles en el medio orgánico de la membrana.¹⁰⁸ La nomenclatura potenciométrica tiene a identificar a todos los elementos de reconocimiento como ionóforos.^{109,110}

Por su parte, el tipo de electrodo de referencia más común es el de Ag/AgCl, siendo también el más utilizado en microistemas analíticos.¹¹¹ Una estrategia para integrarlo exitosamente en un microanalizador, evitando los problemas de modificación de potencial en contacto con la muestra, es ubicándolo en un canal auxiliar y, conectando este, al canal principal una vez pasado el electrodo indicador, dando lugar a una unión líquida de difusión libre.^{50,86,112,113}

En algunas ocasiones, en lugar de tener un sistema potenciométrico estándar, con un electrodo indicador constituido por un ESI y un electrodo referencia de Ag/AgCl, es posible sustituir el electrodo de referencia de Ag/AgCl por otro ESI igual al del electrodo indicador. De esta manera se consigue simplificar el proceso de fabricación de los microistemas y disminuir el consumo de reactivos, ya que en este caso no es necesario tener una disolución auxiliar de Cl⁻ fluyendo sobre el electrodo de referencia de Ag/AgCl para mantener su potencial constante.^{102,114}

En cuanto a la caracterización analítica de los ESIs integrados en los microanalizadores, hay que tener en cuenta una serie de procedimientos y parámetros establecidos por la IUPAC:¹¹⁵

Curva de calibración

La obtención de información analítica sobre la respuesta del microanalizador pasa por determinar sus parámetros de calidad mediante la calibración. Esta calibración se realiza midiendo distintas disoluciones estándar del analito, hecho que permite encontrar la ecuación que relaciona el potencial medido con la concentración de analito. En la figura 10 se representa una curva de calibrado típica para especies aniónicas. Como se puede observar, esta presenta tres zonas: zona de no respuesta, zona de respuesta subnernstiana y zona de respuesta lineal.

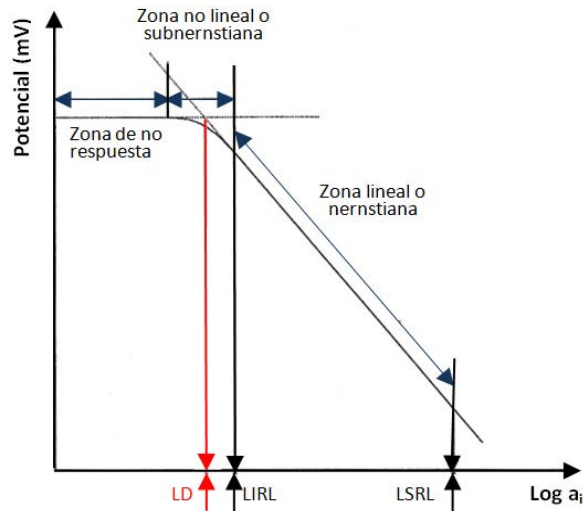


Figura 1.10. Ejemplo de una curva de calibrado potenciométrica para aniones.

La parte lineal está definida por la ecuación de Nernst, con la siguiente estructura:

$$E = A + B \cdot \log a_i \quad (\text{Ecuación 1.6})$$

donde E es el potencial medido expresado en mV, a_i es la actividad del ión de interés y B corresponde a la sensibilidad del dispositivo expresada en mV década⁻¹. A 25 °C esta sensibilidad toma el valor teórico de -59,2 mV/déc.⁻¹ para aniones monovalentes y de -29 mV/déc. para aniones divalentes. En el caso de cationes, se corresponde a los mismos valores de sensibilidad pero con signo contrario.

Como se puede observar, el rango de trabajo o intervalo lineal de respuesta está acotado por el límite inferior de respuesta lineal (LIRL) y el límite superior de respuesta lineal (LSRL) (Figura 1.10). Estos dos límites corresponden a los últimos puntos experimentales que siguen la linealidad para un criterio estadístico r^2 preestablecido.

A veces, por necesidades de la aplicación, es necesario trabajar con concentraciones por debajo del LIRL. Con este propósito, se puede recurrir al ajuste no lineal de los datos experimentales mediante la adaptación de la ecuación de Nikolski-Eisenmann:

$$E = A_1 + B_1 \cdot \log (a_i + c) \quad (\text{Ecuación 1.7})$$

$$c = LD_{ap} + \sum K_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{\frac{z_i}{z_j}} \quad (\text{Ecuación 1.8})$$

dónde a_j es la actividad del ión interferente (si lo hubiera) y z_i y z_j las cargas de las especies involucradas, $K_{i,j}^{pot}$ es la constante de selectividad potenciométrica que nos da una medida de la interferencia que provocan las especies interferentes j sobre el ión principal i , y c se corresponde al punto de curvatura de la curva de calibración,

equivalente al límite de detección aparente (LD_{ap} diferente del límite de detección según la IUPAC¹¹⁵) cuando no hay interferencias en el medio o al coeficiente de selectividad cuando hay interferentes en el medio.

Como se puede observar, la ecuación de Nernst se expresa en actividades. A pesar de esto, en la presente memoria se han usado directamente concentraciones ya que, con el medio iónico utilizado en las medidas, el coeficiente de actividad se mantiene prácticamente constante y el término correspondiente a dicho coeficiente puede ser integrado en el valor de la constante A o A1 de las ecuaciones 1.6 y 1.7, respectivamente. La relación entre actividad y concentración es la siguiente:

$$a_x = \gamma \cdot [x] \quad (\text{Ecuación 1.9})$$

donde a_x es la actividad del ión, $[x]$ la concentración del ión y γ es el coeficiente de actividad.

Límite de detección

El límite de detección (LD) es una característica muy importante de los sensores químicos ya que proporciona una idea del intervalo dinámico de trabajo y, por consiguiente, determina la aplicación final del dispositivo. Existe cierta diversidad de criterios para determinar el LD en potenciometría. En este sentido y por cuestiones prácticas, la IUPAC hace una definición simple considerando este parámetro como la actividad (o concentración) de ión principal que corresponde al punto de intersección entre la extrapolación de la recta con comportamiento nernstiano y el segmento inicial de zona de no respuesta, normalmente horizontal (Figura 1.10).¹⁰⁸

Coefficientes de selectividad

El coeficiente de selectividad ($K_{i,j}^{pot}$) es un parámetro clave en la caracterización de los sensores potenciométricos, ya que permite establecer la influencia de las diferentes interferencias en la respuesta potenciométrica, hecho que determina su viabilidad y aplicación final. Cabe destacar que este coeficiente no es una constante termodinámica, ya que depende de las condiciones de trabajo. A pesar de esto, es muy útil para comparar resultados obtenidos con unas mismas condiciones de operación. Existen básicamente dos metodologías para determinar el coeficiente de selectividad: el método de las disoluciones separadas y el método de las disoluciones mezcladas.¹¹⁶ Para caracterizar los microanalizadores desarrollados presentados en esta memoria, se escogió el segundo de los métodos, ya que es el que reproduce mejor las condiciones en que se encuentran los iones en las muestras

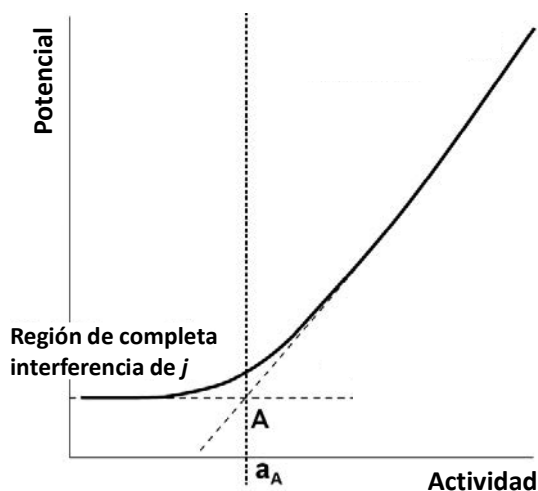


Figura 1.11. Metodología de determinación del $K_{i,j}^{pot}$.

reales. Este método se basa en la medida del potencial del electrodo en una disolución con una actividad fija del ión interferente j , en donde se varía la actividad del ión principal i . Cuando la actividad del ión principal es baja, el potencial observado es independiente de esta y sólo responde a la actividad del ión interferente. (Figura 1.11). El punto A de intersección entre la línea extrapolada de la parte nernstiana y la línea horizontal de interferencia permite obtener el valor de actividad correspondiente a este punto (a_A). Posteriormente mediante la ecuación 1.10 se puede calcular la $K_{i,j}^{pot}$, donde a_j es la actividad del ión interferente y z_i y z_j las cargas de las especies involucradas.

$$K_{i,j}^{pot} = \frac{a_A}{\frac{z_i}{z_j} a_j} \quad (\text{Ecuación 1.10})$$

A pesar de las ventajas que presentan los microistemas con sensores potenciométricos, también muestran algunos inconvenientes, como la existencia de histéresis en la respuesta de los sensores, que genera una necesidad de calibración frecuente, o la reducida selectividad en algunos casos, que obliga al conocimiento de la matriz de la muestra para aplicar los tratamientos adecuados previos a la detección.⁹⁸

1.1.2.4.2. Métodos ópticos

Los métodos ópticos, en general, son más sencillos de implementar que los electroquímicos. Esta técnica es muy común en los métodos químicos clásicos, encontrándose que un gran número de métodos de referencia para determinar parámetros químicos, se basan en este tipo de mediciones ópticas. De entre los métodos ópticos, la espectrofotometría de absorción UV-Vis es una de las más

utilizadas. Esta técnica se basa en la interacción entre la radiación y la materia, estableciéndose una relación proporcional entre la cantidad de radiación absorbida (o transmitida) por el analito (o producto formado a partir de la reacción entre un reactivo colorimétrico y el analito) y la concentración de este presente en la muestra acuosa, conocida como ley de Beer:^{97,117,118}

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{Ecuación 1.11})$$

donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absorptividad molar de la especie a determinar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c es la concentración de la especie (mol L^{-1}) y l es el camino óptico que recorre la radiación en la muestra (cm). La absorbancia es una magnitud adimensional, sin embargo, algunos autores escriben *unidades de absorbancia (UA)* para referirse a los valores de dicha magnitud.¹¹⁹

En esta técnica, la selectividad puede modularse escogiendo adecuadamente la longitud de onda de la radiación utilizada. Por desgracia, muchos compuestos presentan bandas de absorción a idénticas longitudes de onda. Para superar este problema, se recurre al uso de reactivos colorimétricos que reaccionan selectivamente con el analito, dando lugar a un producto que absorbe a una longitud de onda libre de solapamiento con la matriz. Esta estrategia también se suele utilizar para mejorar la baja sensibilidad provocada por la miniaturización de los sistemas de detección óptica. Según la ley de Beer, la disminución de la señal es proporcional a la disminución del camino óptico, por lo que para mantener una adecuada sensibilidad es necesario utilizar detectores complejos con una alta amplificación (inviable en un contexto de miniaturización) o usar un reactivo colorimétrico que reaccione con el analito, dando como resultado un producto con una absorptividad molar mucho mayor que la intrínseca del analito. Otra estrategia utilizada es la de diseñar una estructura microfluídica miniaturizada pero ampliando el camino óptico. Así, se puede compensar la disminución de la sensibilidad en microsistemas analíticos ópticos.

Los componentes de un sistema de detección óptico para medidas de absorbancia son básicamente una fuente de radiación capaz de emitir un haz de luz a la longitud de onda donde el analito, o la especie obtenida de la reacción del analito con otro reactivo, absorben, y un detector capaz de detectar los cambios en la radiación provocados por la interacción de esta con el analito o el producto formado.¹¹⁷ Tradicionalmente, los equipos utilizados para realizar medidas de absorción son muy pesados, voluminosos, de elevado coste y consumen mucha energía, no siendo compatibles con el concepto de miniaturización usado para desarrollar microsistemas analíticos para medidas in situ y en tiempo real. Sin embargo, en la actualidad, los avances en optoelectrónica han permitido la aparición de nuevas fuentes de luz más pequeñas y económicas, como los diodos

emisores de luz (LED)¹²⁰⁻¹²⁴ y detectores más pequeños, simples y económicos como los fotodiodos,¹²⁰⁻¹²³ permitiendo una drástica reducción del tamaño de los montajes experimentales en comparación con los equipos convencionales, haciéndolos así más fácilmente miniaturizables y portátiles.^{91,125}

Para la caracterización de los microsistemas analíticos basados en medidas de absorbancia, hay que tener en cuenta una serie de parámetros establecidos por la IUPAC para cualquier técnica instrumental:¹²⁶⁻¹²⁸

Curva de calibración

La mayor parte de los parámetros de caracterización se obtienen a partir de la curva de calibración del sistema. En esta ocasión, la relación entre la señal (absorbancia) y la concentración es, teóricamente, lineal y no logarítmica. No obstante, en realidad la medida experimental es de transmitancia. Esta se calcula midiendo intensidad de la radiación incidente y la emergente. El valor de absorbancia se obtiene, entonces, de la ecuación que correlaciona esta misma y la transmitancia:

$$A = -\log T = -\log \frac{I_0}{I} \quad (\text{Ecuación 1.12})$$

donde A es la absorbancia, T es la transmitancia, I_0 es la intensidad de la radiación incidente e I es la intensidad emergente.

En los microsistemas desarrollados, la intensidad incidente (I_0) se obtiene midiendo la radiación detectada cuando a lo largo de la celda de detección fluye una disolución sin el analito, definiéndose la línea base. La intensidad emergente (I) se obtiene midiendo la radiación detectada cuando el analito o el producto obtenido alcanzan la celda de flujo del detector. A partir de estos valores, se obtienen los de absorbancia (de forma automática mediante el software de procesamiento de la señal) que se representan frente a los valores de concentración de las disoluciones estándar para obtener la recta de calibración. De esta manera, al realizar la regresión lineal se obtiene una ecuación experimental con la siguiente forma:

$$A = a + b \cdot c \quad (\text{Ecuación 1.13})$$

donde A es la absorbancia, a es la ordenada al origen, b es la sensibilidad (que engloba en su término al camino óptico y a la absorptividad molar) y c es la concentración del analito.

Límite de detección, límite de cuantificación y rango lineal

Según la IUPAC, el límite de detección (LD) en medidas espectrofotométricas se define como la concentración (C_{LD}) del analito relacionada con la medida de respuesta de menor magnitud que puede detectarse con una certeza razonable. Así el LD se calcula, a partir de la señal del blanco (línea base) y la recta de calibración, con la siguiente expresión:

$$C_{LD} = \frac{k \cdot s_B}{S} \quad (\text{Ecuación 1.14})$$

donde C_{LD} es la concentración correspondiente al límite de detección, s_B es la desviación estándar de las medidas del blanco, S es la sensibilidad del método (la pendiente de la curva de calibrado) y k es una constante numérica. Un valor de $k = 3$ es el recomendado por IUPAC por cuestiones estadísticas en el cálculo del LD.

En cuanto al límite de cuantificación (LC), se define como la concentración (C_{LQ}) del analito relacionada con la medida de respuesta de menor magnitud que puede determinarse con una certeza razonable. Así el LC se calcula con la misma expresión que el LD pero en este caso se utiliza $k = 10$.

Para obtener el rango lineal (RL) del microanalizador, se debe partir como límite inferior de respuesta lineal (LIRL) con el valor de LC y como límite superior (LSRL), aquel valor de concentración en el que se empiece a perder la linealidad.

A pesar de las ventajas, la técnica presenta también ciertas limitaciones al miniaturizar los sistemas ópticos. La sensibilidad se ve comprometida debido a la reducción del camino óptico, hecho que obliga a realizar un cuidadoso diseño de las cámaras de detección ópticas de los microsistemas, y en ocasiones, para conseguir prestaciones adecuadas se hace necesario utilizar detectores más sensibles y más complejos, como fotomultiplicadores. Otra desventaja es el corto rango de trabajo que suele presentar la técnica, de aproximadamente 2 órdenes de magnitud. Sin embargo, cuando se requieren rangos de trabajo mayores, la disminución de sensibilidad puede convertirse en una ventaja. Otras limitaciones están relacionadas con la presencia de turbidez en la muestra, hecho que provoca problemas al alterar la luz transmitida.¹¹⁷

Como se puede observar tanto los microsistemas analíticos basados en potenciometría como los basados en espectrofotometría de absorción UV-Vis presentan ventajas e inconvenientes, por lo que en función del analito a determinar o el tipo de aplicación estudiada se escogerá entre una técnica u otra.

1.2. Materiales utilizados en la construcción de microsistemas

En el contexto de investigación y desarrollo de microsistemas analíticos, el material o sustrato de fabricación ideal es aquel que permite integrar todas las operaciones unitarias requeridas por la aplicación final de una manera fácil, rápida y económica. Para ello, se deben tener en cuenta una serie de características como la compatibilidad con otros materiales o componentes distintos al sustrato (componentes electrónicos, filtros, entre otros), la estabilidad térmica y química, la transparencia, la biocompatibilidad, la resistencia mecánica, la flexibilidad, la facilidad y rapidez en el proceso de prototipado y la facilidad de una futura transferencia a producción en masa a bajo coste.

Desde los inicios de la microfluídica y los LOC, el material más usado ha sido el silicio, principalmente debido a sus bien caracterizadas propiedades y a su bien establecida y consolidada tecnología y procesos de fabricación, derivada de la evolución de la industria microelectrónica.¹²⁹⁻¹³¹ Entre las principales ventajas que presenta esta tecnología destacan un procesado de alta precisión que permite crear estructuras de tamaño nanométrico, sus propiedades mecánicas y eléctricas, así como la posibilidad de producción en masa y la capacidad de integrar componentes electrónicos.^{129,130} Sin embargo, la necesidad de utilizar salas de ambiente controlado (salas blancas) y personal cualificado para el proceso de fabricación y el hecho de presentar limitaciones a la hora de obtener estructuras en tres dimensiones, hacen a esta tecnología no apropiada para procesos de prototipado a bajo coste en un contexto de investigación y desarrollo.

Para intentar superar estos inconvenientes, se ha propuesto el uso de otros tipos de materiales como los polímeros y, más recientemente, las cerámicas verdes o Low Temperature Co-Fired Ceramics (LTCC).

A lo largo de esta sección se ofrece una visión general de estas dos tecnologías, las cuales han sido utilizadas para la fabricación de los microanalizadores desarrollados en el trabajo que se presenta.

1.2.1. Polímeros

En la última década, los polímeros han sido ampliamente utilizados como sustrato para la fabricación de dispositivos microfluídicos debido a su relativamente bajo coste, su versatilidad y la simplicidad de sus procesos de fabricación, hecho que permite tanto un prototipado rápido como una producción en masa a bajo coste. Además, presentan una buena compatibilidad con otros materiales y ofrecen un amplio abanico de posibilidades gracias a que sus propiedades físico-químicas

pueden ser adaptables a través de cambios en su formulación y mediante modificación química, .^{46,132,133}

Los polímeros son compuestos orgánicos macromoleculares que consisten en la repetición de más de 1000 unidades estructurales, conocidas como monómeros. El proceso de polimerización se induce mediante una sustancia iniciadora o mediante un cambio en un parámetro físico (temperatura, luz, presión, etc.).^{46,134} Una de las propiedades más destacadas de los polímeros, y que caracteriza su comportamiento, es la temperatura de transición vítrea (T_g). Esta se define como la temperatura correspondiente al punto intermedio entre el estado fundido y el estado sólido. Para procesos de fabricación, esta propiedad es fundamental ya que temperaturas por encima del T_g hacen del polímero un material más viscoso, pudiendo ser moldeado, mientras que con temperaturas por debajo del T_g el material se vuelve sólido y rígido con aspecto de vidrio.¹³⁴ Los polímeros normalmente contienen otros compuestos como ablandadores, plastificantes o estabilizantes. De esta manera se pueden conseguir múltiples características y propiedades con una misma familia de polímeros.

Existen diferentes maneras de clasificar a los materiales poliméricos. Sin embargo la más habitual tiene en cuenta la interconexión de las unidades monoméricas en las cadenas estructurales del polímero. Según este criterio los polímeros pueden ser elastómeros, duroplásticos o termoplásticos.^{46,132,134}

Los polímeros elastómeros están compuestos por cadenas débilmente entrecruzadas. Pueden ser deformados o estirados mediante la aplicación de una fuerza externa, volviendo a su posición inicial al dejar de ejercerse esta. Uno de los elastómeros más conocidos y utilizados en aplicaciones microfluídicas y en fabricación de μ TAS es el polidimetilsiloxano (PDMS).¹³⁵ Sus principales ventajas son su adhesión al vidrio mediante un simple tratamiento con plasma, la posibilidad de producir estructuras multicapa y, gracias a su elasticidad, permite integrar válvulas y un fácil conexionado de la fluídica en los microanalizadores.¹³⁶ Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como la adsorción sobre la superficie de los canales, que puede provocar contaminación entre muestras y alteraciones en las medidas, así como una escasa implementación comercial, fuera del entorno académico.¹³⁷

Por su parte, en los polímeros duroplásticos las cadenas están fuertemente entrelazadas, por lo que no son posibles los movimientos moleculares, dando lugar a materiales duros y frágiles.¹³⁴ Algunos ejemplos son los poliuretanos y las resinas epoxi.

Por último, los polímeros termoplásticos están formados por cadenas de moléculas débilmente unidas. A temperaturas por encima de su T_g se vuelven viscosos, pudiendo ser moldeados en múltiples formas que conservan una vez la temperatura desciende por debajo del T_g correspondiente.^{132,134,138} Algunos ejemplos de polímeros

termoplásticos son el policarbonato (PC), el polimetilmetacrilato (PMMA), el poliestireno (PS) o el copolímero de Olefina cíclica (COC).

La elección del polímero a usar como sustrato para la fabricación de los microsistemas analíticos vendrá determinada por el tipo de aplicación final, pudiéndose requerir distintos grados de inercia química, transparencia, T_g , entre otras características.

Uno de los materiales poliméricos en auge en los últimos años, considerado por muchos como uno de los materiales más importantes en el futuro de la microfabricación y la microfluídica,¹³² es el polímero termoplástico COC. Esta fama se debe en parte a sus características ideales para la fabricación y el diseño de estructuras complejas tridimensionales mediante la aproximación multicapa.

1.2.1.1. Copolímero de Olefina Cíclica (COC)

El material utilizado para la fabricación de los microanalizadores de sustrato polimérico presentadas en este trabajo es el COC, comercializado por la empresa TOPAS Advanced Polymers. El nombre de TOPAS es el acrónimo de polímero termoplástico de olefina de estructura amorfa (del inglés *Thermoplastic Olefin Polymer of Amorphous Structure*).¹³⁹ Así, el COC es un copolímero termoplástico compuesto por unidades monoméricas de etileno y norborneno en diferentes proporciones (Figura 1.12). En función de la proporción de cada uno de los monómeros, el copolímero resultante presenta unas características u otras. La tabla 1.1 reúne una serie de propiedades que presentan los distintos tipos o grados de COC TOPAS comerciales.

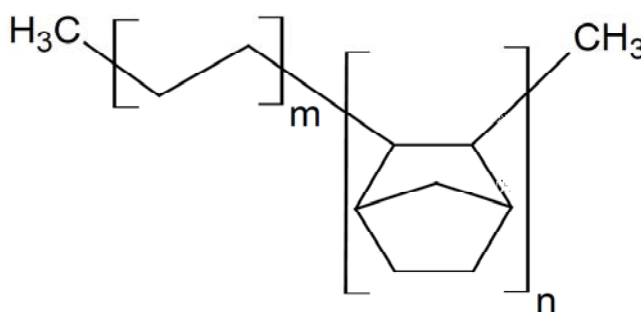


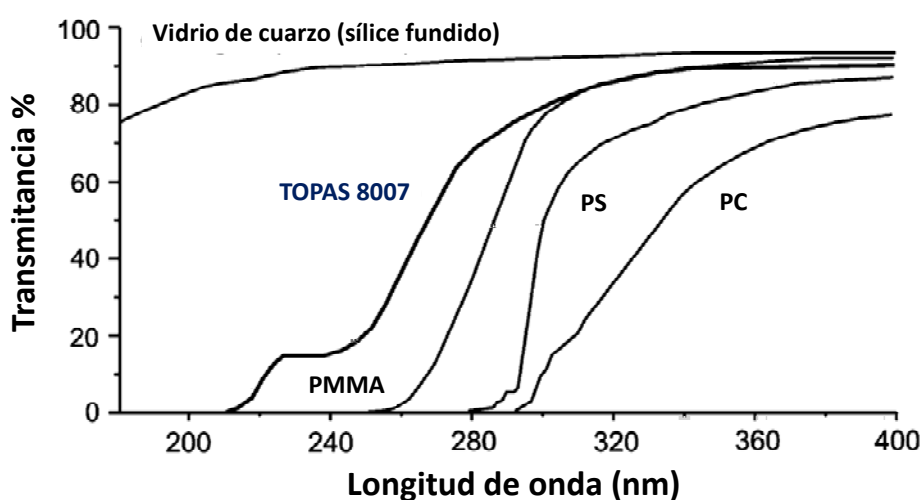
Figura 1.12. Estructura química del COC. Los diferentes tipos o grados vienen determinados por la proporción de los monómeros etileno (m) y norborneno (n) en el polímero final.¹⁴⁰

Gracias a sus propiedades modulables, el COC presenta numerosas ventajas. Respecto a otros termoplásticos como el PMMA, el PC o el PS, presenta una excelente biocompatibilidad y una resistencia química asombrosamente elevada, frente a gran cantidad de ácidos, bases y disolventes polares como alcoholes, cetonas y algunos esteres.^{139,141} De esta manera, ciertos campos de aplicación relacionados con disolventes orgánicos, en los que no se podía utilizar sustrato polimérico debido a su incompatibilidad, ahora son explorables.¹⁴²

Tabla 1. 1. Propiedades de los distintos tipos o grados de COC.^{139,141}

Propiedad	Unidades	Tipo o grado					
		9506	8007	5013	6013	6015	6017
Contenido de norborneno	% en peso	61	65	77	78	81	85
Absorción de agua (24 h de inmersión a 23 °C)	%	-	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Permeabilidad a agua (a 23 °C y 85 % de humedad)	$\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$	-	0.023	0.030	0.035	0.035	0.045
T ^a de transición vítrea (T _g)	°C	65	78	134	138	158	178
T ^a de deflexión térmica (HDT/B) (a 0.45 MPa)	°C	-	75	127	130	150	170
Transmitancia de la luz (grosor 2 mm)	%	-	91	91.4	91	91	91
Índice de refracción	-	-	1.536	1.532	1.53	1.532	1.531

Sin embargo, el COC presenta una baja resistencia química frente a disolventes clorados y aromáticos.¹⁴¹ Esta, a priori, desventaja se puede convertir en una ventaja, ya que de esta manera se hace posible la integración de materiales conductores, cuya deposición y compatibilidad requieren de una cierta degradación superficial del sustrato polimérico para tener buena adherencia.⁹⁰ En este sentido, lo relativamente reciente de la comercialización del COC hace que aún no se hayan desarrollado materiales conductores específicos para este polímero, por lo que encontrar uno comercial, que sea completamente compatible, es, todavía, una tarea complicada.

**Figura 1.13.** Comparativa del porcentaje de transmitancia de diferentes materiales en un rango de longitud de onda entre 180 y 400 nm.¹⁴²

En cuanto a las propiedades ópticas, el COC presenta una gran transmitancia (rondando el 91 %) a lo largo de un amplio rango de longitudes de onda que van

desde los 360 a los 1200 nm. Además, en la región UV cercana, la transmitancia del COC es más alta que cualquier otro polímero termoplástico (Figura 1.13). Este hecho hace adecuado el material para múltiples aplicaciones que requieran la integración de la fluidica y la determinación óptica por absorción o fluorescencia.¹⁴² Por último, el hecho de que el COC se pueda formular con distintas T_g y la existencia de una relación lineal entre el porcentaje de norborneno y la T_g (Figura 1.14) hacen posible el proceso de fabricación multicapa utilizando material extruido, en donde unas capas del polímero, con T_g elevadas (TOPAS 5013, 6013, 6015 o 6017), actúan como capas estructurales y otras, con valores de T_g bajos (TOPAS 9508 o 8007), actúan como capas sellantes del microanalizador monolítico final. De esta manera se evitan los múltiples problemas que existen con otros polímeros durante el proceso de sellado de canales microfluídicos mecanizados en una capa. Este sellado provoca obturaciones (debido al uso de adhesivos) o deformaciones y oclusiones (debido al uso de sellado térmico usando un polímero con una sola T_g o de disolventes).¹⁴²⁻¹⁴⁴

Todas estas características permiten el uso del COC en la construcción de plataformas microfluídicas para múltiples aplicaciones y campos.

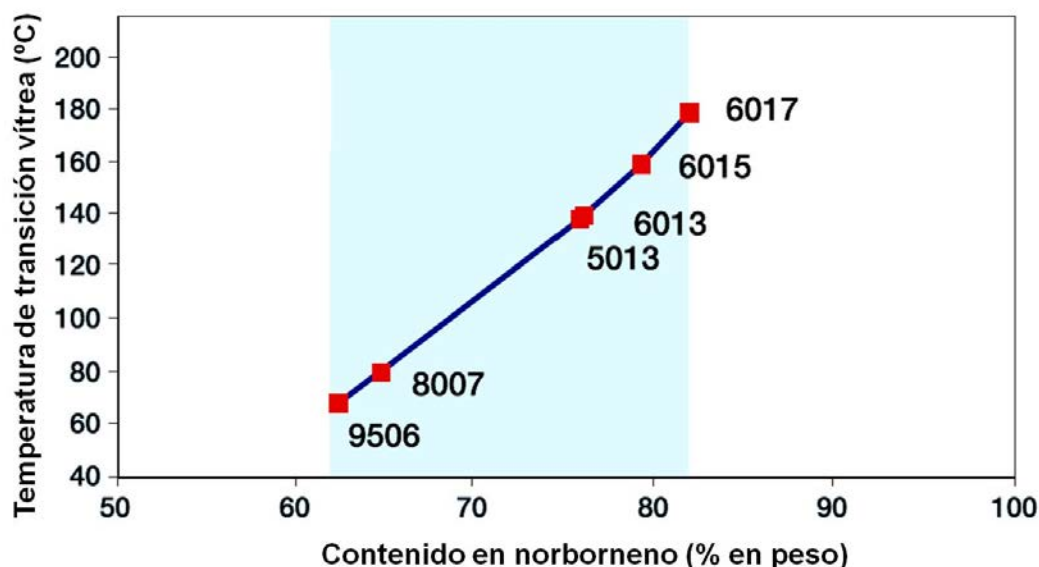


Figura 1.14. Relación entre el porcentaje de norborneno en el polímero y la T_g de este.

1.2.2. Cerámicas verdes o Low Temperature Co-Fired Ceramics (LTCC)

Desde su origen, la tecnología LTCC ha sido ampliamente utilizada, principalmente por la industria militar, espacial, computacional y automovilística, para la fabricación de circuitos electrónicos multicapa, debido a sus excelentes propiedades eléctricas, mecánicas y térmicas.^{50,145-148} El término "baja temperatura" de su nombre se corresponde a las bajas temperaturas requeridas

para realizar el proceso de sinterización (cocido) de la cerámica, que tiene lugar a temperaturas por debajo de 1000 °C. Por su parte, el término “co-sinterizado” se refiere a la posibilidad de sinterizar simultáneamente pastas serigráficas conductoras sinterizables junto al sustrato cerámico, ya que ambos compuestos son completamente compatibles. Este hecho resulta en la obtención de dispositivos complejos, de reducido tamaño y alto nivel de integración.

A lo largo de la última década, este material se ha extendido al desarrollo de microanalizadores (bio)analíticos.^{49,50,86,87,112,147,149} Su compatibilidad con gran cantidad de materiales conductores, la facilidad de integración de componentes electrónicos y la sencillez y la rapidez del prototipado de estructuras microfluídicas tridimensionales mediante aproximación multicapa, han sido las ventajas que se han explotado para conseguirlo. Estas características permiten obtener microsistemas analíticos altamente resistentes química y térmicamente, donde se integran monolíticamente la fluídica y la electrónica.^{147,150}

Las cerámicas LTCC se conocen también como cerámicas verdes. A pesar de esto, el color de las cerámicas es azul, debido a su contenido en sales de cobalto. El motivo de su nombre se debe a que tienen que ser manipuladas en estado “verde”, cuando aún son maleables y mecanizables, ya que una vez sinterizadas adquieren su dureza característica y es imposible trabajar el material. La composición de las cerámicas verdes varía en función de la casa comercial y el uso que se las vaya a dar. En este sentido, las cerámicas verdes DuPont, usadas en este trabajo, están compuestas por un 45 % de Al_2O_3 , un 40 % de SiO_2 , un 15 % de compuestos orgánicos y trazas de sales de cobalto, cosa que las confiere el color azul característico.^{50,87} Entre los compuestos orgánicos que constituyen las cerámicas se encuentran el disolvente, el plastificante y aglutinantes. El disolvente ayuda a dispersar las partículas de alúmina, confiere al material una viscosidad adecuada y disuelve los aditivos orgánicos. Por su parte, el plastificante otorga flexibilidad a la capa de cerámica para que pueda ser manipulada. Por último, el aglutinante se encarga de que las partículas de alúmina y sílice se mantengan unidas y homogéneas.¹⁴⁶

La cerámica se comercializa en capas o láminas de distintos grosores en la escala micrométrica. El proceso de fabricación de esta es muy sencillo. Una vez se ha escogido la composición que tendrá la cerámica, esta se deposita sobre una lámina de Mylar® que se encuentra en una cinta transportadora. Finalmente, mediante un proceso de cocido suave se evaporan la suficiente cantidad de disolventes orgánicos como para que la cerámica quede manejable, estado en que se comercializa.^{50,151}

Durante el proceso de sinterizado, donde el material se somete a temperaturas alrededor de los 850 °C, los componentes orgánicos se volatilizan por completo y las partículas de vidrio se funden, rodeando las partículas de alúmina por fuerzas de tensión superficial y capilaridad.¹⁵² La vitrificación del SiO_2 , cuando el dispositivo

se lleva de nuevo a temperatura ambiente, da como resultado una estructura rígida. Puesto que durante este proceso se provoca la eliminación de los componentes orgánicos, la cerámica sufre un encogimiento cuya magnitud depende de su composición inicial. Así, mediante la consulta del porcentaje de encogimiento proporcionado por el fabricante, este se puede tener presente en el diseño inicial de la estructura de los microanalizadores, para obtener las dimensiones finales deseadas. En la tabla 1.2 se recogen algunas propiedades de las cerámicas verdes.

Tabla 1. 2. Propiedades de las cerámicas verdes Dupont utilizadas.^{153,154}

Propiedad	Unidades	LTCC Dupont 961
Encogimiento en el plano XY	%	12.7 ± 0.3
Encogimiento en el eje Z	%	15 ± 0.5
Densidad	g cm ⁻³	3.1
Rugosidad superficial	µm	0.35
Conductividad térmica	W K ⁻¹ m ⁻¹	3.3
Resistencia eléctrica	Ω	>10 ¹²

Relacionado con este tema, la misma casa comercial Dupont, ha desarrollado una serie de materiales conductores que al tener la misma matriz que la cerámica son completamente compatibles con esta. Así, se pueden depositar pistas conductoras con total garantía, sin temer a la aparición de fracturas en las líneas conductoras provocadas por porcentajes de encogimiento diferentes entre sustrato y material conductor.

Como se ha visto anteriormente, son muchas y relevantes las ventajas que ofrecen las cerámicas verdes en el desarrollo de microsistemas analíticos. Sin embargo, presentan también algunas limitaciones como son la opacidad y la lixiviación a nivel de trazas de compuestos tóxicos (como metales pesados presentes en el material) que requieren de un lavado previo de los microcanales para su uso en aplicaciones biológicas.

El GSB ha contribuido a extender la aplicación de esta tecnología LTCC en el ámbito de la microfluídica y en particular en el desarrollo de microanalizadores, siendo uno de los grupos de investigación pioneros en su uso. Esto ha dado lugar a la fabricación de múltiples microsistemas analíticos para una gran cantidad de aplicaciones. En la figura 1.14 se muestra, a modo de ejemplo, la imagen de un microsistema amperométrico desarrollado en el GSB que integra la plataforma microfluídica y la electrónica asociada necesaria para la adquisición y procesado de los datos.

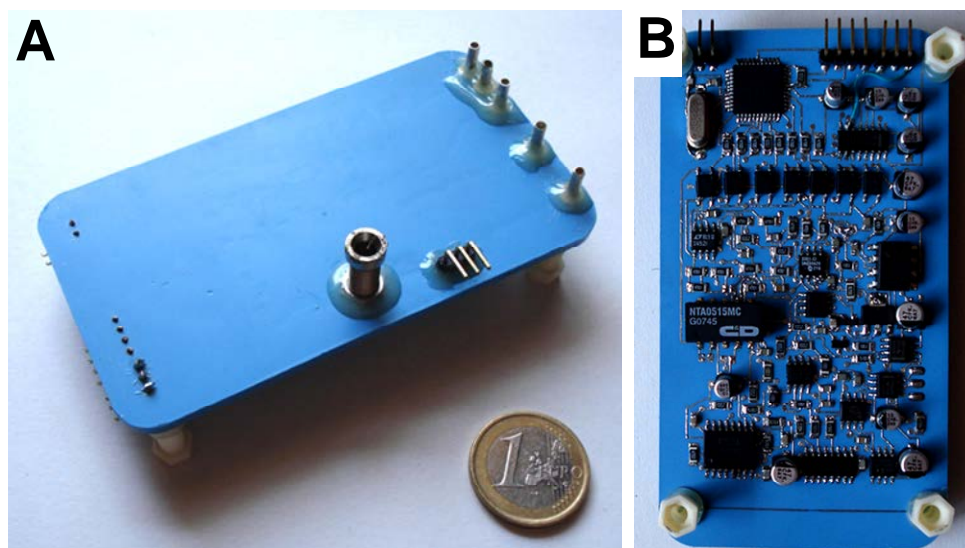


Figura 1.15. Microanalizador fabricado en LTCC con determinación amperométrica: A) visión de la parte superior del microdispositivo con la fluidica y el sistema de detección. B) imagen de la parte inferior con toda la electrónica asociada al potencióstato.¹⁴⁷

1.3. Tecnologías de microfabricación

Existen gran cantidad de técnicas de microfabricación para desarrollar tanto microsistemas analíticos poliméricos como cerámicos.^{87,134,155} Por lo general, estas se pueden clasificar en tres grandes bloques: técnicas de microestructuración, de integración de electrodos y de sellado.

1.3.1. Técnicas de microestructuración

Las técnicas de microestructuración son aquellas que permiten obtener las estructuras y motivos en el sustrato, ya sean microcanales, cámaras de detección o otros.

En el caso de los polímeros, y más concretamente en el caso del COC, estas se pueden subdividir en dos grandes familias: las técnicas de réplica y las de micromecanizado directo. Las de réplica son muy utilizadas en producción en masa debido a su rapidez de fabricación y a su relativo bajo coste. Las más utilizadas son el estampado en caliente (*hot embossing*) y el moldeo por inyección (*injection moulding*). El estampado en caliente es un método bien establecido y descrito en la bibliografía,^{156,157} el cual proporciona unas buenas características de fabricación. Se basa en la estampación, por medio de un sello, del diseño deseado sobre el polímero aplicando una cierta presión y una temperatura ligeramente por encima de la T_g , las cuales deben determinarse para cada caso.⁴³ El sello debe contener el diseño que se quiere estampar en el sustrato y debe estar compuesto por un material que

aguante la temperatura y presión aplicadas sin deformarse. Acostumbran a usarse materiales metálicos para su fabricación, aunque recientemente se están incorporando materiales cerámicos.^{90,142,158}

Por su parte, el moldeo por inyección se basa en fundir el material, normalmente en forma granular o pellet, en el interior de un cilindro e inyectarlo en interior de un molde cerrado mediante alta presión. Finalmente se baja la temperatura por debajo del T_g del sustrato y se desmolda, obteniéndose el dispositivo con la estructura deseada. Debido a sus propiedades, el COC es especialmente recomendado para el moldeo por inyección.^{43,142,155}

Sin embargo, en procesos de prototipado, como los que se llevan a cabo en un contexto de investigación y desarrollo, estas técnicas son complicadas de utilizar, debido al alto coste de la maquinaria y al requisito de construir un nuevo molde cada vez que se quiere producir un prototipo diferente. Este proceso conlleva, por lo general, mucho tiempo. Para solucionar este problema, las técnicas que se utilizan son las conocidas como técnicas de micromecanizado directo. Esta categoría engloba el micromecanizado por ablación láser y por microfresado.

La ablación láser es una técnica de microfabricación extensamente utilizada para prototipado rápido, que permite obtener motivos microestructurados con alta precisión y rapidez. Se basa en el uso de un láser, normalmente de IR, cuyo haz es enfocado sobre la superficie del sustrato a mecanizar. La energía de este es absorbida por el polímero, rompiendo sus enlaces moleculares y volatilizando los fragmentos desprendidos.^{132,134} Esta técnica proporciona buenos resultados de corte para la mayoría de polímeros termoplásticos como PMMA, PS o PC, sobre todo en cuanto a resolución. Esta viene determinada por el diámetro del haz del láser. Sin embargo, la elevada transparencia del COC en las regiones del espectro donde operan los láseres más comunes, provoca una baja interacción del polímero con la fuente láser, dando lugar a estructuras poco precisas y a residuos carbonizados depositados alrededor de la superficie del material mecanizado.^{90,159}

Alternativamente, el microfresado es la técnica más utilizada para la mecanización de COC en procesos de prototipado rápido.¹³² Este proceso consiste en transferir los motivos del diseño sobre el sustrato mediante la eliminación del material como resultado del uso de una herramienta de corte giratoria (fresa o broca). En este caso, las dimensiones de la herramienta utilizada afectarán tanto a la resolución como a la rugosidad de la superficie cortada.¹⁴² Existen gran cantidad de herramientas para realizar múltiples tipos de corte con distintos acabados. A pesar de ser una técnica relativamente lenta en el proceso de corte, permite una gran rapidez en procesos de prototipado, ya que se pueden cambiar los motivos del diseño fácilmente en poco tiempo.

En cuanto a las técnicas de microfabricación de dispositivos cerámicos, al estar el sustrato suministrado en forma de láminas, las más utilizadas son el micromecanizado por microfresado y por ablación láser, explicadas anteriormente. En este caso, el corte por ablación láser usando una longitud de onda IR es el que mejor resultados proporciona en cuanto a resolución, acabados y tiempo de proceso, ya que los parámetros de corte en cerámica están bien estudiados y la interacción entre láser y material cerámico (opaco) es buena.^{87,148}

En este trabajo se ha utilizado la ablación láser para mecanizar los microsistemas cerámicos y el microfresado para mecanizar los microanalizadores poliméricos.

1.3.2. Técnicas de integración de electrodos

Una vez se dispone del sustrato con todas las estructuras fluidicas mecanizadas, en muchas ocasiones es necesario depositar materiales dieléctricos o conductores sobre la superficie de este para integrar circuitos eléctricos, electrodos, sensores, actuadores, termistores, resistores, conectores eléctricos o cualquier otro tipo de elemento que requiera de un material conductor para funcionar.¹⁶⁰

Tanto para sustratos poliméricos como para cerámicos, se pueden usar las mismas técnicas de integración de materiales conductores. Entre estas se encuentran técnicas de capa fina (*thick-film*), como la pulverización (*sputtering*) y la evaporación, y de capa gruesa (*thick-film*), como la serigrafía (*screen-printing*).^{43,87,151,161}

Las técnicas de deposición de capa fina son las más clásicas y utilizadas para la obtención de electrodos y pistas conductoras. Estas son especialmente importantes en la tecnología microelectrónica pero su uso se ha ampliado a materiales diferentes del silicio. En el caso de la pulverización, se utiliza un plasma de algún gas noble, normalmente argón, que es proyectado sobre el material conductor que se quiere depositar. El impacto provoca la liberación de átomos de este material los cuales se depositan sobre el sustrato (polimérico o cerámico), condensándose en la superficie y formando una fina capa.⁴³ Este proceso es un proceso isotrópico en el que los átomos pulverizados emitidos en la fase gaseosa tienden a depositarse sobre todas las superficies. En el caso de la evaporación, el material a depositar se evapora en condiciones de vacío. Esta evaporación puede llevarse a cabo mediante varias técnicas entre las que destaca el uso de un haz de electrones (*e-beam evaporation*).¹⁶² Cuando el material evaporado entra en contacto con el sustrato, se condensa y vuelve a su estado sólido, formando una capa fina. La temperatura alcanzada con la evaporación podría ser realmente alta, lo que limita el tipo de sustrato, sobre todo en los poliméricos, donde solo pueden usarse aquellos con T_g

elevadas. Aunque estas técnicas alcanzan una buena resolución, su uso está limitado por la necesidad de equipamientos e infraestructura muy costosa.^{43,160}

En su lugar, la serigrafía ofrece una alternativa a bajo coste para realizar este tipo de deposiciones de materiales conductores tanto sobre polímeros como cerámicas.^{87,152} Esta consiste en una técnica de impresión en la que una pasta que contiene partículas del material conductor es forzada a pasar a través de una malla con el diseño que se quiere transferir, en negativo. De esta manera, la pasta pasa a través de las oberturas que tiene la malla, depositándose sobre el sustrato. Posteriormente, la malla se retira y la pasta se seca, evaporando el disolvente.¹⁶⁰ A pesar de tener una resolución inferior a las técnicas de capa fina, es la más ampliamente utilizada para integrar electrodos, por su sencillez, rapidez y bajo coste del proceso. Por este motivo es la técnica que se ha utilizado en este trabajo para integrar pistas conductoras.

1.3.3. Técnicas de sellado

En procesos de fabricación basados en una aproximación multicapa, una vez que las capas de sustrato tienen mecanizadas todas las estructuras e integrados todos los componentes necesarios, tras la superposición y alineamiento de estas, se procede al sellado de las mismas, con la finalidad de obtener un dispositivo compacto, hermético y sin fugas. Para realizar esta etapa, cada material tiene sus técnicas. En el caso de los polímeros se utilizan diferentes metodologías de sellado, como soldadura por láser, soldadura por ultrasonidos, laminación por termocompresión o utilizando disolventes o adhesivos.

Las técnicas de soldadura por láser y por ultrasonidos se basan en la unión mediante la fusión localizada del sustrato provocada por el calor generado por un haz láser o por una onda ultrasónica. El problema que plantean estas técnicas es que al tener que inducir la fusión muy cerca de los microcanales u otras estructuras, estos se pueden deformar o incluso obturar, y además consume mucho tiempo.^{134,160}

En cuanto al uso de adhesivos o disolventes, estos son usados extensamente en estructuras simples por su sencillez y bajo coste. Sin embargo, la obstrucción de canales o la alteración de sus dimensiones son sus principales inconvenientes. Estos se magnifican cuando se incrementa la complejidad de las estructuras o se disminuye el tamaño de los canales.^{43,142,160}

Por último, la técnica más utilizada y descrita en la bibliografía es la laminación por termocompresión.^{43,134,142,163} Esta se aplica para entrecruzar las cadenas de polímero de las distintas capas de sustrato que se encuentran en contacto. Tradicionalmente, puesto que se utilizaba el mismo sustrato con la misma T_g , al aplicar temperatura y presión se podía provocar la deformación de las estructuras

del microanalizador si no se controlaban bien los parámetros de operación.¹⁶³ Para superar este inconveniente se ha sacado provecho de las privilegiadas propiedades que presenta el COC. Al poder ser formulado con distintas T_g , lo que se suele hacer es utilizar una lámina con T_g baja como capa de sellado entre las capas estructurales (que contienen los canales y demás estructuras del diseño), cuya T_g es superior.^{90,163} Así, mediante la aplicación de presión y una temperatura superior a la T_g de la lámina sellante, se consigue la suficiente interpenetración de cadenas de polímeros para conseguir un sellado eficaz y resistente, pero sin provocar la deformación u obturación de los canales ya que la capa estructural de sustrato no se vuelve viscosa en ningún momento.

En cuanto al sellado de los microanalizadores fabricados con cerámica, la única técnica posible está bien definida.^{50,87,148} Esta aprovecha el proceso de sinterizado o cocido del propio material para obtener una estructura sellada y hermética mediante la fusión del vidrio y su interpenetración entre las partículas de alúmina. Con anterioridad se debe llevar a cabo un proceso de laminación con la finalidad de evaporar parcialmente los disolventes orgánicos y fijar así las estructuras.

En este trabajo se ha utilizado la laminación por termocompresión para sellar los dispositivos poliméricos y la laminación seguida de la sinterización para sellar los dispositivos cerámicos.

1.4. Áreas y campos de aplicación de los microsistemas

En el desarrollo de los microsistemas que se presentan a lo largo de la tesis, la miniaturización no solo es una ventaja sino que es la clave para poder explorar ámbitos de aplicación donde se requiere información en tiempo real, distribuida espacialmente, fuera de los laboratorios de análisis convencionales. Así, a lo largo de la tesis se podrá constatar cómo esta miniaturización ha aportado portabilidad y autonomía, permitiendo el desarrollo de microanalizadores de bajo coste con aplicaciones en el área aeroespacial (en sistemas de reciclado de agua en órbita), medioambiental (en estaciones autónomas de seguimiento de indicadores de calidad de agua), industrial (para monitorizar los procesos de tratamiento de agua en estaciones depuradoras de aguas residuales, a pie de proceso), alimentaria (en procesos de fermentación en bodegas y compañías cerveceras) y biomédica (en sistemas de control *point-of-care* al lado del paciente).

1.5. Referencias

1. Valcárcel, M. Quo vadis, analytical chemistry? *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 13–21 (2016).
2. Valcárcel, M. A modern definition of analytical chemistry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **16**, 124–131 (1997).
3. Kellner, R., Mermet, J.-M., Otto, M., Valcárcel, M. & Widmer, H. M. *Analytical chemistry: a modern approach to analytical science*. (Wiley, 2004).
4. Karayannis, M. I. & Efstathiou, C. E. Significant steps in the evolution of analytical chemistry—Is the today's analytical chemistry only chemistry? *Talanta* **102**, 7–15 (2012).
5. Elving, P. J. Analytical Process in Chemistry. *Anal. Chem.* **22**, 962–965 (1950).
6. Tölg, G., Günzler, H. & Williams, A. in *Encyclopedia of Industrial Chemistry* **3**, 387–408 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2012).
7. Alegret, S. Chapter 1 Integration, a new paradigm in analytical chemistry. *Compr. Anal. Chem.* 1–36 (2003).
8. Widmer, H. M. Trends in industrial analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* **2**, 1–3 (1983).
9. Jakeway, S. C., de Mello, A. J. & Russell, E. L. Miniaturized total analysis systems for biological analysis. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **366**, 525–539 (2000).
10. Kopp, M. U., Crabtree, H. J. & Manz, A. Developments in technology and applications of microsystems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 410–419 (1997).
11. Manz, A., Widmer, H. M. & Graber, N. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors Actuators B Chem.* **1**, 244–248 (1990).
12. Manz, A. *et al.* Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. Capillary electrophoresis on a chip. *J. Chromatogr. A* **593**, 253–258 (1992).
13. van den Berg, A. & Bergveld, P. Labs-on-a-Chip: origin, highlights and future perspectives. On the occasion of the 10th microTAS conference. *Lab Chip* **6**, 1266–1273 (2006).
14. Ríos, Á. & Zougagh, M. Modern qualitative analysis by miniaturized and microfluidic systems. *Trends Anal. Chem.* **69**, 105–113 (2015).
15. Patabadige, D. E. W. *et al.* Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications. *Anal. Chem.* **88**, 320–338 (2016).

16. Culbertson, C. T., Mickleburgh, T. G., Stewart-James, S. A., Sellens, K. A. & Pressnall, M. Micro total analysis systems: fundamental advances and biological applications. *Anal Chem* **86**, 95–118 (2014).
17. Ríos, Á., Zougagh, M. & Avila, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. *Anal. Chim. Acta* **740**, 1–11 (2012).
18. Arora, A., Simone, G., Salieb-Beugelaar, G. B., Kim, J. T. & Manz, A. Latest developments in micro total analysis systems. *Anal. Chem.* **82**, 4830–47 (2010).
19. West, J., Becker, M., Tombrink, S. & Manz, A. Micro total analysis systems: latest achievements. *Anal. Chem.* **80**, 4403–19 (2008).
20. Haeberle, S. & Zengerle, R. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip* **7**, 1094–1110 (2007).
21. Dittrich, P. S., Tachikawa, K. & Manz, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Anal. Chem.* **78**, 3887–908 (2006).
22. Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. A. & Manz, A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal. Chem.* **74**, 2623–2636 (2002).
23. Auroux, P.-A., Iossifidis, D., Reyes, D. R. & Manz, A. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Anal. Chem.* **74**, 2637–52 (2002).
24. Simonet, B., Rios, A. & Escarpa, A. *Miniaturization in Analytical Chemistry. Analytical Chemistry* (John Wiley & Sons, 2009).
25. Levis, L. Mimicking Organs. *Harv. Mag.* **Febrero**, 12–14 (2016).
26. Bruus, H. *Theoretical Microfluidic*. (Oxford University Press Inc, 2008).
27. Lin, B. *Microfluidics Technologies: Technologies and Applications. Topics in Current Chemistry* **304**, (Springer, 2011).
28. Serrano Velasquez, D. Técnica de escritura directa con láser para la realización de sistemas de microfluídica (tesis doctoral). (Universitat de Barcelona, 2012).
29. Ong, S.-E., Zhang, S., Du, H. & Fu, Y. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. *Front. Biosci.* **13**, 2757–73 (2008).
30. Rios, A., Escarpa, A. & Simonet, B. in *Miniaturization of Analytical Systems: Principles, Designs and Applications* 281–343 (John Wiley & Sons, 2009).
31. Beebe, D. J., Mensing, G. a & Walker, G. M. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**, 261–286 (2002).

32. Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F. & Zengerle, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1153 (2010).
33. Haeberle, S., Mark, D., Stetten, F. von & Zengerle, R. in *Microsystems and Nanotechnology* 852–895 (2012).
34. Lynn, N. S. & Dandy, D. S. Passive microfluidic pumping using coupled capillary/evaporation effects. *Lab Chip* **9**, 3422–3429 (2009).
35. Gravesen, P., Branebjerg, J. & Jensen, O. S. Microfluidics-a review. *J. Micromech. Microeng.* **3**, 168–182 (1993).
36. Strohmeier, O. *et al.* Centrifugal microfluidic platforms: advanced unit operations and applications. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 6187–6229 (2015).
37. Münchow, G., Dadic, D., Doffing, F., Hardt, S. & Drese, K.-S. Automated chip-based device for simple and fast nucleic acid amplification. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **5**, 613–20 (2005).
38. Guttenberg, Z. *et al.* Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump. *Lab Chip* **5**, 308–17 (2005).
39. Suzuki, H. & Yoneyama, R. Integrated microfluidic system with electrochemically actuated on-chip pumps and valves. *Sensors Actuators, B Chem.* **96**, 38–45 (2003).
40. Gui, L. & Ren, C. L. Numeric Simulation of Heat Transfer and Electrokinetic Flow in an Electroosmosis-Based Continuous Flow PCR Chip Numeric Simulation of Heat Transfer and Electrokinetic Flow in an Electroosmosis-Based Continuous Flow PCR Chip. *Anal. Chem.* **78**, 6215–6222 (2006).
41. Iverson, B. D. & Garimella, S. V. Recent advances in microscale pumping technologies: A review and evaluation. *Microfluid. Nanofluidics* **5**, 145–174 (2008).
42. Zhang, C., Xing, D. & Li, Y. Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends. *Biotechnol. Adv.* **25**, 483–514 (2007).
43. Svendsen, W. E. *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems: a practical guide.* (Springer, 2015).
44. Nguyen, N.-T. & Wu, Z. Micromixers—a review. *J. Micromechanics Microengineering* **15**, R1–R16 (2005).
45. Mansur, E. A., Mingxing, Y. E., Yundong, W. & Youyuan, D. A. I. A State-of-the-Art Review of Mixing in Microfluidic Mixers *. *Chinese J. Chem. Eng.* **16**, 503–516 (2008).

46. Nge, P. N., Rogers, C. I. & Woolley, A. T. Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. *Chem. Rev.* **113**, 2550–2583 (2013).
47. Chiu, Y. *et al.* Universally applicable three-dimensional hydrodynamic microfluidic flow focusing. *Lab Chip* **13**, 1803–9 (2013).
48. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–73 (2006).
49. Martínez-Cisneros, C. S. *Microsistemas Analíticos Basados en la Tecnología LTCC. Diseño, fabricación, integración y evaluación de plataformas microfluídicas y electrónicas (Tesis doctoral).* (Universitat Autònoma de Barcelona, 2010).
50. Ibáñez-García, N. *Miniaturización de analizadores químicos mediante la tecnología LTCC (Tesis doctoral).* (Universitat Autònoma de Barcelona, 2007).
51. Arasa, E. *Estratègies per a la monitorització de plom en mostres mediambientals emprant sensors electroquímics i (micro)sistemes analítics (tesis doctoral).* (Universitat Autònoma de Barcelona, 2015).
52. Gómez-de Pedro, S. *(Bio)analytical microsystems based on the use of nanoparticles (tesis doctoral).* (Universitat Autònoma de Barcelona, 2014).
53. Temiz, Y., Lovchik, R. D., Kaigala, G. V. & Delamarche, E. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectron. Eng.* **132**, 156–175 (2015).
54. Fredrickson, C. K. & Fan, Z. H. Macro-to-micro interfaces for microfluidic devices. *Lab Chip* **4**, 526–533 (2004).
55. Prados-Rosales, R. C., Luque-García, J. L. & Luque de Castro, M. D. Propelling devices: The heart of flow injection approaches. *Anal. Chim. Acta* **461**, 169–180 (2002).
56. Trojanowicz, M. & Kolacinska, K. Recent Advances in Flow Injection Analysis. *Analyst* **141**, 2085–2139 (2016).
57. Ruzicka, J. & Hansen, E. H. Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis. *Analytica Chimica Acta* **78**, 145–157 (1975).
58. Weeks, D. A. & Johnson, K. S. Solenoid pumps for flow injection analysis. *Anal. Chem.* **68**, 2717–9 (1996).
59. Santos, J. L. M., Ribeiro, M. F. T., Dias, A. C. B., Lima, J. L. F. C. & Zagatto, E. E. A. Multi-pumping flow systems: The potential of simplicity. *Anal. Chim. Acta* **600**, 21–28 (2007).
60. *Biochem Fluidics brochure.*

61. Llorent-Martinez, E. J., Barrales, P. O., Fernandez-de Cordova, M. L. & Ruiz-Medina, A. Multicommutation in Flow Systems: A Useful Tool for Pharmaceutical and Clinical Analysis. *Curr. Pharm. Anal.* **6**, 53–65 (2010).
62. Ferrer, L., Avivar, J. & Cerda, A. *Flow analysis: A practical guide*. (Elsevier B.V. All, 2014).
63. Rocha, D. L. & Rocha, F. R. P. A flow-based procedure with solenoid micro-pumps for the spectrophotometric determination of uric acid in urine. *Microchem. J.* **94**, 53–59 (2010).
64. Henríquez, C., Horstkotte, B. & Cerdà, V. A highly reproducible solenoid micropump system for the analysis of total inorganic carbon and ammonium using gas-diffusion with conductimetric detection. *Talanta* **118**, 186–194 (2014).
65. de Souza, G. C. S., Bezerra da Silva, P. A., Leotério, D. M. da S., Paim, A. P. S. & Lavorante, A. F. A multicommutated flow system for fast screening/sequential spectrophotometric determination of dichromate, salicylic acid, hydrogen peroxide and starch in milk samples. *Food Control* **46**, 127–135 (2014).
66. Rocha, D. L., Machado, M. C. & Melchert, W. R. A sensitive flow-based procedure for spectrophotometric speciation analysis of inorganic bromine in waters. *Talanta* **129**, 93–99 (2014).
67. Frizzarin, R. M. & Rocha, F. R. P. An improved approach for flow-based cloud point extraction. *Anal. Chim. Acta* **820**, 69–75 (2014).
68. de Andrade, M. F., de Assis, S. G. F., Paim, A. P. S. & dos Reis, B. F. Multicommutated Flow Analysis Procedure for Total Polyphenols Determination in Wines Employing Chemiluminescence Detection. *Food Anal. Methods* 1–10 (2013).
69. Lapa, R. A. S., Lima, J. L. F. C., Reis, B. F., Santos, J. L. M. & Zagatto, E. A. G. Multi-pumping in flow analysis: Concepts, instrumentation, potentialities. *Anal. Chim. Acta* **466**, 125–132 (2002).
70. Lima, J. L. F. C., Santos, J. L. M., Dias, A. C. B., Ribeiro, M. F. T. & Zagatto, E. A. G. Multi-pumping flow systems: An automation tool. *Talanta* **64**, 1091–1098 (2004).
71. Morales-Rubio, Á., de la Guardia, M. & Reis, B. F. dos. Multi-commutation in spectrometry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **28**, 903–913 (2009).
72. Rocha, F. R. P., Infante, C. M. C. & Melchert, W. R. A Multi-purpose Flow System Based on Multi-commutation. *Spectrosc. Lett.* **39**, 651–668 (2006).

73. Feres, M. A., Fortes, P. R., Zagatto, E. A. G., Santos, J. L. M. & Lima, J. L. F. C. Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications. *Anal. Chim. Acta* **618**, 1–17 (2008).
74. Lichtenberg, J., Se Rooij, N. F. & Verpoorte, E. Sample pretreatment on microfabricated devices. *Talanta* **56**, 233–266 (2002).
75. Pamme, N. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab Chip* **7**, 1644 (2007).
76. Miró, M. & Frenzel, W. A novel flow-through microdialysis separation unit with integrated differential potentiometric detection for the determination of chloride in soil samples. *Analyst* **128**, 1291–1297 (2003).
77. Miró, M., Oliveira, H. M. & Segundo, M. A. Analytical potential of mesofluidic lab-on-a-valve as a front end to column-separation systems. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **30**, 153–164 (2011).
78. de Jong, J., Lammertink, R. G. H. & Wessling, M. Membranes and microfluidics: a review. *Lab Chip* **6**, 1125 (2006).
79. Oliveira, S. M., Lopes, T. I. M. S., Tóth, I. V. & Rangel, A. O. S. S. A multi-commuted flow injection system with a multi-channel propulsion unit placed before detection: Spectrophotometric determination of ammonium. *Anal. Chim. Acta* **600**, 29–34 (2007).
80. Lee, J., Kim, Y., Lee, S. & Jo, K. Visualization of large elongated DNA molecules. *Electrophoresis* **36**, 2057–2071 (2015).
81. Park, B. H., Kim, Y. T., Jung, J. H. & Seo, T. S. Integration of sample pretreatment, μ PCR, and detection for a total genetic analysis microsystem. *Microchim. Acta* **181**, 1655–1668 (2014).
82. Wang, J. H., Wang, C. H. & Lee, G. Bin. Sample pretreatment and nucleic acid-based detection for fast diagnosis utilizing microfluidic systems. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 1367–1383 (2012).
83. Chen, D. *et al.* An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids. *Biomed. Microdevices* **12**, 705–719 (2010).
84. Al Lawati, H. A. J. Flow-based analysis using microfluidics-chemiluminescence systems. *Luminescence* **28**, 618–627 (2013).
85. Lin, C. C., Hsu, J. L. & Lee, G. Bin. Sample preconcentration in microfluidic devices. *Microfluid. Nanofluidics* **10**, 481–511 (2011).
86. Ibáñez-García, N. *et al.* Biparametric Potentiometric Analytical Microsystem Based on the Green Tape Technology. *Electroanalysis* **22**, 2376–2382 (2010).

87. Ibáñez-García, N., Alonso, J., Martínez-Cisneros, C. S. & Valdés, F. Green-tape ceramics. New technological approach for integrating electronics and fluidics in microsystems. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 24–33 (2008).
88. Ibáñez-García, N. Miniaturización de analizadores químicos mediante la tecnología LTCC. (Universitat Autònoma de Barcelona, 2007).
89. Ymbern, O. *et al.* Versatile lock and key assembly for optical measurements with microfluidic platforms and cartridges. *Anal. Chem.* **87**, (2015).
90. Ymbern, O. Development of centrifugal microfluidic platforms based on polymer microfabrication technology (tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2015).
91. Ymbern, O. *et al.* Versatile lock and key assembly for optical measurements with microfluidic platforms and cartridges. *Anal. Chem.* **87**, 1503–1508 (2015).
92. Gómez-De Pedro, S. *et al.* Optical microfluidic system based on ionophore modified gold nanoparticles for the continuous monitoring of mercuric ion. *Sensors Actuators, B Chem.* **194**, 19–26 (2014).
93. Ymbern, O., Sández, N., Calvo-López, A., Puyol, M. & Alonso-Chamarro, J. Gas diffusion as a new fluidic unit operation for centrifugal microfluidic platforms. *Lab Chip* **14**, (2014).
94. da Rocha, Z. M. *et al.* Compact and autonomous multiwavelength microanalyzer for in-line and in situ colorimetric determinations. *Lab Chip* **12**, 109 (2012).
95. S.Wolfbeis, O. *Frontiers in Chemical Sensors: Novel Principles and Technique. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors: Methods and Applications* (Springer Berlin Heidelberg, 2005).
96. Hulanicki, A., Geab, S. & Ingman, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **63**, 1247–1250 (1991).
97. Gründler, P. *Chemical sensors: An introduction for scientists and engineers. Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers* (Springer, 2007).
98. Massana, M. Desenvolupament d'analitzadors automàtics per a la monitorització de processos industrials i mediambientals (Tesis doctoral). (Universtat Autònoma de Barcelona, 2006).
99. Almeida, S. A. A. *et al.* Novel LTCC-potentiometric microfluidic device for biparametric analysis of organic compounds carrying plastic antibodies as ionophores: Application to sulfamethoxazole and trimethoprim. *Biosens. Bioelectron.* **30**, 197–203 (2011).

100. Ibanez-Garcia, N. *et al.* Continuous flow analytical microsystems based on low-temperature co-fired ceramic technology. Integrated potentiometric detection based on solvent polymeric ion-selective electrodes. *Anal. Chem.* **78**, 2985–2992 (2006).
101. Trojanowicz, M. Recent developments in electrochemical flow detections-A review Part II. Liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **688**, 8–35 (2011).
102. Hu, J., Stein, A. & Bühlmann, P. Rational design of all-solid-state ion-selective electrodes and reference electrodes. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **76**, 102–114 (2016).
103. Yin, T., Pan, D. & Qin, W. All-solid-state polymeric membrane ion-selective miniaturized electrodes based on a nanoporous gold film as solid contact. *Anal. Chem.* **86**, 11038–11044 (2014).
104. Thomas, J. D. R. *The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport. TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1**, (1982).
105. Alegret, S., Alonso, J., Bartroli, J. & Martinez-fabregas, E. Flow Injection System for On-line Potentiometric Monitoring of Ammonia in Freshwater Streams. *Analyst* **114**, 1443–1447 (1989).
106. Cha, G. S. *et al.* Electrochemical performance, biocompatibility, and adhesion of new polymer matrices for solid-state ion sensors. *Anal. Chem.* **63**, 1666–1672 (1991).
107. Johnson, R. D. & Bachas, L. G. Ionophore-based ion-selective potentiometric and optical sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 328–341 (2003).
108. Irving, H. M. N. H., Freiser, H. & West, T. S. *Compendium of analytical nomenclature.* (Pergamon press, 1978).
109. Bakker, E., Bühlmann, P. & Pretsch, E. Polymer Membrane Ion - Selective Electrodes – What are the Limits? *Electroanalysis* **11**, 915–933 (1999).
110. De Marco, R. & Clarke, G. Ion-selective electrodes. *Electrodes* 103–109 (2009). doi:10.1021/ac00211a011
111. Gencoglu, A. & Minerick, A. R. Electrochemical detection techniques in micro- and nanofluidic devices. *Microfluid. Nanofluidics* **17**, 781–807 (2014).
112. Ibanez-Garcia, N. *et al.* Continuous Flow Analytical Microsystems Based on Low-Temperature Co-Fired Ceramic Technology. Integrated Potentiometric Detection Based on Solvent Polymeric Ion-Selective Electrodes. *Anal. Chem.* **78**, 2985–2992 (2006).
113. Dohner, R. E., Wegmann, D., Morf, W. E. & Simon, W. Reference electrode with free-flowing free diffusion liquid junction. *Anal. Chem.* **58**, 2585–2589 (1986).

114. Alonso-Chamarro, J., Bartroli, J. & Jimenez, C. Nitrate ion-selective electrode as reference electrode for flow-injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **261**, 419–423 (1992).
115. Buck, R. P. & Lindner, E. Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes. *Pure Appl. Chem.* **66**, 2527–2536 (1994).
116. Umezawa, Y., Umezawa, K. & Sato, H. Selectivity coefficients for Ion-Selective Electrodes: recommended methods for reporting $K_{A,B}^{pot}$ values. *Pure Appl. Chem.* **67**, 507–518 (1995).
117. Kleitz, W. G. T. A. J. M. *Sensors: Chemical and Biochemical Sensors*. **2**, (1991).
118. Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P. & Mitscher, L. a. Glossary of terms used in photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **70**, 1129–1143 (1998).
119. Harris, D. C. *Quantitative chemical analysis*. (W.H. Freeman and Company, 2001).
120. Dasgupta, P. K., Eom, I. Y., Morris, K. J. & Li, J. Light emitting diode-based detectors: Absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell. *Anal. Chim. Acta* **500**, 337–364 (2003).
121. Yang, F. B., Pan, J. Z., Zhang, T. & Fang, Q. A low-cost light-emitting diode induced fluorescence detector for capillary electrophoresis based on an orthogonal optical arrangement. *Talanta* **78**, 1155–1158 (2009).
122. de Lima, K. M. G. A portable photometer based on LED for the determination of aromatic hydrocarbons in water. *Microchem. J.* **103**, 62–67 (2012).
123. Pedro, S. G. *et al.* A ceramic microreactor for the synthesis of water soluble CdS and CdS/ZnS nanocrystals with on-line optical characterization. *Nanoscale* **4**, 1328 (2012).
124. O'Toole, M., Lau, K. T., Shepherd, R., Slater, C. & Diamond, D. Determination of phosphate using a highly sensitive paired emitter-detector diode photometric flow detector. *Anal. Chim. Acta* **597**, 290–294 (2007).
125. Oosterbroek, E. Modeling , Design and Realization of Microfluidic Components (tesis doctoral). *Universiteit Twente* (1996).
126. Thomsen, V., Schatzlein, D. & Mercurio, D. Limits of Detection in Spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* **18**, 112–114 (2003).
127. Of, I. U. & Chemistry, A. Commission on Spectrochemical and Other Optical Procedures for Analysis Units and Their Usage in Spectrochemical Analysis-Ii . **33**, 241–245 (1978).

128. Committee, A. M. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst* **112**, 199 (1987).
129. Petersen, K. E. Silicon as a Mechanical Material. *Proc. IEEE* **70**, 420–457 (1982).
130. Gardeniers, J. G. E., Oosterbroek, R. E. & van den Berg, A. in *Lab-on-a-chip* 27–64 (2003).
131. Bustillo, J. M., Howe, R. T., Muller, R. S. & Fellow, L. Surface Micromachining for Microelectromechanical Systems. *Proc. IEEE* **86**, (1998).
132. Waldbaur, A., Rapp, H., Länge, K. & Rapp, B. E. Let there be chip—towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes. *Anal. Methods* **3**, 2681 (2011).
133. Becker, H. & Locascio, L. E. Polymer microfluidic devices. *Talanta* **56**, 267–87 (2002).
134. Becker, H. & Gärtner, C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis* **21**, 12–26 (2000).
135. Xia, Y. N. & Whitesides, G. M. Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **37**, 551–575 (1998).
136. M. K. Ng., J., Gitlin, I., Stroock, A. D. & Whitesides, G. M. Review Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Electrophoresis* **23**, 3461–3473 (2002).
137. Mukhopadhyay, R. When PDMS isn't the best. *Anal. Chem.* **79**, 3248–3253 (2007).
138. This, P. & L, I. *Handbook of engineering and Specialty Thermoplastics*. (Scrivener Publishing LLC, 2012).
139. TOPAS. *Brochure TOPAS Cyclic Olefin Copolymer*. (2017).
140. Blochowiak, M. Structure and properties of norbornene-ethylene copolymers (Tesis doctoral). (Technical University of Łódź, 2006).
141. TOPAS. TOPAS COC datasheet. (2017).
142. Nunes, P. S., Ohlsson, P. D., Ordeig, O. & Kutter, J. P. Cyclic olefin polymers: Emerging materials for lab-on-a-chip applications. *Microfluid. Nanofluidics* **9**, 145–161 (2010).
143. Shin, J. Y., Park, J. Y., Liu, C., He, J. & Kim, S. C. Chemical structure and physical properties of cyclic olefin copolymers (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **77**, 801–814 (2005).
144. Schelcher, G. *et al.* Cyclic olefin copolymer plasma millireactors. *Lab Chip* **14**, 3037–42 (2014).

145. Wang, Y., Zhang, G. & Ma, J. Research of LTCC/Cu, Ag multilayer substrate in microelectronic packaging. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* **94**, 48–53 (2002).
146. Luo, X. J., Zhang, B. L., Li, W. L. & Zhuang, H. R. Effects of organic additives and glass on the properties of AlN/glass tape-casting slurries and green tapes. *J. Mater. Sci.* **39**, 4387–4389 (2004).
147. Martínez-Cisneros, C. S. *et al.* A monolithic continuous-flow microanalyzer with amperometric detection based on the green tape technology. *Anal. Chem.* **81**, 7448–53 (2009).
148. Gongora-Rubio, M. R. G., 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 And Actuators* **89**, 222–241 (2001).
149. Alves-Segundo, R., Ibañez-García, N., Baeza, M., Puyol, M. & Alonso-Chamarro, J. Towards a monolithically integrated microsystem based on the green tape ceramics technology for spectrophotometric measurements. Determination of chromium (VI) in water. *Microchim. Acta* **172**, 225–232 (2010).
150. Martínez-Cisneros, C. S., Ibañez-García, N., Valdés, F. & Alonso, J. Miniaturized total analysis systems: Integration of electronics and fluidics using low-temperature co-fired ceramics. *Anal. Chem.* **79**, 8376–8380 (2007).
151. Gongora-Rubio, M; Solá-Laguna, LM; Moffett, P. J. The utilization of low temperature co-fired ceramics (LTCC-ML) technology for meso-scale EMS , a simple thermistor based flow sensor. *Sensors And Actuators* **73**, 215–221 (1999).
152. Vasudev, A., Kaushik, A., Jones, K. & Bhansali, S. Prospects of low temperature co-fired ceramic (LTCC) based microfluidic systems for point-of-care biosensing and environmental sensing. *Microfluid. Nanofluidics* **14**, 683–702 (2013).
153. Dupont. *DuPont™ Green Tape™ 951 Technical Datasheet.* (2009).
154. Dupont. *DuPont™ GreenTape™: Design and Layout Guidelines.* (2009).
155. Tsao, C.-W. Polymer Microfluidics: Simple, Low-Cost Fabrication Process Bridging Academic Lab Research to Commercialized Production. *Micromachines* **7**, 225 (2016).
156. Leech, P. W. Hot embossing of cyclic olefin copolymers. *J. Micromechanics Microengineering* **19**, 1–5 (2009).
157. Jena, R. K. *et al.* Large-strain thermo-mechanical behavior of cyclic olefin copolymers: Application to hot embossing and thermal bonding for the

- fabrication of microfluidic devices. *Sensors Actuators, B Chem.* **155**, 93–105 (2011).
158. Berenguel-Alonso, M. *et al.* Rapid Prototyping of a Cyclic Olefin Copolymer Microfluidic Device for Automated Oocyte Culturing. *SLAS Technol.* 1–11 (2017).
159. Sabbert, D., Landsiedel, J., Bauer, H. D. & Ehrfeld, W. ArF-excimer laser ablation experiments on Cycloolefin Copolymer (COC). *Appl. Surf. Sci.* **150**, 185–189 (1999).
160. Becker, H. & Gärtner, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 89–111 (2008).
161. Murray, J. Sputter Deposition of Thin-Film Capacitors Onto Low Temperature Co-Fired Ceramic Substrates (Tesis de Máster). (Missouri University of Science and Technology, 2012).
162. Bowden, N., Brittain, S., Evans, A. G., Hutchinson, J. W. & Whitesides, G. M. Spontaneous formation of ordered structures in thin. *Nature* **393**, 146–149 (1998).
163. Steigert, J. *et al.* Rapid prototyping of microfluidic chips in COC. *J. Micromechanics Microengineering* **17**, 333–341 (2007).

Capítulo 2

Objetivos

El trabajo realizado en esta tesis tiene como objetivo principal el desarrollo de microanalizadores automatizados para la determinación, mediante medidas potenciométricas y ópticas, de parámetros químicos utilizando el conjunto de tecnologías de microfabricación existentes en el Grupo de Sensores y Biosensores (GSB) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Bajo este nexo común, y en el contexto de varios proyectos de investigación, se han desarrollado microanalizadores para la monitorización de distintos parámetros de interés, en muestras acuosas y biológicas, en el ámbito aeroespacial, medioambiental, industrial, alimentario y biomédico.

Las características requeridas por todos ellos se fundamentan en alcanzar un alto nivel de integración, miniaturización y automatización, con la finalidad de poder llevar a cabo análisis, in situ y en tiempo real, más rápidos y económicos, fuera del entorno controlado de los laboratorios convencionales.

Los objetivos parciales para alcanzar el objetivo principal han consistido en:

- Diseñar y fabricar plataformas de microfluídica capaces de integrar, miniaturizadas, las distintas operaciones unitarias necesarias para llevar a cabo el procedimiento analítico adecuado para cada aplicación estudiada.
- Evaluar cada uno de los microanalizadores desarrollados, optimizando y validando el funcionamiento de los diferentes elementos que lo componen, para adecuar las características de respuesta del dispositivo analítico a las peculiaridades propias de cada tipo de muestra y/o aplicación.
- Validar el funcionamiento de cada microanalizador mediante su aplicación al análisis de muestras reales, comparando los resultados obtenidos con aquellos proporcionados por los métodos de referencia.

Capítulo 3

Metodologías de microfabricación de los dispositivos analíticos

En la presente tesis se han diseñado, fabricado y evaluado diferentes dispositivos para su aplicación como microsistemas analíticos. Todo ello se ha realizado en los laboratorios de microfabricación del GSB, donde se dispone de la infraestructura necesaria para llevar a cabo satisfactoriamente todos los procesos y técnicas implicados, usando tanto la tecnología LTCC como la de polímeros.

La tecnología de cerámicas verdes o LTCC fue creada originalmente para producir circuitos integrados híbridos multicapa, que pueden incluir resistencias, inductores, condensadores y componentes activos en un mismo bloque. Los híbridos LTCC tienen un coste inicial menor en comparación con los circuitos integrados fabricados con tecnología microelectrónica, lo que los convierte en una alternativa atractiva para la integración a pequeña escala.¹ Sin embargo, en la última década, se ha extendido su uso a otros campos, gracias a la integración en su estructura de microcanales fluidicos. La combinación de circuitos electrónicos y elementos fluidicos ha abierto un enorme campo de aplicaciones en el área de la química analítica. Así, el GSB, realizó una apuesta pionera a nivel mundial, que luego han seguido otros grupos, por utilizar las cerámicas verdes, y su tecnología asociada, para el desarrollo de microsistemas (bio)analíticos.²⁻⁸ Esta apuesta se sustentó en las ventajas diferenciales que suministra la tecnología, asociadas con las propiedades mecánicas, químicas y eléctricas del sustrato, su compatibilidad con gran cantidad de materiales conductores, la facilidad de integración de componentes electrónicos y la sencillez y rapidez del prototipado de estructuras tridimensionales mediante la aproximación multicapa. Estas características permiten, integrando monolíticamente fluidica y electrónica en un solo sustrato, obtener microsistemas analíticos con una resistencia química y térmica muy alta y próximos del concepto ideal de microsistema de análisis total.

Por su parte, la tecnología de polímeros,⁹⁻¹¹ en este caso usando como sustrato COC, permite, también, la fabricación de estructuras microfluídicas de manera rápida y sencilla mediante la aproximación multicapa. Entre las características del COC cabría destacar una elevada resistencia química frente a un gran número de compuestos, su biocompatibilidad, la posibilidad de embeber en su estructura, mediante la aproximación multicapa, etapas de pretratamiento de muestra

(filtración, difusión gaseosa, etc.) y su elevada transparencia. Todo ello hace que este sea un material y una tecnología especialmente idóneos para la fabricación de microanalizadores con detección óptica o que requieran inspección visual.

La ventaja de disponer de dos tecnologías de fabricación diferentes, con distintos puntos fuertes y débiles, radica en que se puede escoger la que mejor encaje en función del tipo de aplicación planteada y de las necesidades que esta aplicación requiera.

En el presente capítulo se describirán las metodologías y procesos de microfabricación asociados a cada uno de los materiales. Todos ellos se han utilizado para la construcción, utilizando la infraestructura disponible en el GSB, de los microanalizadores que se presentarán a lo largo de esta tesis.

3.1. Tecnología de cerámicas verdes (LTCC)

El proceso de fabricación general para la construcción de microanalizadores basados en la tecnología LTCC, adaptación del protocolo de fabricación de circuitos electrónicos sobre cerámicas,¹² se encuentra esquematizado en la figura 3.1. Como se puede observar, el proceso se inicia con el diseño, mediante un software de diseño asistido por ordenador, de todas y cada una de las capas que constituirán el microsistema. Cada capa diseñada corresponderá a una capa de cerámica. A continuación, el diseño CAD es transferido al sistema de micromecanizado para

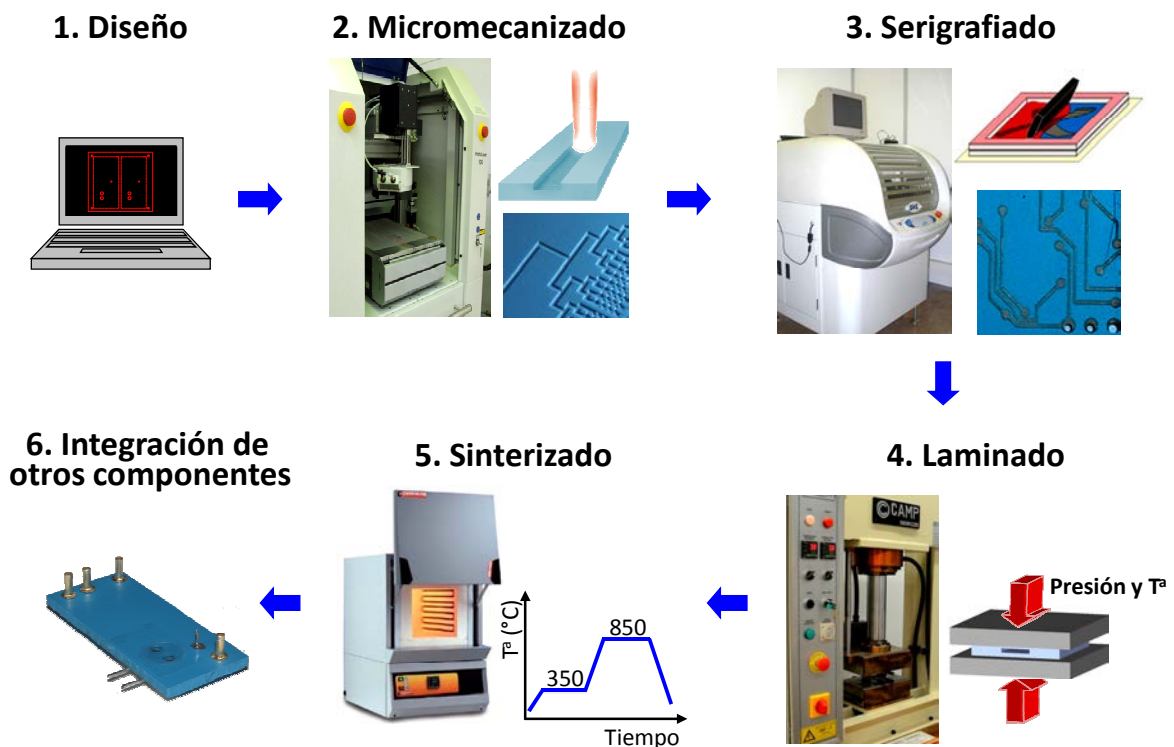


Figura 3.1. Esquema general del proceso de fabricación de dispositivos analíticos mediante la tecnología LTCC.

generar sobre la capa de material los motivos deseados. En el caso de que se requiriera de la integración de electrodos o pistas conductoras, se realiza el serigrafiado de las pastas conductoras sobre la capa correspondiente. Posteriormente, todas las capas se superponen en el orden adecuado, se alinean, se laminan y se sinterizan con la finalidad de obtener el dispositivo cerámico monolítico. Para finalizar, se integran los componentes que no son compatibles con el proceso de sinterización, obteniéndose el microsistema analítico final operativo. A continuación se describen con más detalle las diferentes etapas de fabricación.

3.1.1. Diseño

Como se ha mencionado previamente, la metodología de fabricación de los microanalizadores cerámicos se basa en una aproximación multicapa. Esto implica que se obtiene la estructura final por medio de la superposición de diferentes capas mecanizadas individualmente. Por ello, mediante el uso de un software de “diseño asistido por ordenador” (CAD), se diseñaron los motivos correspondientes en cada una de las diferentes capas de cerámica, de manera que al superponerlas, siguiendo un orden adecuado, se obtuvo como resultado la estructura tridimensional del microsistema deseada.

Para visualizar este concepto, en la figura 3.2 se muestra, a modo de ejemplo, el diseño sencillo de un micromezclador bidimensional, el cual está compuesto, como mínimo, por tres capas con motivos diferentes: una que actúa como base o tapa inferior (1), otra que tiene el diseño del micromezclador propiamente dicho (2) y otra que contiene los orificios de entrada y salida de los líquidos y que actúa a su vez de tapa superior del canal mezclador (3). Con este diseño, cuando los líquidos a mezclar fueran introducidos por las entradas, su trayectoria de flujo laminar,

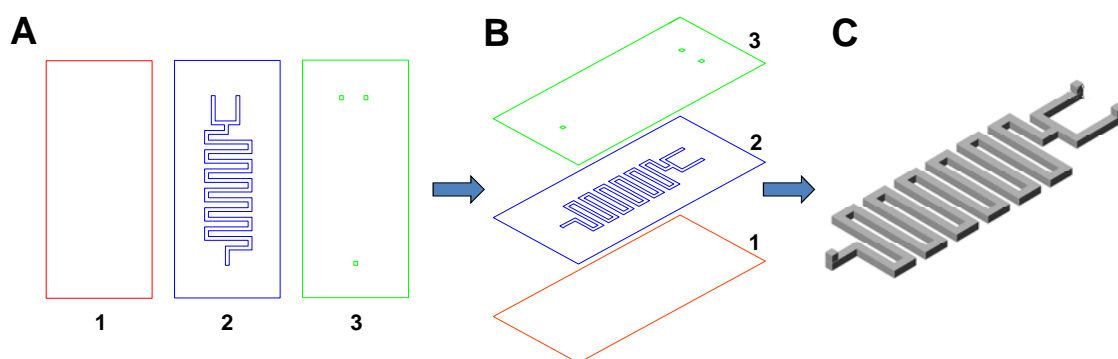


Figura 3.2. Diseño de un micromezclador pasivo en dos dimensiones basado en la aproximación multicapa utilizado la tecnología LTCC. **A)** Diferentes capas en la que se descompone el diseño tridimensional deseado, realizadas con un software tipo CAD. (1) capa que actúa como base; (2) capa que contiene el micromezclador; (3) capa que actúa como cubierta superior con unos orificios para la entrada y salida de los líquidos. **B)** Disposición de las capas por orden. **C)** Estructura tridimensional obtenida fruto de la superposición y unión de las distintas capas que conforman el diseño deseado.

característica a escala microfluídica, iría realizando giros de 90° en un mismo plano. Este hecho aumentaría la turbulencia en el fluido, permitiendo una mejora en la mezcla.

A lo largo de este trabajo se han utilizado capas de cerámica de la casa comercial Dupont con un grosor de $254 \pm 13 \mu\text{m}$ (Dupont™ Green Tape™ 951).¹³ En función del número de capas de las que constara el diseño, la estructura tridimensional final variaría, obteniendo los motivos diseñados, en este caso concreto, un micromezclador (Figura 3.2.C), con mayor o menor profundidad. En teoría, el número de capas a utilizar y sus grosores podrían ser modificados en función de lo que requiriera la aplicación final. Sin embargo, no se recomienda usar más de 20 capas debido a que se requerirían mayores tiempos de laminación y se incrementaría el riesgo de deformación de las estructuras y el deterioro de las pistas conductoras.

Una cuestión que hay que tener muy en cuenta al diseñar el microanalizador es el encogimiento que sufre la cerámica debido a la volatilización de sus componentes orgánicos durante la etapa de sinterizado. Según la casa comercial DuPont, el tipo de cerámica usada encoge un 12,7 % en el plano XY y un 15 % en el eje Z.¹³ Por tanto, el diseño se debe realizar teniendo en cuenta la reducción de dimensiones que sufrirán los dispositivos al finalizar el proceso de fabricación, sobre todo si se requiere embeber elementos que no tienen el mismo coeficiente de encogimiento.

El área máxima que podían ocupar los dispositivos vino determinada por el tamaño del material suministrado y por la superficie de las placas de aluminio necesarias para llevar a cabo el proceso de laminado (Figura 3.3). Por ello, para poder cubrir todos los requisitos de diseño, en el laboratorio de microfabricación se dispone de placas de alineamiento con distintas áreas de trabajo: 92 x 92, 100 x 100, 90 x 65, 165 x 92 y 150 x 150 mm. Al diseño de cada capa se le añadieron cuatro orificios ubicados en las esquinas del sustrato, denominados fiduciales, los cuales

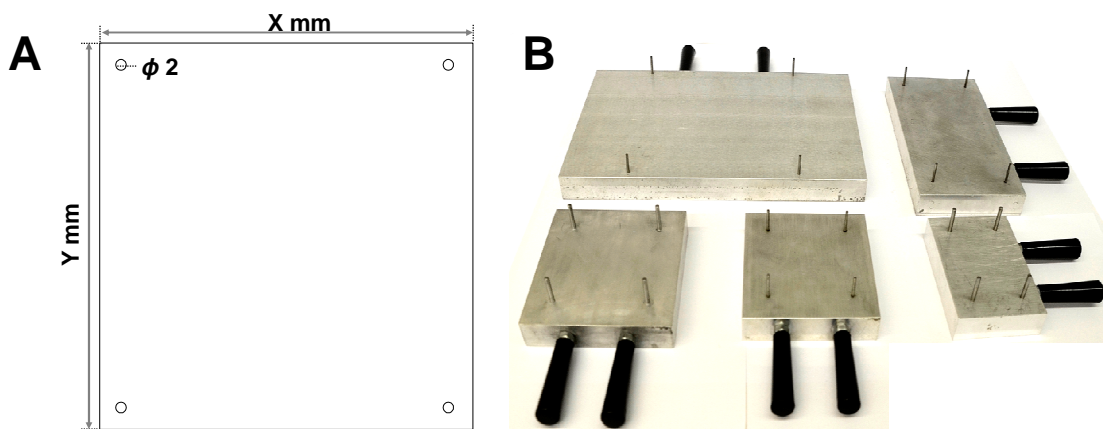


Figura 3.3. A) Área de trabajo de la que se dispone para realizar el diseño de los dispositivos, condicionada al tamaño de las placas de aluminio de alineamiento disponibles. B) Placas de aluminio para el alineamiento de las capas mediante fiduciales disponibles en el laboratorio de microfabricación.

permitieron el correcto alineamiento de las capas que darían lugar al dispositivo final.

Una vez diseñadas cada una de las capas, los archivos CAD resultantes se procesaron individualmente mediante un software específico (CircuitCAM), generando un archivo de “fabricación asistida por ordenador” (CAM) interpretable por el equipo de micromecanizado láser.

3.1.2. Micromecanizado

La etapa de mecanizado consiste en transferir sobre el sustrato cerámico los motivos diseñados por ordenador mediante la eliminación o grabado de las partes correspondientes del mismo. El equipo utilizado para tal propósito en la presente tesis fue una máquina de micromecanizado por ablación láser LPKF ProtoLaser 200® (LPKF Laser & Electronics, Garbsen, Alemania), cuya fuente de radiación es un láser de Nd:YAG (granate de aluminio-itrio dopado con neodimio) que trabaja en la región infrarroja a 1064 nm.¹⁴ Este tipo de láser es de los más utilizados para la definición de circuitos por eliminación de capa de cobre. Su aplicación sobre sustrato de cerámica verde permite generar, con gran rapidez y exactitud, motivos de elevada complejidad con una precisión que viene determinada por el diámetro del haz del láser, que en este caso es de 25 μm . El área de trabajo del que se dispone queda definida por el tamaño de la mesa móvil (30.5 x 22.9 cm). El software que controla el proceso de corte (CircuitMaster) permite tener un gran control sobre todos los parámetros de funcionamiento como la intensidad del haz, la frecuencia de operación, la velocidad de desplazamiento del cabezal sobre el material y el posicionamiento del sustrato en los tres ejes. Por lo tanto, es necesario optimizar estos parámetros en función del tipo de sustrato y del tipo de mecanizado que se quiere realizar. Según la profundidad alcanzada durante el proceso de ablación del material, se pueden realizar cortes a través del material o grabados en bajo-relieve (Figura 3.4). La profundidad conseguida vendrá determinada por los

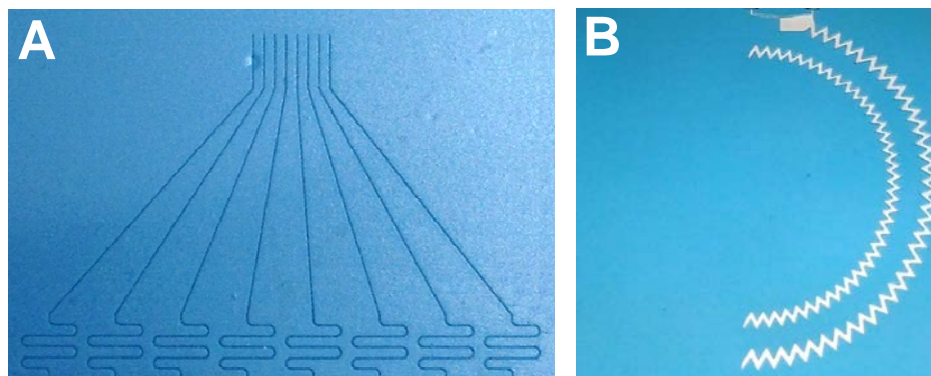


Figura 3.4. Imagen de una cerámica con diseños mecanizados por grabado en bajo-relieve (A) y con cortes de lado a lado (B).

parámetros de funcionamiento del equipo láser y por el espesor y naturaleza del sustrato a mecanizar. En este sentido, si lo que se desea es un corte de lado a lado, se requerirá una potencia adecuada del haz y una frecuencia de operación lo suficientemente lenta como para conseguir una eliminación completa del material, pero sin llegar a carbonizar el contorno. Por su parte, el grabado por bajo-relieve requerirá usar potencias inferiores y frecuencias de operación mayores, con la finalidad de generar ranuras en lugar de cortes completos. El mecanizado por gravado en bajo-relieve permite llevar a cabo diseños más complejos, con dimensiones de canal más pequeñas y con motivos más cercanos entre sí. No cortar el sustrato por completo hace que al manipular las capas, una vez mecanizadas, estas mantengan una mayor consistencia y robustez. Sin embargo, este tipo de mecanizado aumenta la rugosidad de las estructuras obtenidas, ya que volatiliza material tanto en las paredes de los motivos (eje Z), como en una de las tapas (plano XY).

3.1.3. Serigrafiado

Una vez mecanizadas cada una de las capas, y antes de superponerlas para realizar la laminación, se procede a la integración de las pistas conductoras, en las capas que lo requieran, mediante serigrafía. El objetivo es poder incorporar componentes electrónicos o sensores al microanalizador. Para llevar a cabo este cometido, se utilizaron las denominadas pantallas serigráficas (Figura 3.5).

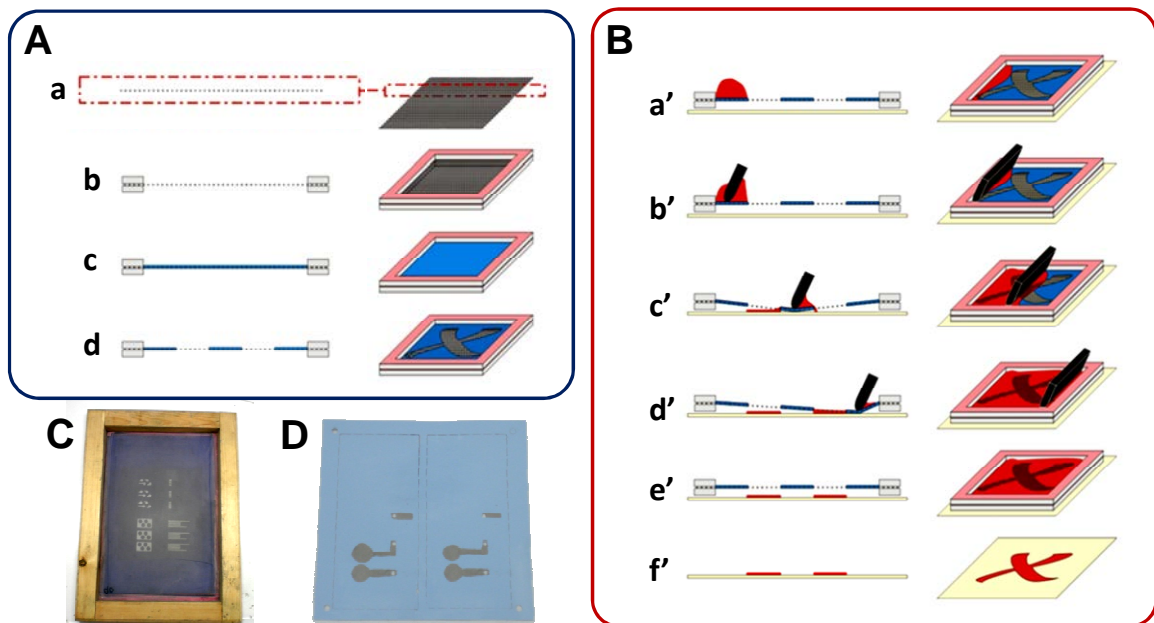


Figura 3.5. A) Proceso esquematizado de fabricación de la pantalla serigráfica. B) Proceso de serigrafiado esquematizado.¹⁵ C) Imagen de una pantalla de serigrafía. D) Imagen de una capa de cerámica con unos motivos serigrafiados.

Estas consisten en una malla de poliéster, acero o nylon (Figura 3.5.A.a) tensadas y encoladas sobre un marco metálico o de madera (Figura 3.5.A.b). Para crear los motivos a serigrafiar se cubre la superficie de la maya con una emulsión fotocurable (Figura 3.5.A.c) y se coloca el negativo del diseño sobre la emulsión, que es expuesta a luz ultravioleta. Posteriormente, la malla se lava con agua, quedando el negativo fijado en esta e impermeabilizando todos los poros del entramado de la malla salvo los correspondientes a la zona del motivo que se quiere serigrafiar (Figura 3.5.A.d). Una vez fabricada la pantalla serigráfica, esta se sitúa sobre el lugar del sustrato donde se desea realizar la serigrafía y se coloca la pasta sobre la malla (Figura 3.5.B.a'). Mediante una espátula de goma, o de un material similar, se extiende la pasta a lo largo de la malla, forzando el paso de la pasta a través de las oberturas de la malla. Tras este proceso, el dibujo serigrafiado del motivo de la pantalla queda impreso sobre el sustrato (Figura 3.5.B.b'-e'). Finalmente, antes de laminar y, para eliminar los disolventes de las pastas conductoras, se realiza un proceso de secado de la cerámica serigrafiada, que para el caso de las pastas utilizadas consistió en introducir durante 5 minutos la capa en una estufa a 100 °C (Figura 3.5.B.f).

Algunos factores como la presión aplicada por la espátula, su geometría y dureza, el ángulo de aplicación o la distancia entre el sustrato cerámico y la malla, pueden ser relevantes de cara a obtener unos motivos serigrafiados de espesor bien definido. Por este motivo, en el laboratorio de microfabricación se dispone del equipamiento necesario, una impresora serigráfica semiautomática DEK 248 (Asflex Internacional, Algete, España) para llevar a cabo este proceso de manera automática, haciéndolo así mucho más reproducible. Sin embargo, para procesos de prototipado es más cómodo realizar la serigrafía de manera manual, siempre y cuando el motivo sea sencillo.

En la presente tesis se utilizaron dos pastas conductoras de la casa comercial Dupont, completamente compatibles con las cerámicas usadas: una especial para soldadura (Dupont 6146) y otra especial para pistas internas (Dupont 6145). En ambos casos fueron utilizadas como soporte conductor de electrodos selectivos de iones (ESIs) y como electrodos de referencia de Ag/AgCl, además de usarse como pista de conexionado entre estos elementos y los correspondientes conectores.

3.1.4. Laminación multicapa

La laminación por termocompresión es una de las etapas clave del proceso de fabricación de los microanalizadores LTCC. Consiste en eliminar parcialmente los disolventes orgánicos que contienen las capas de cerámica verde permitiendo que estas queden perfectamente alineadas e irreversiblemente unidas, formando una estructura compacta lista para ser sinterizada. La incorrecta ejecución de esta fase

puede provocar la aparición de deformaciones en las estructuras tridimensionales de los microistemas que, en última instancia, podrían dar lugar a la obstrucción de los canales del sistema microfluídico, a la pérdida de líquidos o a la deformación o rotura de las pistas conductoras una vez sinterizado el dispositivo analítico. La alineación de las capas, por tanto, es un punto crítico del proceso. Para llevarlo a cabo, como se ha comentado anteriormente, se utilizaron unas placas de aluminio con cuatro pivotes, o fiduciales, uno en cada esquina (Figura 3.6.A) que coinciden con los agujeros de alineamiento o fiduciales introducidos en el diseño de cada capa y mecanizados sobre cada una de ellas (Figura 3.3.A). Para evitar que las capas se adhieran al metal, se colocó un sacrificial antiadherente de Mylar®. Una vez las capas se encuentran alineadas, se lleva a cabo el proceso de laminación por termocompresión mediante una prensa hidráulica fabricada expresamente para esta aplicación (Talleres Francisco Camps SA, Granollers, España) (Figura 3.6.B).

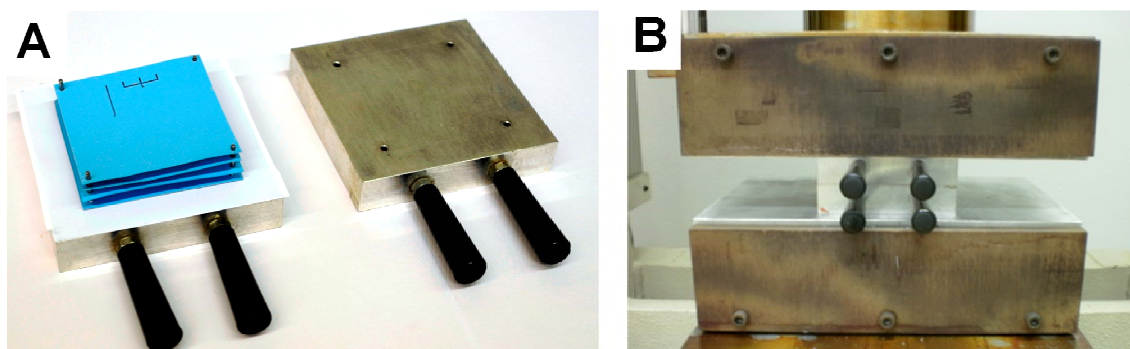


Figura 3.6. A) Capas de cerámica superpuestas de manera adecuada para ser sometidas al proceso de laminación. B) Imagen del proceso de laminado llevado a cabo por una prensa hidráulica.

La máquina estaba compuesta por dos platos calentadores de acero de 25 x 15 cm e incluye un sistema de control que permite ajustar la temperatura y la presión requerida, pudiendo llegar a ejercer una máxima presión de 420 Kg cm⁻². Dependiendo del tipo de estructura a laminar, y de la casa comercial de la cerámica usada, se requieren presiones y tiempos de laminación diferentes. Así, si el dispositivo tiene canales muy anchos (superiores a los 2 mm), o cavidades muy grandes (superiores a 0,5 mm de diámetro) se aplica una presión y un tiempo de laminación inferior que en el caso de un dispositivo con cavidades o canales más reducidos. Todo ello con la finalidad de evitar la deformación de las estructuras. Atendiendo a la cerámica usada y al tipo de dispositivo construido en este trabajo, los parámetros de operación fijados fueron de 100 °C de temperatura en las placas calentadoras, 13 bares de presión y 1 minuto de laminación.

3.1.5. Proceso de sinterización

La sinterización es la penúltima etapa del proceso de fabricación de los microsistemas analíticos cerámicos. Consiste en la aplicación de un gradiente de temperatura a las capas laminadas, lo que provoca una serie de cambios en el material que conducen finalmente a la obtención de un bloque rígido monolítico, donde las diferentes capas de las que constaba originalmente el microdispositivo quedan entrelazadas y son indistinguibles las unas de las otras. Para realizar este proceso se utilizó un horno mufla (Carbolite CBCWF11/23P16, Afora S.A., Barcelona, España) capaz de alcanzar temperaturas de 1100 °C trabajando en atmósfera de aire y teniendo la posibilidad de programar rampas de temperatura variables. El perfil de temperaturas recomendado por el fabricante de las cerámicas (DuPont),¹² y por tanto el utilizado, es el que se muestra en la Figura 3.7.B. Como se puede observar, destacan dos etapas de 30 minutos de duración a temperatura constante, a las que se llega a través de sendas rampas de temperatura de 10 °C por minuto. En la primera meseta, alrededor de los 350 °C, se produce la volatilización de la totalidad de los componentes orgánicos del material cerámico. La segunda, alrededor de los 850 °C, corresponde a la temperatura de transición vítrea de la mayoría de vidrios. Es en este momento cuando se produce una reorganización de la estructura del bloque cerámico, donde las partículas de alúmina (Al_2O_3) sólidas, presentes en la cerámica, son recubiertas por el vidrio (SiO_2) en estado viscoso (Figura 3.7.A). Finalmente, el bloque se enfría a temperatura ambiente, vitrificando de nuevo las moléculas de vidrio y dando lugar a la estructura rígida y compacta final, en donde las capas originales son completamente indistinguibles.

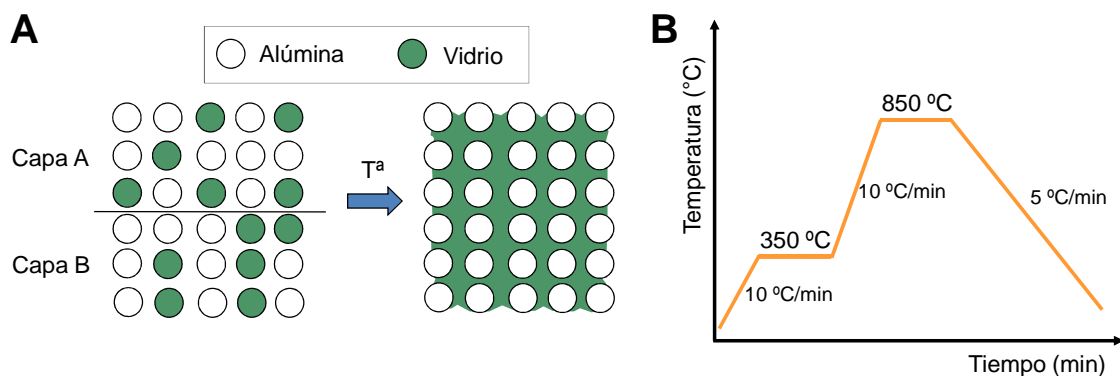


Figura 3.7. A) Recreación esquemática del proceso de sinterizado donde se puede observar la interpenetración de las partículas de alúmina entre las capas cuando el vidrio alcanza la T^a de transición vítrea y se vuelve viscoso. B) Perfil de temperatura que caracteriza el proceso de sinterización.

3.1.6. Integración de otros componentes

Por último, una vez sinterizado el microanalizador se verifica el estado de las pistas electrónicas, comprobando que no haya ningún circuito abierto y que el valor de conductividad eléctrica de cada elemento sea el esperado. También se realizan pruebas de estanqueidad de la plataforma microfluídica para constatar que no haya fugas u obturaciones. Una vez confirmado que el microdispositivo es funcional, se procede a la integración de todos aquellos elementos que no son compatibles con el proceso de sinterizado, pero que son esenciales para el correcto funcionamiento de los microanalizadores (Figura 3.8). Por un lado se adhirieron con resina epoxi y se soldaron, respectivamente, los conectores fluídicos y eléctricos, que permiten conectar el dispositivo al resto del montaje experimental. Por otro lado, las membranas selectivas de iones, se depositaron gota a gota sobre la porción de pista conductora habilitada para ello. En alguna ocasión, el material conductor que se usó para fabricar los electrodos no era compatible con el proceso de fabricación. Por este motivo, tanto el soporte conductor sólido del ESI como la membrana selectiva del ión a analizar se integraron en esta etapa. Por último, se incorpora el sistema de sellado de las cámaras de detección, constituido por un vidrio cubreobjetos fijado con un film adhesivo.

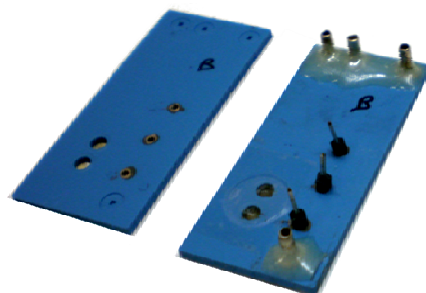


Figura 3.8. Dispositivo sinterizado y dispositivo final con todos los componentes necesarios para su funcionamiento integrados.

3.2. Tecnología de polímeros sobre sustrato de Copolímero de Olefina Cíclica (COC)

El proceso de fabricación general para la construcción de microanalizadores basados en la tecnología polímeros, usando COC como sustrato, se ilustra en la figura 3.9. Como en el caso de la tecnología LTCC, se utiliza una aproximación multicapa. Por ello, inicialmente se diseña el microsistema analítico, siendo este dividido en distintas capas, correspondientes cada una de ellas a una capa de sustrato polimérico independiente. A continuación, estas son mecanizadas con los motivos del diseño mediante microfresado. En el caso de que se requirieran de otros



Figura 3.9. Esquema general del proceso de fabricación de microistemas analíticos mediante la tecnología de polímeros usando COC como sustrato.

componentes como electrodos o membranas de separación, se integran en este momento. Por último, aprovechando la distinta temperatura de transición vítrea que puede presentar el COC, se lleva a cabo una laminación final, obteniéndose como resultado un bloque monolítico con todos los componentes embebidos en su interior. Para finalizar, se integran los elementos de conexionado fluido necesarios para que el microanalizador sea completamente operativo. A continuación se detallan las diferentes etapas del proceso de fabricación.

3.2.1. Diseño

Como en el caso de la metodología de microfabricación usando cerámicas, el proceso de fabricación de microistemas analíticos de COC se inicia con el diseño de los motivos que contendrán las diferentes capas mediante un software tipo CAD. En este caso, a diferencia de lo que ocurría con el equipo de micromecanizado por ablación láser, que constaba de un haz de corte constante de 25 μm de diámetro, el grosor y la forma del motivo mecanizado en el sustrato vendrán determinados por el diámetro y el tipo de herramienta usada. Por este motivo, la manera de proceder para realizar los motivos consiste en diseñar la trayectoria de estos con una línea y determinar su grosor con el diámetro de la broca utilizada (Figura 3.10.A). Cuando se microestructura usando el laser, dado al reducido diámetro del haz, el diseño se realiza en base a polígonos (Figura 3.10.A).

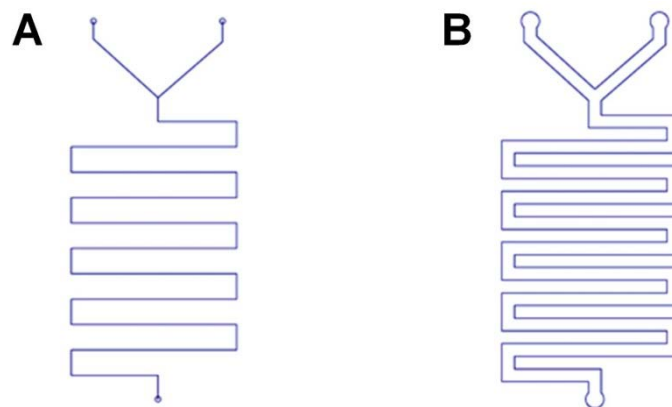


Figura 3.10. Diseño de un mezclador bidimensional con el objetivo de obtener un grosor de microcanal de 0.8 mm en el mecanizado final: **A)** Diseño realizado para mecanizar mediante microfresadora, la herramienta usada, en este caso una de diámetro 0.8 mm, determinará el grosor del canal. **B)** Diseño realizado para mecanizar mediante ablación láser, en este caso al tener el haz siempre 25 μm , se debe realizar el contorno del microcanal con las dimensiones finales.

La resolución mínima que se pudo alcanzar con microfresadora mecánica se corresponde con el diámetro de la herramienta más pequeña disponible, que es de 150 μm . A diferencia de lo que ocurre con las cerámicas, en este caso no se produce un encogimiento del material al finalizar el proceso de fabricación, por lo que este aspecto no se ha de tener en cuenta en el diseño.

Los sustratos de COC utilizados en esta tesis han sido comprados a Topas Advanced Polymers (Florence, Kentucky, EEUU), en forma de capas o láminas de diferentes grosores, dimensiones y composición. Como se ha explicado en el capítulo de la introducción (§1.2.1.1) en función de la proporción de cada uno de los polímeros que componen el COC en la formulación final del material, su temperatura de transición vítrea (T_g) variará. Así, se consigue tener sustratos con T_g diferenciadas. Los de T_g mucho menor, actuarán, mediante la aplicación de cierta presión y temperatura, como elemento sellante entre las capas estructurales que contendrán los motivos del diseño. En este sentido, para la realización de la presente tesis se han utilizado, como capas estructurales del diseño, placas de COC con dimensiones de 15 x 15 cm (que posteriormente se mecanizaban al tamaño deseado) denominadas Topas 5013, con una $T_g = 134\text{ }^\circ\text{C}$. Las placas usadas con esta composición tenían distintos grosores comprendidos entre los 300 y los 1000 μm . Por su parte, como elemento sellante se han usado láminas, proporcionadas en dimensiones A4, de COC Topas 8007 de $T_g = 78\text{ }^\circ\text{C}$ de 25 y 50 μm de grosor.

Al igual que en el caso de las cerámicas, una vez diseñadas cada una de las capas, se procesan individualmente, mediante un software (CircuitCAM), con el fin de poder asignar las diferentes herramientas (brocas) y tipos de corte a los motivos, generando un archivo de “fabricación asistida por ordenador” (CAM) interpretable por el equipo de micromecanizado por fresado.

3.2.2. Micromecanizado

Para realizar el proceso de micromecanizado del material polimérico, se utilizó una microfresadora Protomat C100/HF (LPKF Laser & Electronics, Garbsen, Alemania), con un área de trabajo de 200 x 300 mm. La resolución del proceso de corte, como se ha comentado anteriormente, viene determinada por el diámetro de la herramienta más pequeña usada. En este caso, la herramienta más pequeña que se puede usar sin ser extremadamente frágil, tiene un diámetro de 150 μm . Al igual que ocurría con el equipo de micromecanizado por ablación láser, la microfresadora es controlada por el mismo tipo de software (CircuitMaster) adaptado a las características de la máquina, que permite controlar un gran número de parámetros de corte entre los que destacan el posicionamiento en el plano XY, la velocidad de rotación de la broca y la velocidad de desplazamiento del cabezal. En cuanto al posicionamiento en el eje Z, es decir, el corte en profundidad, se realiza manualmente mediante un micrómetro que permite alcanzar una resolución de 10 μm . Existen una gran variedad de herramientas de corte (brocas o fresas) para realizar el proceso de micromecanizado (Figura 3.11). Estas se pueden englobar en dos grandes grupos: las que permiten realizar cortes superficiales, es decir, gravar en bajo-relieve y las que permiten cortar de lado a lado del material (herramientas penetrantes). Entre las que componen el primer grupo, podemos encontrar las que sirven para realizar canales con forma trapezoidal (grupo 1 y 2), las que sirven para realizar motivos de gran precisión con forma rectangular (grupo 3) y las que permiten realizar bajos-relieves de superficies más amplias (grupo 4).

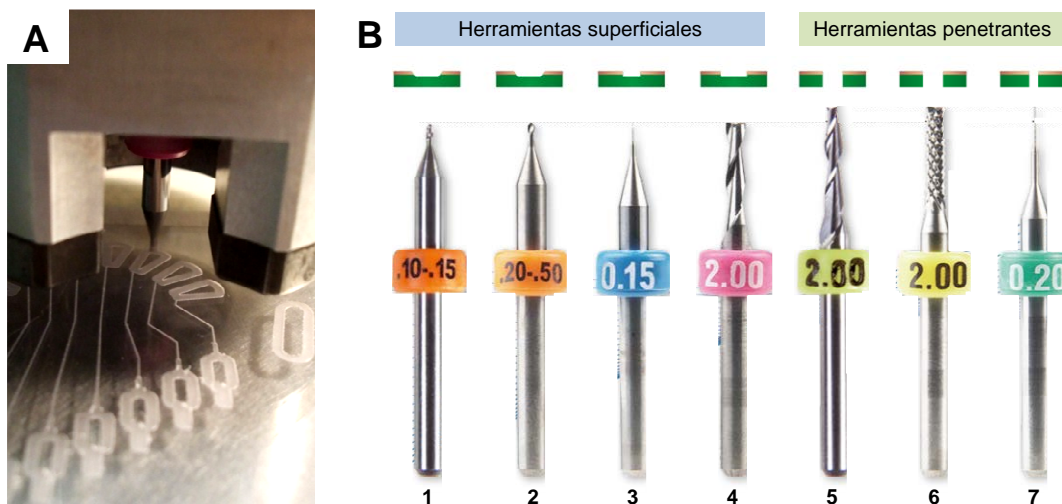


Figura 3.11. A) Imagen de la máquina de microfresado durante un proceso de corte. B) Imagen de las distintas fresas o brocas disponibles para realizar el mecanizado del sustrato: (1) *Micro cutter*; (2) *Universal cutter*; (3) *End mill RF*; (4) *End mill*; (5) *End mill long*; (6) *Cotour router*; (7) *Spiral drill*.

Entre las que componen el grupo de las herramientas penetrantes, encontramos las que permiten cortar completamente el material de lado a lado, pudiendo realizar

simultáneamente también desplazamiento en el plano XY, mecanizando un motivo (grupo 5), las que permiten realizar agujeros grandes (grupo 6) y las que permiten realizar agujeros de dimensiones más pequeñas (grupo 7). El diámetro de las brocas usadas ronda entre los 0.15 y los 3 mm. Esto permite construir una gran variedad de diseños con una gran precisión. De entre los distintos grupos de herramientas existentes, en la presente tesis se han utilizado herramientas superficiales para realizar gravados por bajo-relieve del grupo 3 y 4 y herramientas penetrantes para cortar el material a través, del grupo 5.

3.2.3. Integración de otros componentes

Una vez mecanizadas cada una de las capas, y antes de superponerlas para realizar la laminación, se procede a la integración de los diferentes componentes que se requiera embeber en el interior del bloque polimérico. Como se puede observar en la figura 3.12, estos elementos suelen consistir en pistas conductoras serigrafiadas o depositadas, utilizadas como soporte conductor de electrodos o como electrodos en sí mismas, o como resistencias para fabricar calentadores. También se pueden integrar membranas poliméricas hidrófobas o hidrófilas con la intención de introducir una etapa de tratamiento de la muestra, realizando una filtración o separación del analito por difusión gaseosa.

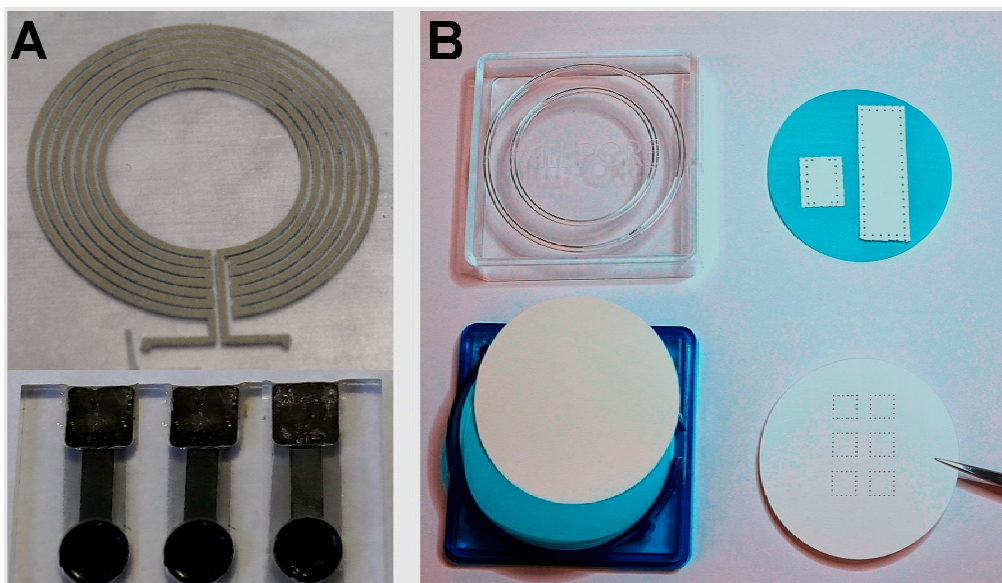


Figura 3.12. Ejemplos de distintos elementos que se pueden integrar previamente a la laminación para ser embebidos en el bloque monolítico final. **A)** Integración de pistas conductoras para actuar como soporte conductor de electrodos o como resistencia en la fabricación de calentadores. **B)** Integración de membranas poliméricas hidrófobas o hidrófilas para procesos de filtración o separación del analito.

En la presente tesis se utilizaron y testaron diversas pastas y tintas conductoras. Como soporte conductor de los ESIs se testaron una resina epoxi-grafito, constituida por una mezcla al 50 % de grafito en polvo de 50 μm de tamaño de partícula (Merck, Alemania), 36 % de epoxi Araldite-M y 14 % de endurecedor HR (ambos de Ciba Geigy, España) y una pasta de grafito: Electrodag PF-407A (Acheson, Francia). Por su parte, se utilizaron tres tipos diferentes de pastas conductoras para fabricar tanto los electrodos selectivos de ión cloruro como los electrodos de referencia: una pasta de Ag/AgCl C2030812D3 (Gwent, Pontypool, Reino Unido) y dos pastas epoxi conductoras bicomponente de plata: CircuitWorks® (Chemtronics, Holanda) y EPO-TEK® H20E (Epoxy Technologies, Massachusetts, EEUU).

También, a lo largo de la tesis, se mostrará el uso de membranas poliméricas hidrófobas para separar el analito a determinar del resto de la matriz de la muestra, mediante difusión gaseosa. Estas membranas fueron compradas a Millipore y consistieron en discos de 47 mm de diámetro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con 125 μm de grosor y con distintos tamaño de poro: 0.22, 0.45 y 1 μm . Debido a la naturaleza polimérica de las membranas y a su escaso grosor, no se puede llevar a cabo su mecanizado mediante corte directo. En su defecto, se recurrió a realizar sobre la superficie de la membrana una serie de agujeros de 400 μm uno al lado del otro, de manera que al cortar con un bisturí las distancias entre los agujeros, se pudo obtener el tamaño y forma deseado de la membrana a utilizar. En este mismo sentido, con la finalidad de integrar las membranas en los microsistemas, y evitar posibles fugas de líquido, se practicaron una serie de agujeros cerca de su perímetro para que el sustrato de COC, que actúa como sellante, pudiera penetrar por estos agujeros en el proceso de laminado, embebiendo así a la membrana en el microdispositivo final.

3.2.4. Proceso de laminación

Después de mecanizar las diferentes capas estructurales con los motivos del diseño del microanalizador y de integrar los distintos elementos a embeber, se procede a superponer por orden y a alinear las distintas capas para llevar a cabo el proceso de laminación. Esta es la etapa fundamental del proceso de fabricación en COC, ya que es la que permite unir irreversiblemente las distintas capas de COC de manera que se obtiene un bloque monolítico con la estructura tridimensional deseada.

Para alinear las distintas capas (Figura 3.13.A) se utilizaron las mismas placas de aluminio usadas en el proceso de fabricación LTCC (§3.1.4). Con la finalidad de homogeneizar la presión durante el proceso de laminado, se colocan unos bloques de silicona entre las capas de sustrato y las placas metálicas. Para evitar que el sustrato polimérico se adhiera a los bloques de silicona o se ensucie, se usó una lámina de polímero antiadherente, colocada entre el bloque de las capas de COC y

los bloques de silicona. En el caso de fabricar microanalizadores con diseños complejos que incluyeran grandes cámaras, también se utilizó como sacrificial, para prevenir deformaciones en las estructuras, una placa rígida de polimetilmetacrilato (PMMA), situada entre el film de polímero antiadherente y el bloque de silicona.

El equipo utilizado para laminar las diferentes capas fue la misma prensa hidráulica que la utilizada para el proceso de fabricación de cerámicas verdes (Talleres Francisco Camps SA, Granollers, España).

Generalmente, en los procesos de laminación por termocompresión usando polímeros, al ser la capa estructural igual que la sellante, se corre el riesgo de obturación o deformación de los motivos. Sin embargo, en el caso de usar COC, este problema no sucede debido a los diferentes grados de polimerización que se pueden conseguir de este material, hecho que le confiere la propiedad de presentarse en distintas T_g . Así, intercalando capas estructurales ($T_g = 134\text{ °C}$) y capas sellantes ($T_g = 78\text{ °C}$) (Figura 3.13.B) se puede obtener un bloque monolítico y hermético (Figura 3.13.C) mediante la aplicación de condiciones específicas de presión y temperatura, las cuales permiten fundir solamente la capa sellante pero no la estructural.

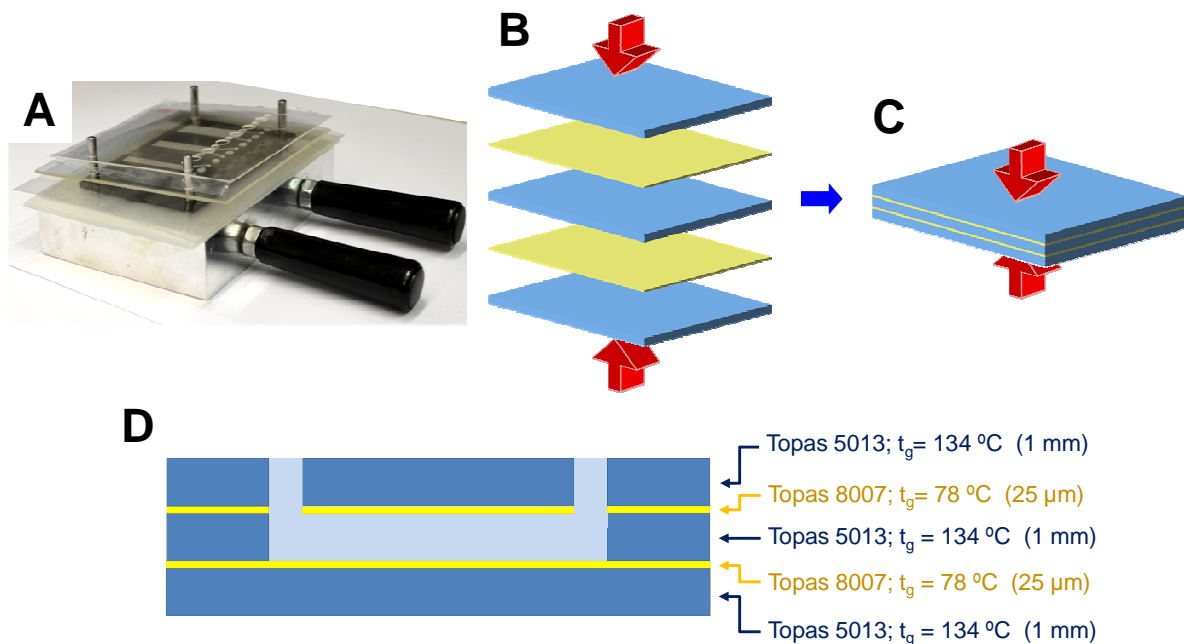


Figura 3.13. **A)** Imagen real de distintas placas y láminas dispuestas de manera ordenada en una placa metálica de alineamiento, previo a la laminación; **B)** Esquema de la disposición de las capas de COC para ser laminadas alternando una capa estructural (color azul) y una sellante (color amarillo) ambas del mismo material pero con T_g diferente; **C)** Bloque monolítico obtenido después de producirse el proceso de laminación; **D)** Diagrama esquemático de un dispositivo fluidoico compuesto por tres capas estructurales y dos sellantes con una entrada y una salida para los líquidos. Se pueden apreciar las propiedades de cada sustrato de COC utilizado.

A modo de ejemplo, la figura 3.13.D muestra el perfil esquematizado de un sistema microfluídico que consta de un microcanal en línea recta conectado a una entrada y a una salida. Como se puede observar, el diseño consta de tres capas estructurales de 1 mm de grosor y $t_g = 134\text{ °C}$, y dos capas sellantes de $25\text{ }\mu\text{m}$ de grosor y $t_g = 78\text{ °C}$. Antes de la laminación final, se lleva a cabo un proceso de prelamación entre cada capa estructural y una capa sellante, para facilitar el mecanizado de los motivos sobre el film sellante de $25\text{ }\mu\text{m}$ de grosor.

Una vez terminado el proceso de laminación, se obtiene un dispositivo rígido, en el que es imposible diferenciar las capas originales. Finalmente, los microsistemas analíticos construidos son separados del material sobrante usando la microfresadora CNC.

El proceso de laminado por termocompresión depende del tipo de diseño y elementos que integren el microanalizador. En este sentido, para laminar los microsistemas presentados a lo largo de la tesis se utilizaron unas condiciones de entre 3 y 6 bares de presión y 102 °C de temperatura, consistiendo el proceso en una rampa de temperatura desde la t_g más baja (78 °C) hasta 102 °C para posteriormente descender de nuevo, con la presión elegida aplicándose constantemente.

3.2.5. Dispositivo final

Finalmente, una vez laminado el microanalizador se verificó que todos los elementos se hubieran integrado correctamente y fueran funcionales. En este sentido se verificaron las conductividades de las pistas conductoras, la estanqueidad de los canales microfluídicos y el buen estado de la membrana de difusión gaseosa (si esta se ha integrado). Una vez confirmado que el microanalizador funciona correctamente, se procede a la integración de todos

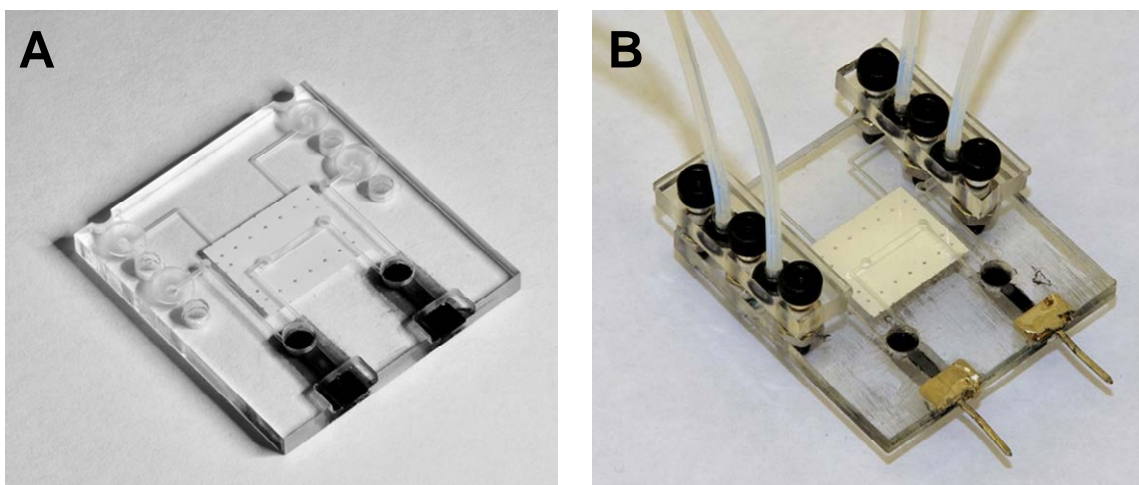


Figura 3.14. Imagen del dispositivo final una vez finalizado el proceso de laminado (A) y después de integrar todos los componentes no compatibles con el proceso e laminación (B).

aquellos elementos que no son compatibles con el proceso de laminado, pero que realmente son esenciales para el correcto funcionamiento de los microanalizadores (Figura 3.14). Por un lado se encuentran los conectores fluidicos, que se integraron mediante unos soportes presionados mediante tornillos, y los eléctricos, que se adhirieron con epoxi-conductor. También se depositaron gota a gota las membranas selectivas de iones en el lugar definido para ello. Por último, para sellar las cámaras de detección se utilizó el mismo film adhesivo que para los dispositivos cerámicos.

3.3. Referencias

1. Gongora-Rubio, M. R. G., 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 And Actuators* **89**, 222–241 (2001).
2. Ibáñez-García, N. *et al.* Biparametric Potentiometric Analytical Microsystem Based on the Green Tape Technology. *Electroanalysis* **22**, 2376–2382 (2010).
3. Alves-Segundo, R., Ibañez-Garcia, N., Baeza, M., Puyol, M. & Alonso-Chamarro, J. Towards a monolithically integrated microsystem based on the green tape ceramics technology for spectrophotometric measurements. Determination of chromium (VI) in water. *Microchim. Acta* **172**, 225–232 (2010).
4. Martínez-Cisneros, C. S. *et al.* A monolithic continuous-flow microanalyzer with amperometric detection based on the green tape technology. *Anal. Chem.* **81**, 7448–53 (2009).
5. Martínez-Cisneros, C. S. *Microsistemas Analíticos Basados en la Tecnología LTCC. Diseño, fabricación, integración y evaluación de plataformas microfluídicas y electrónicas (Tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2010).*
6. Ibáñez-García, N. *Miniaturización de analizadores químicos mediante la tecnología LTCC (Tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2007).*
7. Ibáñez-García, N., Alonso, J., Martínez-Cisneros, C. S. & Valdés, F. Green-tape ceramics. New technological approach for integrating electronics and fluidics in microsystems. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 24–33 (2008).
8. Ibanez-Garcia, N. *et al.* Continuous Flow Analytical Microsystems Based on Low-Temperature Co-Fired Ceramic Technology. Integrated Potentiometric

- Detection Based on Solvent Polymeric Ion-Selective Electrodes. *Anal. Chem.* **78**, 2985–2992 (2006).
9. Becker, H. & Locascio, L. E. Polymer microfluidic devices. *Talanta* **56**, 267–87 (2002).
 10. Becker, H. & Gärtner, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 89–111 (2008).
 11. Lee, D.-S., Yang, H., Chung, K.-H. & Pyo, H.-B. Wafer-scale fabrication of polymer-based microdevices via injection molding and photolithographic micropatterning protocols. *Anal. Chem.* **77**, 5414–20 (2005).
 12. Dupont. *DuPont™ GreenTape™: Design and Layout Guidelines*. (2009).
 13. Dupont. *DuPont™ Green Tape™ 951 Technical Datasheet*. (2009).
 14. LPKF Laser & Electronics. *LPKF ProtoLaser 200 Datasheet*.
 15. Tymecki, L., Glab, S. & Koncki, R. Miniaturized, Planar Ion-selective Electrodes Fabricated by Means of Thick-film Technology. *Sensors* **6**, 390–396 (2006).

