

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Ingeniería Electrónica



**Sistema Oscilador Mejorado para Aplicaciones
de Microbalanza (QCM) en Medios Líquidos y
Propuesta de un Nuevo Método de
Caracterización para Biosensores Piezoeléctricos**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Dn. Yeison Javier Montagut Ferizzola

DIRIGIDA POR:

Dr. Antonio Arnau Vives

Valencia, 2011

Dr. Antonio Arnau Vives, catedrático de la Universidad Politécnica de Valencia

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Sistema Oscilador Mejorado para Aplicaciones de Microbalanza (QCM) en Medios Líquidos y Propuesta de un Nuevo Método de Caracterización para Biosensores Piezoeléctricos**” ha sido realizada bajo su dirección por el Ingeniero Yeison Javier Montagut Ferizzola.

Y para que conste a los efectos legales, se extiende la presente certificación en Valencia, a 12 de enero de 2011.

Fdo. Dr. Antonio Arnau Vives

A Mamá Ana por su maravilloso “*Corazón de oro*”

A Ledy, por su amor de madre

A mis hermanos, por ser los mejores del mundo

A mi padre, por su inmenso cariño

A la memoria de Zolanyi Marcela Rubiano Calderón, por haber comenzado y motivado esta aventura... pero la vida es corta

Agradecimientos

Este reto personal no hubiese sido posible, de no ser por las personas que constantemente me han brindando su apoyo y a las cuales agradezco:

A mi tutor Antonio Arnau, por su dirección, a los miembros del grupo de investigación Fenómenos Ondulatorios, línea sistemas y sensores piezoeléctricos, por su apoyo y compañerismo en este transitar por el *camino de la investigación*; en especial a José Vicente, por su valiosa ayuda, sin él esta tesis sería otro cuento.

A Dios, a mi familia por que durante este tiempo, me han demostrado su apoyo, su amor, comprensión, porque me han enseñado a dar lo mejor de mí, a esforzarme para hacer las cosas lo mejor que pueda y sobre todo porque día a día me daban un motivo para continuar; en especial a Mamá Ana, por sus oraciones y por qué llena de alegrías mis días con solo escuchar su *¡hay mi corazón de oro!* A Mita, por ser en todo momento, apoyo, fuerza, amiga, motivadora y por su amor de madre que me lo demuestra a cada instante. A mis hermanos por que llenan mi vida de alegría y son el principal combustible para alcanzar los objetivos. A mi papá por su amor. A mi tío Pedro y sus hijos por su amor, apoyo y por hacerme sentir que somos el mismo equipo. A la familia Fajardo-Ferizzola, por sus oraciones, por ser fuerza espiritual, fortaleza y por ser y hacerme sentir en familia a más de 8000Km. A la familia Felizzola-Numa por su comprensión, amor y apoyo. A Tico y Ray, por su apoyo. A Chefá y Jairo. A mis primos: Fabi, Leidy, Gersy y Yureidy.

A los compañeros del DIE quienes han hecho del café y la comida un momento especial: a Cata por su amistad, su cariño, su constante apoyo y por todos los momentos compartidos. A Fran, por su amistad y sobre todo por enseñarme a dar lastima en los supermercados italianos para ganarnos "*un cacho de pan crudo*". A Karen y Pao, por su cariño y amistad. A Eugeni, Carlos y a mi Chinita.

A mis amigos y a esas personas muy entrañables y cercanas a mi familia, que en todo momento han sido apoyo y fortaleza no solo para mí, sino también para mis seres queridos.

De igual manera quiero agradecer a los miembros del grupo de Inmunotecnología del i3BH-UPV, en especial a Ángel Montoya, Carmen March y a Fede por su colaboración en el desarrollo de los inmunoensayos.

A la gente del Restaurante Caminito, con quienes no solo compartí largas noches de trabajo, sino grandes amistades.

A la familia Rubiano Calderón.

Al departamento técnico, creativo, diseñador, administrativo, de soporte técnico y a los desarrolladores de la empresa AWSensors.

A Diana y Nuria, quienes también han colaborado en esta tesis.

Y finalmente quiero agradecer a todas las personas que de una u otra manera han estado a lo largo de este camino.

Solo espero que esta tesis y sobre todo la lectura no coincidan con mis 5 minutos de gloria, como dice Fran.

RESUMEN

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), es una técnica ampliamente usada en aplicaciones bioquímicas. Los principales desafíos siguen siendo el aumento de la sensibilidad y el límite de detección, así como la capacidad de realización de múltiples ensayos simultáneamente.

En las últimas décadas, la mejora de la sensibilidad se ha realizado al aumentar la frecuencia fundamental de resonancia del sensor, puesto que, la sensibilidad frecuencia/masa aumenta con el cuadrado de la frecuencia, como lo predice Sauerbrey. Sin embargo, este aumento de la sensibilidad no ha sido el esperado, porque el límite de detección se ha visto comprometido. La disminución de la estabilidad en frecuencia debida principalmente al aumento del ruido de fase (sobre todo en los osciladores), hace imposible llegar a la resolución esperada.

En esta tesis, se propone un nuevo concepto de caracterización a una frecuencia constante, basado en la ecuación fase/masa: $\Delta\phi/\Delta m \approx 1/m_L$, donde, m_L es la masa del líquido desplazada por el resonador al oscilar. Esta masa se reduce proporcionalmente con la raíz cuadrada de la frecuencia.

Una aplicación basada en un inmunosensor para la detección del plaguicida Carbaryl, ha sido usada para validar el nuevo método de caracterización. Los resultados obtenidos se han comparado con los obtenidos con un oscilador mejorado propuesto en esta tesis.

El nuevo concepto de caracterización desarrollado especialmente para aplicaciones de biosensores, presenta las siguientes ventajas:

- a) El sensor es interrogado pasivamente por una fuente externa que puede ser diseñada con alta estabilidad en frecuencia y bajo ruido de fase, incluso para altas frecuencias.
- b) El circuito sensor es muy simple y de alta capacidad de integración.
- c) Sensores que trabajen a la misma frecuencia fundamental de resonancia, podrán ser caracterizados, en principio, con una sola fuente, abriendo la posibilidad de un nuevo campo de investigación con sistemas de múltiples sensores.

ABSTRACT

Quartz crystal microbalance (QCM) technique is widely used in in-liquid biochemical applications. The main challenges remain on the improvement of sensitivity and limit of detection, as well as multianalysis capabilities and reliability.

The improvement of sensitivity has been addressed in the last decades by increasing the sensor fundamental frequency; following the increment of the frequency/mass sensitivity with the square of frequency predicted by Sauerbrey. However, this sensitivity improvement has not been completely transferred in terms of limit of detection. The decrease on frequency stability due to the increase of the phase noise, particularly in oscillators, made impossible to reach the expected resolution.

A new concept of sensor characterization at constant frequency has been proposed in this thesis, based on the phase/mass sensitivity equation: $\Delta\phi/\Delta m \approx 1/m_L$, where m_L is the liquid mass perturbed by the resonator in its oscillatory movement; this mass reduces proportionally with the frequency square root.

The validation of the new concept is presented in this thesis. An immunosensor application for the detection of the very low molecular weight insecticide, Carbaryl, has been chosen for the validation and compared with an improved oscillator configuration proposed in this thesis.

The new characterization concept, particularly for biosensor applications, has the following advantages:

- a) the sensor is interrogated passively with an external source, which can be designed with high frequency stability and very low phase noise, even at very high frequencies,
- b) the sensor circuit can be made very simple with high level of integration capabilities,
- c) sensors working at the same fundamental resonance frequency could be characterized, in principle, with only one source, opening the possibility of working with sensor arrays for multianalysis detection.

RESUM

La microbalança de cristall de quars (QCM), és una tècnica àmpliament usada en aplicacions bioquímiques. Els principals desafiaments segueixen sent l'augment de la sensibilitat i el límit de detecció, així com la capacitat de realització de múltiples assajos simultàniament.

En les últimes dècades, la millora de la sensibilitat s'ha realitzat a l'augmentar la freqüència fonamental de ressonància del sensor, ja que la sensibilitat freqüència/massa augmenta amb el quadrat de la freqüència, com va predir Sauerbrey. No obstant, este augment de la sensibilitat no ha sigut l'esperat, perquè el límit de detecció s'ha vist compromès. La disminució del l'estabilitat en freqüència degut principalment a l'augment del soroll de fase (sobretot en els oscil·ladors) fa impossible arribar a la resolució esperada.

En esta tesi, es proposa un nou concepte de caracterització a una freqüència constant, basat en l'equació fase/massa: $\Delta\phi/\Delta m = 1/m_L$, on m_L és la massa del líquid desplaçada pel ressonador a l'oscil·lar. Esta massa es redueix proporcionalment amb l'arrel quadrada de la freqüència.

Una aplicació basada en un immunosensor per a la detecció del plaguicida Carbaryl ha sigut usada per a validar el nou mètode de caracterització. Els resultats obtinguts s'han comparat amb els obtinguts amb un oscil·lador millorat proposat en esta tesi.

El nou concepte de caracterització desenvolupat especialment per a aplicacions de biosensors, presenta els següents avantatges:

- a) El sensor és interrogat passivament amb una font externa que pot ser dissenyada amb alta estabilitat en freqüència i baix soroll de fase, inclús per a altes freqüències.
- b) El circuit sensor és molt simple i d'alta capacitat d'integració.
- c) Sensors que treballen a la mateixa freqüència fonamental de ressonància, podran ser caracteritzats, en principi, amb una sola font, obrint la possibilitat d'un nou camp d'investigació amb sistemes de múltiples sensors.

Listado de Abreviaturas y Símbolos:

Abreviaturas utilizadas en el texto:

QCM	<i>Quartz crystal microbalance</i> – Microbalanza de cristal de cuarzo
QCR	<i>Quartz crystal resonator</i> - Resonador de cristal de cuarzo
TLM	<i>Transmission line model</i> - Modelo de línea de transmisión del cristal de cuarzo.
LEM	<i>Lumped element model</i> - Modelo de elementos concentrados.
BVD	<i>Butterworth-Van Dyke</i> - Modelo de Butterworth-Van Dyke
MSRF	<i>Motional Series Resonant Frequency</i> - Frecuencia de resonancia serie dinámica
BFP	<i>Band pass filter</i> - Filtro pasa banda.
AGC	<i>Automatic gain control</i> - Control automático de ganancia.
OTA	<i>Operational transconductance amplifier</i> - Amplificador operacional de transconductancia.
BO	<i>Bridge Oscillator</i> – Oscilador puente
SBO	<i>Standard Bridge Oscillator</i> – Oscilador puente estándar
ABO	<i>Active bridge Oscillator</i> – Oscilador puente activo
VCO	<i>Voltage Control Oscillator</i> - Oscilador controlado por tensión.
VCXO	<i>Voltage Control Crystal Oscillator</i> - Oscilador de cristal controlado por tensión.
PFD	<i>Phase-frequency-detector</i> - Detector fase/frecuencia.
PLL	<i>Phase locked loop</i> - Bucle de enganche de fase
EQCM	<i>Electrochemical quartz crystal microbalance</i> - Microbalanza de cuarzo electroquímica.
EGTF	<i>Electrogravimetric transfer function</i> - Función de transferencia electro gravimétrica
NCO	Oscilador controlado numéricamente.
HFF-QCR	<i>High frequency fundamental quartz crystal resonator</i> – Cristal de cuarzo de alta frecuencia de fundamental
FPGA	<i>Field programmable gate array</i> - FPGA

SAM	<i>Self Assembled Monolayer</i> - Monocapa autoensamblada
PBS	Solución tampón de 10mM de fosfato, ph 7.45 (tampón de trabajo).
PBST	Solución de PBS que contiene 0.005% de Tween 20.
LOD	<i>Limit of Detection</i> - Límite de detección
LFP	<i>Low pass filter</i> - Filtro paso bajo

Símbolos utilizados en las ecuaciones y en el texto:

K_q	Factor de acoplamiento electromecánico complejo para el cuarzo con pérdidas
α_q	Fase compleja de la onda acústica a través del cuarzo con pérdidas.
ω	Frecuencia angular de excitación.
C_0	Capacidad estática.
Z_L	Impedancia mecánica de carga superficial.
Z_q	Impedancia característica del cuarzo.
ρ_q	Densidad del cuarzo.
\overline{C}_{66}	Módulo de cizalla efectivo complejo del cuarzo.
c_{66}	Constante elástica de cizalla.
e_{26}	Constante de esfuerzo piezoeléctrico.
ϵ_{22}	Permitividad del cuarzo
η_q	Viscosidad efectiva del cuarzo.
A_s	Área efectiva de la superficie del electrodo.
h_q	Espesor del cristal de cuarzo
Z_m	Impedancia dinámica.
Z_m^q	Impedancia dinámica del cuarzo sin carga.
Z_m^L	Contribución de la carga en la impedancia dinámica del cuarzo.
Y	Admitancia eléctrica.
G	Conductancia.
B	Susceptancia.
K_0	Factor de acoplamiento electromecánico efectivo sin pérdidas.
ω_s	Frecuencia angular de resonancia serie
L_m^L	Contribución de la carga en la inductancia dinámica del sensor.
R_m^L	Contribución de la carga en la resistencia dinámica del sensor.
C_m^L	Contribución de la carga en la capacidad dinámica del sensor.
C_m^q	Capacidad dinámica del cristal sin carga
n	Número de caras en contacto con el líquido.

N	Número de armónico.
f_s	Frecuencia de resonancia serie dinámica.
Q	Factor de calidad
τ_{co}	Constante de tiempo de desvanecimiento.
τ_m	Constante de tiempo.
f_m	Frecuencia de oscilación amortiguada.
L_{eq}	Inductancia equivalente del cristal a la frecuencia de resonancia.
X_{eq}	Reactancia equivalente del cristal a la frecuencia de oscilación
C_v	Condensador de compensación de la capacidad paralela.
G_i'	Módulo elástico de almacenamiento.
R_m^q	Resistencia dinámica del cristal sin carga.
A_{eff}	Superficie efectiva del electrodo.
V_{AGC}	Tensión a la salida del control automático de ganancia del oscilador.

TABLA DE CONTENIDO

<i>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</i>	3
1 FUNDAMENTOS DEL CRISTAL DE CUARZO COMO SENSOR: MODELOS	4
2 PARÁMETROS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE SENSORES DE CUARZO	11
3 SISTEMAS DE CARACTERIZACIÓN DE SENSORES PIEZOELÉCTRICOS Y SUS LIMITACIONES	14
3.1 Analizador de Impedancias o de Redes.....	14
3.1.1 Adaptaciones del Analizador de Impedancias.....	16
3.2 Método de la Respuesta al Impulso y Desvanecimiento.....	20
3.3 Osciladores.....	24
3.3.1 Principio Básico de un Oscilador LC.....	24
3.3.2 Condición de Oscilación.....	27
3.3.3 Modo Paralelo del Oscilador de Cristal.....	28
3.3.4 Modo Serie del Oscilador de Cristal.....	29
3.3.5 Problemática Asociada a la Medida de la MSRF.....	30
3.3.6 Problemática Asociada a la Medida de la Resistencia Dinámica.....	32
3.3.7 Osciladores para Sensores QCM.....	33
3.4 Sistema de Interfaz para Sensores QCM Basados en Técnicas de Enganche.....	53
3.4.1 Técnicas de PLL con Compensación de la Capacidad Paralela.....	53
3.4.2 Técnicas de Enganche a la Frecuencia de Máxima Conductancia.....	60
3.5 Interfaz para Aplicaciones de fast-QCM.....	62
<i>CAPITULO II: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</i>	69
<i>CAPÍTULO III: OSCILADOR</i>	75
4 MÉTODOS	76
4.1 Método de Caracterización: Seguimiento de Frecuencia (OSCILADOR).....	76
4.1.1 Descripción Detallada del Sistema Propuesto.....	79
4.1.2 Implementación.....	89
4.2 Cristal y Celdas de Medida.....	97

4.2.1	Cristales	97
4.2.2	Celdas de Medida	97
4.3	Instrumental de Medida Asociado	99
4.4	Ensayos: Comportamiento del Oscilador	99
4.5	Inmunoensayos	103
4.5.1	Reactivos e Inmunoreactivos	103
4.5.2	Inmovilización Covalente	104
4.5.3	Formato de Ensayo	105
4.5.4	Protocolo de Ensayo	106
4.5.5	Análisis de Datos	106
4.6	Sistema de Flujo	107
4.7	Sistema de Termostatación	107
4.8	Montaje Experimental	108
4.8.1	Sistema Implementado de Caracterización In-batch	108
4.8.2	Sistema Completo Implementado	108
5	RESULTADOS (OSCILADOR).....	109
5.1	Respuesta del Circuito Oscilador	109
5.1.1	Frecuencia de Oscilación	109
5.1.2	Resistencia Dinámica	111
5.1.3	Fase de Oscilación	113
5.2	Efectos de la Rama y la Capacidad de Compensación (C_V)	114
5.2.1	Efecto de la Rama de Compensación	114
5.2.2	Efecto del Condensador C_V	118
5.2.3	Efectos de la Capacidad de Compensación $C_V=6,8\text{pF}$	122
5.2.4	Efecto de la Capacidad de Compensación $C_V=10\text{pF}$	126
5.2.5	Efecto de la Capacidad de Compensación $C_V=15\text{pF}$	130
5.2.6	Frecuencia de Oscilación	134
5.2.7	Fase de Oscilación	135
5.3	Inmunosensor Piezoeléctrico	137
5.3.1	Optimización del Ensayo	137
5.3.2	Caracterización del Inmunosensor	140
6	DISCUSIÓN (OSCILADOR).....	142
6.1	Respuesta del Oscilador	143
6.2	Explicación: Efecto de la Rama de Compensación Capacitiva y el Condensador C_V en la Respuesta del Oscilador	146
6.2.1	Variación de la Frecuencia de Oscilación a una Fase Constante	146
6.2.2	Efecto de la Rama y la Capacidad de Compensación Sobre la Fase de Oscilación	155
6.3	Inmunosensor	169

<i>CAPITULO IV: DETECCIÓN DE FASE</i>	175
7 MÉTODOS	178
7.1 Método de Caracterización: Detección de Fase.....	178
7.1.1 Principio de Funcionamiento	178
7.1.2 Relación Matemática de la Variación de Fase vs el Cambio de la Densidad Superficial de Masa del Recubrimiento del Cristal	180
7.2 Sistema de Caracterización: Detector de Fase.....	187
7.2.1 Principio de Funcionamiento	187
7.2.2 Descripción Detallada del Sistema de Caracterización Propuesto.....	192
7.2.3 Implementación	196
7.2.4 Protocolo de Medida.....	199
7.3 Validación Numérica de la Ecuación de Fase	200
7.4 Cristales y Celdas	203
7.5 Instrumental de Medida Asociado	204
7.6 Inmunoensayos.....	204
8 RESULTADOS (DETECTOR DE FASE)	204
8.1 Validación Numérica de la Ecuación de Fase	204
8.2 Validación Celda de Flujo	208
8.3 Inmunosensor Piezoeléctrico.....	209
8.3.1 Optimización del Ensayo.....	209
9 DISCUSIÓN	214
9.1 Ecuación de Fase	214
9.2 Inmunoensayos.....	219
9.3 Comparación entre los dos Sistemas de Caracterización Desarrollados en esta Tesis	220
9.4 Proyección.....	222
<i>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES</i>	227
<i>FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN</i>	233
<i>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</i>	235
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	239

*CAPÍTULO I:
INTRODUCCIÓN*

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La microbalanza de cristal de cuarzo en corte AT (QCM), se usa frecuentemente como sensor en una gran variedad de aplicaciones [Bund et al. 1999; Czanderna et al. 1984; Daikhin et al. 2000; Etchenique et al. 1997; Fahrnich et al. 2002; Hug 2003; Marx 2003]. Presenta una resolución comparable en muchos casos a técnicas químicas convencionales, es adecuada para la caracterización de las propiedades físicas de fluidos [Arnau et al. 2000a; Lee et al. 2002] y para la detección de analitos y otras especies químicas en disolución [Biset et al. 1999; Cooper et al. 2007; Dickert et al. 2003; Janshoff et al. 2000; Lazcka et al. 2007; O'Sullivan et al. 1999a; O'Sullivan et al. 1999b; TA.Camesano 2007; Wegener et al. 2001].

Para usar el resonador de cristal de cuarzo (QCR) como sensor en aplicaciones QCM, se requiere un interfaz electrónico que permita la caracterización de los parámetros del sensor y un sistema de flujo que permita las aplicaciones en medio fluido. En la actualidad, un gran sector de las investigaciones se centra en el diseño y mejora de estos sistemas buscando una mayor precisión en la medida. Esta tesis pretende diseñar y desarrollar técnicas de medida y caracterización de QCR para aplicaciones de QCM que permitan aumentar la sensibilidad y el límite de detección facilitando el desarrollo de nuevas aplicaciones en diversos campos, de acuerdo a las necesidades planteadas por el grupo.

Antes de proponer un diseño, se hace necesario conocer en detalle el modelado físico del sensor, su funcionamiento electromecánico y estudiar como se ha venido solucionando la problemática asociada a la caracterización del sensor.

1 FUNDAMENTOS DEL CRISTAL DE CUARZO COMO SENSOR: MODELOS.

En la Figura 1.1 se muestra una sección de un cristal de cuarzo en corte AT de espesor h_q en contacto con una capa fina visco-elástica de espesor h_1 , en un medio visco-elástico infinito. Esta configuración se puede considerar genérica para la gran mayoría de aplicaciones donde se usa el QCR en corte AT como sensor de microbalanza.

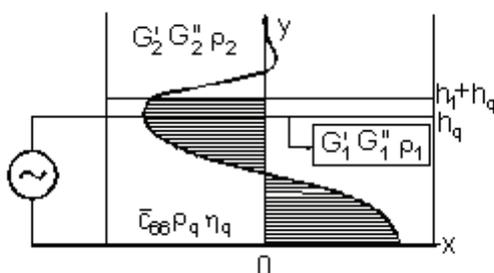


Figura 1.1: Sección de un resonador de cuarzo TSM cargado con una primera capa viscoelástica finita y una segunda capa viscoelástica infinita.

En la Figura 1.1 C_{66} y η_q representan las propiedades piezoeléctricas y las pérdidas del cristal respectivamente, mientras que G_i' y G_i'' (donde $i=1$ y 2) son los módulos de elásticos de almacenamiento y de pérdidas respectivamente; y representan las propiedades viscoelásticas de los medios depositados sobre el cristal.

Cuando se aplica una tensión alterna (AC) entre los electrodos depositados sobre las caras opuestas del QCR, se induce una fuerza de cizalla que genera una onda acústica transversal que se propaga a través del espesor del cuarzo y penetra en el medio en contacto con él. La interacción mecánica entre el resonador y los medios en contacto modifica la respuesta eléctrica (impedancia) del componente. Esto permite utilizar el resonador como sensor para detectar cambios en las propiedades de los medios en contactos con él.

Para analizar el sensor como un componente electrónico dentro de un circuito es muy útil representar al sensor mediante un modelo adecuado de impedancias.

El modelo que mejor representa la respuesta de impedancia del resonador, se deriva del concepto de línea de transmisión (TLM) [Cernosek et al. 1998;

Lucklum et al. 1997a; Rosebaum 1988] o del modelo electromecánico continuo [Arnau. A 1999] donde se describe la impedancia eléctrica compleja del resonador QCR cargado como:

$$Z = \frac{1}{j\omega C_o} \left[1 - \frac{K_q^2}{\alpha_q} \frac{2 \tan\left(\frac{\alpha_q}{2}\right) - j\zeta}{1 - j\zeta \cot(\alpha_q)} \right] \quad (1.1)$$

Donde:

K_q : Factor de acoplamiento electromecánico complejo para el cuarzo con pérdidas.

α_q : Fase compleja de la onda acústica a través del cuarzo con pérdidas.

ω : Frecuencia angular de excitación.

C_o : Capacidad estática.

$$\zeta: \zeta = \frac{Z_L}{Z_q}$$

Z_L : Impedancia mecánica de carga superficial.

$Z_q = \left(\overline{C_{66}} \rho_q\right)^{1/2}$ Impedancia característica del cuarzo.

Siendo:

ρ_q : Densidad del cuarzo.

$\overline{C_{66}} = C_{66} + \left(\frac{e_{26}^2}{\epsilon_{22}}\right) + j\omega\eta_q$ Módulo de cizalla efectivo complejo del cuarzo.

C_{66} : Constante elástica de cizalla.

e_{26} : Constante de esfuerzo piezoeléctrico.

ϵ_{22} : Permitividad del cuarzo.

η_q : Viscosidad efectiva del cuarzo.

Tabla 1.1: Propiedades del cuarzo en corte AT.

Parámetros del cuarzo	Valor	Descripción
ε_{22}	$3,982 \times 10^{-11} \text{A}^2 \cdot \text{s}^4 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$	Permitividad
η_q	$9,27 \times 10^{-3} \text{Pa} \cdot \text{s}$	Viscosidad efectiva
C_{66}	$2,947 \times 10^{10} \text{N} \cdot \text{m}^{-2}$	Módulo de cizalla efectivo.
e_{26}	$9,657 \times 10^{-2} \text{A} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$	Constante de esfuerzo piezoeléctrico
ρ_q	$2651 \text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$	Densidad
A_s	$2,92 \times 10^{-5} \text{m}^2$	Área efectiva de la superficie del electrodo
h_q	$166,18 \times 10^{-6} \text{m}$	Espesor

La impedancia eléctrica Z dada en la ecuación anterior puede expresarse, sin simplificación alguna, como un circuito paralelo formado por una capacitancia estática C_0 y una impedancia Z_m llamada “impedancia dinámica”, asociada a la vibración electro-mecánica del sensor, como sigue:

$$Z = \frac{1}{j\omega C_0} // Z_m = \frac{Z_m}{1 + j\omega C_0 Z_m} \quad (1.2)$$

De las ecuaciones (1.1) y (1.2) se obtiene la expresión de Z_m como:

$$Z_m = R_m + jX_m = \frac{1}{j\omega C_0} \left[\frac{1 - j\zeta \cot(\alpha_q)}{\frac{K_q^2}{\alpha_q} \left(2 \tan\left(\frac{\alpha_q}{2}\right) - j\zeta \right)} - 1 \right] \quad (1.3)$$

Esta expresión se puede dividir en dos partes como sigue:

$$Z_m = \frac{1}{j\omega C_0} \left[\frac{\alpha_q / K_q^2}{2 \tan\left(\frac{\alpha_q}{2}\right)} - 1 \right] + \frac{1}{\omega C_0} \frac{\alpha_q}{4K_q^2} \frac{\zeta}{1 - \frac{j\zeta}{2 \tan\left(\frac{\alpha_q}{2}\right)}} = Z_m^a + Z_m^l \quad (1.4)$$

El término Z_m^q representa la impedancia dinámica del cuarzo sin carga, mientras que Z_m^L , representa la contribución de la carga en la impedancia dinámica.

Generalmente la admitancia eléctrica de un sensor piezoeléctrico es más utilizada en comparación con la impedancia. A partir de las ecuaciones (1.2) y (1.3) podemos expresar la admitancia como:

$$Y = \frac{1}{Z} = j\omega C_0^* + \frac{1}{Z_m^q + Z_m^L} = G + jB \quad (1.5)$$

Donde:

$C_0^* = C_0 + C_p$; C_p corresponde a una capacidad externa al cristal de cuarzo, en paralelo con C_0 , añadida debido a la celda, el encapsulado, las conexiones, los cables, etc. G es la conductancia del sensor y B es su susceptancia.

El carácter aditivo de la impedancia dinámica del cuarzo y de las contribuciones a la impedancia dinámica global de la carga superficial es exacto dentro del modelo unidimensional y la ecuación (1.4) puede ser aplicada sin restricciones a la carga en el cristal de cuarzo [Lucklum et al. 1997a].

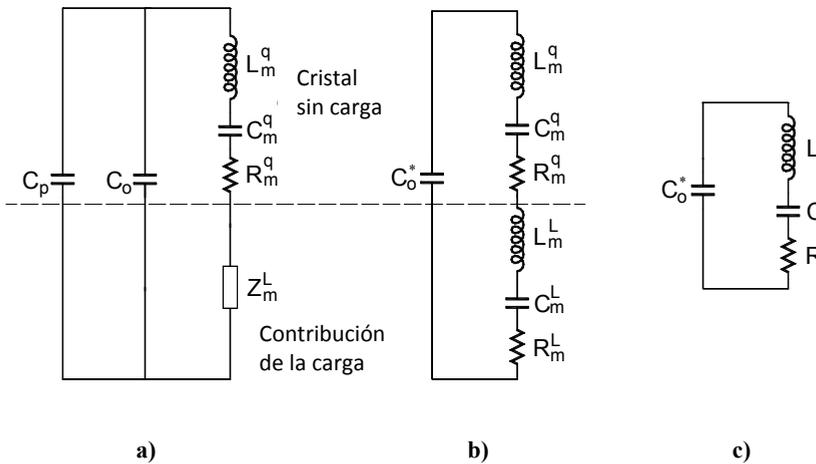


Figura 1.2: Modelo del circuito equivalente para resonadores de cuarzo (QCR) con carga: a) Modelo general. b) Modelo BVD extendido. c) Modelo BVD.

La impedancia dinámica Z_m^q asociada a un resonador sin carga puede ser simplificada, para frecuencias próximas a la frecuencia de resonancia mecánica a un circuito serie de elementos concentrados (LEM, Lumped Element Model)

[Arnau et al. 2001a; Bottom, V.E.82; Cady, W.G.64; Martin et al. 1991b; Nwankwo et al. 1998]

$$Z_m^q = \frac{1}{j\omega C_0} \left[\frac{\alpha_q / K_q^2}{2 \tan\left(\frac{\alpha_q}{2}\right)} - 1 \right] = R_m^q + j\omega L_m^q + 1/j\omega C_m^q \quad (1.6)$$

El último miembro en la expresión anterior describe la impedancia dinámica del circuito equivalente de Butterworth-Van Dyke (BVD) de un resonador sin carga (Figura 1.2a). Los elementos eléctricos del circuito del modelo BVD son [Cernosek et al. 1998; Martin et al. 1991a].

$$C_0 = \frac{\varepsilon_{22} A_s}{h_q} \quad (1.7)$$

$$R_m^q = \frac{(n\pi)^2 \eta_q}{8K^2 C_0 C_{66}} \quad (1.8)$$

$$C_m^q = \frac{8K_0^2 C_0}{(n\pi)^2} \quad (1.9)$$

$$L_m^q = \frac{1}{\omega_s^2 C_m^q} \quad (1.10)$$

Donde:

K_0 : Factor de acoplamiento electromecánico efectivo sin pérdidas.

N ($N=1,3,5,\dots$): Resonancia armónica del cuarzo.

$\omega_s = 2\pi f_s$: es la frecuencia angular de resonancia serie de los elementos concentrados, que puede obtenerse, aproximadamente, mediante la siguiente expresión [Cernosek et al. 1998; Rosebaum 1988]:

$$\omega_s = \frac{1}{h_q} \sqrt{\frac{C_{66}}{\rho_q}} \sqrt{(N\pi)^2 - 8K_0^2} \quad (1.11)$$

En la ecuación (1.4) la contribución de la carga sobre la impedancia dinámica del resonador Z_m^L , viene dada por:

$$Z_m^L = \frac{1}{\omega C_0} \frac{\alpha_q}{4K_q^2} \frac{\zeta}{1 - \frac{j\zeta}{\left(2 \tan\left(\frac{\alpha_q}{2}\right)\right)}} \quad (1.12)$$

Observando la ecuación (1.12) se deduce que para $\zeta / (2 \tan(\alpha_q/2)) \ll 1$ (condición de pequeña carga superficial), la impedancia dinámica asociada a la carga se puede simplificar como [Cernosek et al. 1998; Granstaff et al. 1994]:

$$Z_m^L = \frac{N\pi}{4K_0^2 \omega_s C_0} \frac{Z_L}{Z_q} \quad (1.13)$$

Esta expresión corresponde a la de Z_m^L en el modelo de elementos concentrados (LEM) de la Figura 1.2a.

El LEM se considera adecuado para representar una gran variedad de aplicaciones reales de sensores con cargas visco-elásticas [Cernosek et al. 1998].

Se puede probar que la impedancia Z_m^L puede aproximarse a un circuito serie de tres elementos: uno con carácter resistivo R_m^L , otro de carácter inductivo L_m^L y el tercero con carácter capacitivo C_m^L , como se muestra en la Figura 1.2b. No es necesario conocer para nuestros propósitos las expresiones que relacionan R_m^L , L_m^L y C_m^L con las propiedades físicas y geométricas del cuarzo y la carga, aunque se pueden obtener [Arnau et al. 2001b], el hecho más importante es que la respuesta eléctrica del resonador de cuarzo con carga se puede aproximar por un modelo extendido del circuito BVD, ver Figura 1.2b, formado por la capacidad paralela C_0^* y la rama dinámica (R_m^q , L_m^q , C_m^q , R_m^L , L_m^L y C_m^L) [Martin et al. 1991b]. La respuesta del sensor sin carga se determina por los elementos C_0^* , R_m^q , L_m^q y C_m^q ; mientras que las contribuciones de la carga se asocian a los elementos R_m^L , C_m^L y L_m^L . Mediante la medida de la respuesta del resonador sin carga en un margen de frecuencias alrededor de la resonancia y el ajuste de la admitancia al modelo equivalente obtenido, se pueden determinar los valores de C_0^* , R_m^q , L_m^q y C_m^q .

Cuando el sensor funciona en contacto directo con un medio líquido Newtoniano, el acoplamiento del líquido con la superficie del resonador produce un incremento de la impedancia dinámica, representado por la inductancia L_m^L y la resistencia R_m^L en el modelo del circuito equivalente, ya que la C_m^L suele considerarse varios órdenes de magnitud mayor a C_m^q en la práctica, que se expresa por [Martin et al. 1991b].

$$R_m^L = \omega_s L_m^L = \frac{n\omega_s L_m^q}{N\pi} \left(\frac{2\omega_s \rho \eta}{\mu_q \rho_q} \right)^{1/2} \quad (1.14)$$

Donde

n : Número de caras en contacto con el líquido.

N : Número de armónicos.

ω_s : Frecuencia angular de la resonancia serie.

ρ_q y $\mu_q = C_{66}$: Densidad y rigidez a la cizalla del cuarzo respectivamente.

Los elementos dinámicos R_m^L y L_m^L están asociados con la energía mecánica disipada y almacenada, respectivamente, en contacto con el fluido; cada uno es proporcional a $(\rho\eta)^{1/2}$.

La frecuencia de resonancia serie dinámica (MSRF) se define como la frecuencia a la cual la reactancia dinámica se anula, es decir, la impedancia dinámica tiene carácter puramente resistivo. Esta frecuencia se determina por la siguiente expresión:

$$f_s = \frac{1}{2\pi \sqrt{(L_m^q + L_m^L) \cdot C_m^q}} \quad (1.15)$$

De las ecuaciones (1.14) y (1.15) se deduce que un cambio de la MSRF, Δf_s , debido al líquido se puede calcular como [Martin et al. 1991a].

$$\Delta f_s = -\frac{L_m^L}{2L_m^q} f_s = -\frac{2\eta f_s^2}{N\sqrt{\mu_q \rho_q}} \left(\frac{\rho\eta}{4\pi f_s} \right)^{1/2} \quad (1.16)$$

Como se puede observar, Δf_s varía con $(\rho\eta)^{1/2}$ en concordancia con la predicción de Kanazawa y Gordon [Kanazawa et al. 1985]. Estos cambios en la frecuencia de resonancia serie proceden únicamente de cambios en la inductancia dinámica L_m^L y no de cambios en la resistencia dinámica R_m^L .

Estas relaciones entre los parámetros eléctricos y las propiedades físicas son las que permiten la utilización del QCR como sensor. La caracterización precisa de los parámetros adecuados del sensor puede permitir el seguimiento de procesos donde se producen cambios en las propiedades físicas del medio o medios en contacto con el QCR. En consecuencia, es preciso determinar en primer lugar cuales son los parámetros que mejor caracterizan las contribuciones

físicas sobre el sensor y en segundo lugar analizar los sistemas más adecuados para su determinación.

2 PARÁMETROS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE SENSORES DE CUARZO.

Para una apropiada evaluación de la respuesta del sensor es necesario definir, inicialmente, los parámetros que deben ser medidos, de acuerdo a la aplicación y a la interfaz de caracterización empleada. En algunos casos, es necesaria una completa caracterización del sensor, para lo cual se debe usar un analizador de impedancias o de redes como interfaz de caracterización. Afortunadamente, en muchas aplicaciones, como por ejemplo en QCM, no hace falta caracterizar completamente el sensor, sino que basta con determinar algunos parámetros claves, que deben ser monitorizados, para obtener la información deseada.

Los pasos para una adecuada caracterización de los parámetros del sensor, se detallan a continuación:

PASO 1: Determinación de los parámetros de referencia, de acuerdo a la aplicación

En algunas aplicaciones es necesario determinar los elementos C^*_0 , R^q_m , L^q_m y C^q_m , para la evaluación de la respuesta del dispositivo sin carga.

Generalmente, los valores C^*_0 , R^q_m , L^q_m y C^q_m vienen dados por el fabricante, aunque algunas veces no tienen la suficiente precisión y se tienen que volver a medir para usarlos como referencia antes del experimento. Estos parámetros se pueden determinar mediante un analizador de impedancias o de redes, midiendo la respuesta eléctrica del resonador sin carga en un margen de frecuencias alrededor de la frecuencia de resonancia y ajustando numéricamente el circuito equivalente del modelo para esos valores. En caso de no disponer de un analizador de impedancias, se puede utilizar la norma correspondiente [IEC 1986] o un método alternativo [Arнау et al. 2001c]. Una determinación más precisa de C^*_0 se puede realizar al doble de la frecuencia de resonancia [Cady, W.G.64].

A partir, de estos valores se pueden obtener los siguientes parámetros de interés:

f_s : Frecuencia de resonancia serie dinámica (MSRF). Se define como la frecuencia a la cual la reactancia dinámica se anula. Su medida se realiza de forma muy aproximada, midiendo la frecuencia de máxima conductancia

mediante un analizador de impedancias [Arnau et al. 2000a] y su expresión teórica a partir del modelo BVD.

$$f_s = \frac{1}{2\pi\sqrt{L_m^q C_m^q}} \quad (1.17)$$

h_q : Espesor del cristal de cuarzo.

$$h_q \approx \frac{1}{\omega_s} \sqrt{\frac{C_{66}}{\rho_q}} \sqrt{(n\pi)^2 - 8K_0^2} \quad (1.18)$$

C_0 : Capacidad estática. Esta capacidad se debe a los electrodos situados sobre los lados opuestos del resonador de cuarzo, actuando este como dieléctrico. Esta capacidad no incluye las capacidades parásitas externas al resonador (C_p), las cuales no influyen en los parámetros de la rama dinámica. [Martin et al. 1991a]. El valor de C_0 se puede determinar a partir de los valores de C_m^q y L_m^q de acuerdo a las ecuaciones (1.9) y (1.10), respectivamente.

C_p : Capacidad parásita en paralelo, externa al resonador. $C_p = C_{\theta}^* - C_0$. La medida de su magnitud se utiliza en aplicaciones donde la influencia de las propiedades dieléctricas de la carga tienen que ser tenidas en cuenta [Barnes 1991], o en algunas aplicaciones con una configuración especial de electrodos [Zhang et al. 2001] o para diferentes principios de excitación.

A_{eff} : Superficie efectiva del electrodo. Se puede determinar a partir de C_0 , h_q , la permitividad del cuarzo y la ecuación (1.7).

$$A_{eff} = \frac{h_q}{\epsilon_{22}} C_0 \quad (1.19)$$

Su valor es necesario en aplicaciones donde se miden espesores de capas. En todo caso, no es fácil medirlo, pues no necesariamente corresponde al área del electrodo. En algunos casos, la superficie efectiva del sensor puede ser más pequeña que la del electrodo.

Estos parámetros del resonador sin carga se tienen que medir como referencia y se deben tener en cuenta para la correcta caracterización de la carga; por ejemplo en los casos donde se caracterizan las propiedades de los líquidos. Sin embargo, en muchas aplicaciones, la referencia no es el resonador al vacío, porque estos parámetros pueden cambiar con la carga [Jimenez et al. 2006; Lucklum et al. 1997b]. En algunos casos, resulta mejor tomar los parámetros del sensor justo antes del comienzo del proceso como referencia. Por ejemplo, para aplicaciones electroquímicas donde el sensor está en contacto con una solución

electrolítica, es decir, un líquido newtoniano del que se conoce su impedancia característica, este sería el punto a tomar como referencia.

En algunas otras aplicaciones, como los biosensores basados en QCM, donde las pérdidas debido principalmente al contacto con la solución se espera que se mantengan constantes y solo el cambio de frecuencia de resonancia es el parámetro de interés, la frecuencia de resonancia del sensor en contacto con la solución antes del comienzo del proceso de detección se toma como referencia. Este valor permite la evaluación de los pequeños cambios de frecuencia debidos a la interacción biológica en la capa sensible en contacto con el cristal; siempre y cuando se realice un buen control de las variables ambientales.

PASO 2: Medida de las magnitudes del resonador, vibrando en modo cizalla en espesor (TSM) con carga, que sean más adecuadas para caracterizar las propiedades físicas y/o geométricas de la carga en relación con el modelo físico utilizado.

La Figura 1.2b muestra que la contribución de la carga es caracterizada por los elementos R_m^L , L_m^L y C_m^L de la rama dinámica; un cambio en L_m^L y C_m^L produce un cambio en la MSRF. La variación de las propiedades de la carga se ve reflejada, también, en cambios en la resistencia dinámica R_m^L . De esta manera, tanto la MSRF como la resistencia dinámica son parámetros útiles y necesarios para la caracterización del sensor. En algunos casos la medida de ambos parámetros permitirá discriminar cambios físicos de distinta índole en los medios que cargan el sensor.

Adicionalmente, es importante tener en cuenta que la mayoría de los modelos más sencillos, derivados a partir del modelo más completo como es el TLM (ecuación (1.1)), tales como el modelo del LEM [Cernosek et al. 1998] o el modelo BVD extendido [Martin et al. 1991a], asumen que el resonador opera alrededor de la MSRF. También es importante indicar que la mayoría de las ecuaciones que se utilizan para relacionar las variaciones de la frecuencia y la resistencia con las propiedades de la carga, se han obtenido suponiendo que el resonador oscila a su MSRF. Por lo tanto, si las variaciones de la frecuencia inducidas por la carga se miden a una frecuencia muy alejada de la MSRF, es posible que estas variaciones no concuerden con los modelos.

Otra característica que hace que la MSRF sea más útil que otras frecuencias para caracterizar el sensor es que su valor es independiente de los cambios en las capacidades parásitas en paralelo.

Por todo esto, se definen las variaciones en la MSRF y en la resistencia dinámica como los parámetros del resonador con carga que, al menos, se deben medir para una mínima caracterización del sensor. En muchas aplicaciones estos

dos parámetros no son suficientes para caracterizar por completo el sensor piezoeléctrico, y un completo análisis por espectroscopia de admitancias permite una caracterización más completa del sensor. Aún así, una caracterización completa del sensor no siempre permite interpretar sin incertidumbre los cambios en las propiedades físicas de la carga, ya que las variables a considerar pueden ser más numerosas que los parámetros a caracterizar, o bien la dispersión de las soluciones que son posibles dentro del error experimental cometido es tan alta que hace imposible cualquier interpretación razonable. Este último aspecto tiene que ver con el problema inverso y no es objeto de este trabajo de investigación.

3 SISTEMAS DE CARACTERIZACIÓN DE SENSORES PIEZOELÉCTRICOS Y SUS LIMITACIONES.

En este apartado se analizarán los sistemas electrónicos que en la actualidad se usan como interfaz para caracterizar los cristales de cuarzo. De acuerdo a su principio de funcionamiento los sistemas estudiados se dividen en cuatro grupos: analizador de impedancias o de redes, método del impulso y el decaimiento, osciladores y técnicas de enganche. Adicionalmente se ha tenido en cuenta las interfaces usadas para aplicaciones de *fast-QCM*.

3.1 Analizador de Impedancias o de Redes

Dados los problemas relacionados con los osciladores para una monitorización precisa de la frecuencia de los QCR [Barnes 1991; Kurosawa et al. 1990; Schumacher 1990], el uso de analizadores de redes o de impedancias para caracterizar el sensor ha sido ampliamente difundido [Noël M et al. 1994; Reed et al. 1990]. Normalmente esta técnica es usada bajo condiciones de laboratorio.

Un analizador de impedancias o de redes mide la impedancia o la admitancia eléctrica del sensor de cuarzo en un margen de frecuencias alrededor de la de resonancia, para una caracterización completa del dispositivo.

Ventajas:

- El dispositivo permite aislar el sensor de las influencias de los circuitos externos a él.

- Las influencias parásitas pueden ser excluidas por calibración, debido a que el sensor funciona como elemento pasivo.
- Se puede obtener información diferenciada en relación a diversas contribuciones de la carga midiendo tanto la conductancia como la susceptancia del sensor en un margen de frecuencias alrededor de la resonancia.

Sin embargo existen varios inconvenientes cuando se utiliza esta técnica para aplicaciones de sensores [Eichelbaum et al. 1999].

Desventajas:

- El elevado coste y el gran tamaño dificultan el uso de estos instrumentos para medidas remotas o *in situ*.
- La conexión entre el sensor y el equipo es difícil en algunos casos como en aplicaciones electroquímicas o biológicas, donde es conveniente que uno de los electrodos se encuentre conectado a masa.
- Dificultad para la caracterización simultánea de múltiples sensores.

Por otra parte, el analizador de impedancias puede determinar con gran precisión la MSRF y la resistencia dinámica de un sensor de cuarzo sin carga, para establecerlos como referencia. La MSRF es obtenida por la medida de la frecuencia correspondiente al mayor pico de conductancia alrededor de la frecuencia de resonancia. La resistencia dinámica se determina como la inversa del valor máximo de la conductancia. La evaluación de la MSRF y de la resistencia dinámica se basa en el modelo BVD para caracterizar la respuesta del sensor. Para un circuito BVD la MSRF es igual a la frecuencia a la máxima conductancia, y la resistencia dinámica es igual a la inversa del valor máximo de la conductancia. Para un resonador sin carga, el circuito BVD puede representar de forma muy precisa la respuesta del sistema. Adicionalmente, el margen de frecuencias de resonancia es muy pequeño y la resolución en frecuencia del instrumento es muy elevada; sin embargo para cargas con elevado factor de amortiguamiento, el factor de calidad del sensor se reduce considerablemente y el margen de frecuencias de resonancia se expande, reduciéndose la resolución en frecuencia y la adecuación del circuito BVD para representar la respuesta del sensor.

Para un resonador con carga, la determinación de la MSRF y la resistencia dinámica a partir de las mencionadas relaciones de igualdad no es tan precisa como para la situación sin carga pero permanece lo suficiente precisa para estas aplicaciones en las cuales el sensor se puede usar [Arнау et al. 2000a]. Por el contrario, para cargas con alto factor de amortiguamiento la determinación de los parámetros BVD no da información adicional aparte de la capacitancia

paralela, que puede ser medida de una manera más apropiada al doble de la frecuencia de resonancia. La determinación de la MSRF a partir de los elementos de la rama dinámica puede producir errores, dependiendo del algoritmo usado para la extracción de los parámetros.

3.1.1 Adaptaciones del Analizador de Impedancias.

Para evitar los inconvenientes clásicos de los analizadores de redes o de impedancia, se han realizado esfuerzos importantes para adaptar su principio de funcionamiento en pequeñas tarjetas electrónicas más adaptables a las configuraciones experimentales típicas de los sensores QCR.

Estos sistemas mantienen las altas especificaciones de los analizadores de impedancias en el rango de frecuencias y de impedancias típicas de los sensores QCR, permitiendo la portabilidad. Las características de estos circuitos los hacen apropiados para la mayoría de las aplicaciones.

Los circuitos adaptados optimizan la adquisición, aumentando la velocidad de la toma de datos en comparación con los analizadores clásicos, permitiendo adquirir cada dato de impedancia en un rango entre 1 y 5 ms. [Schröder et al. 2001]; esto significa que cada espectro de impedancia puede ser registrado entre 1 y 5 s, suponiendo que se toman 1000 puntos por cada espectro. Este tiempo de adquisición es suficiente para la mayoría de aplicaciones. Sin embargo no son apropiados para aplicaciones de Fast QCM, donde se necesitan registrar rápidos cambios de frecuencia [Gabrielli et al. 2007; Torres et al. 2006].

Otros circuitos simples han sido desarrollados bajo el principio de hacer funcionar el sensor como elemento pasivo, usado por los analizadores de impedancias. Es decir haciendo pasar a través del sensor una señal que barre el margen de frecuencias de resonancia del sensor. De esta manera en lugar de recuperar la información en términos de la conductancia y la susceptancia lo que se obtiene es un nivel de tensión asociado a la función de transferencia en la que el sensor toma parte; luego la impedancia del sensor se sustituye en un modelo cuyos parámetros se ajustan a los niveles de tensión adquiridos [Calvo et al. 1997; Kurosawa et al. 1993].

Por ejemplo, en el método de función de transferencia usado por Calvo y Etchenique, el sensor forma parte de un divisor de impedancias, donde la otra impedancia es conocida [Calvo et al. 1997].

La Figura 3.1 muestra el divisor de impedancias, donde el sensor ha sido perfectamente caracterizado por el circuito equivalente BVD (Figura 1.2c).

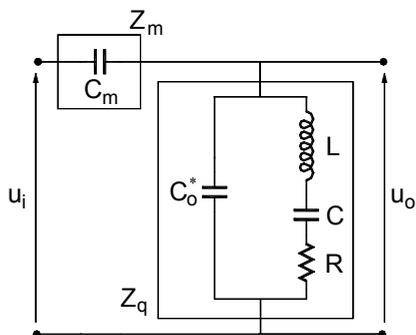


Figura 3.1: Divisor de impedancias para el método de función de transferencia usado por Calvo y Etchenique [Calvo et al. 1997].

Una señal senoidal aplicada a la entrada hace un barrido de frecuencias en un margen alrededor de la frecuencia de resonancia del sensor. Los valores medios de voltajes de la entrada y la salida son medidos y adquiridos con un conversor A/D y capturados con un ordenador. De esta manera se obtiene una medida experimental del valor absoluto de la función de transferencia, para el rango de frecuencias seleccionado.

Si se asume que la capacidad dinámica se mantiene constante, el resto de parámetros C_0 , L y R , se obtiene mediante un ajuste no lineal de los datos experimentales a la ecuación que proporciona la función de transferencia. Finalmente, los autores de esta técnica hacen notar que es una ventaja usar el condensador C_m en lugar de una resistencia, para formar el divisor de tensión, como se muestra en la Figura 3.1. La función de transferencia teórica estaría dada por: (ecuación (1.20)):

$$\left| \frac{u_o}{u_i} \right| = \frac{\sqrt{\left(\omega L - \frac{1}{\omega C} \right)^2 + R^2}}{\sqrt{\left(\omega L - \frac{1}{\omega C} + \frac{\omega L C_0}{C_m} - \frac{C_0}{\omega C C_m} - \frac{1}{\omega C_m} \right)^2 + \left(R + \frac{R C_0}{C_m} \right)^2}} \quad (1.20)$$

Una aplicación interesante ha sido descrita recientemente por Kankare [Kankare et al. 2006a]; la configuración incluye un QCR en serie con un condensador (como fue descrito anteriormente); como señal de entrada o señal de prueba para el divisor de tensión se usa una señal modulada en doble banda lateral con portadora suprimida, cuya portadora hace un barrido en todo el

margen de frecuencia alrededor de la frecuencia de resonancia. Esta estrategia confiere características especiales al sistema, que vale la pena que sean tratadas con más detalle.

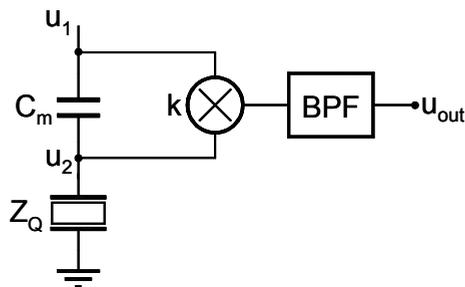


Figura 3.2: Diagrama esquemático de la interfaz de Kankare [Kankare et al. 2006b]

El principio de funcionamiento se muestra en la Figura 3.2 donde el voltaje a la entrada del multiplicador está dado por la siguiente expresión:

$$u_1 = U_0 \sin \omega_m t \cos \omega_c t = \frac{U_0}{2} (\sin \omega_+ t - \sin \omega_- t) \quad (1.21)$$

$$u_2 = \frac{U_0}{2} (f(\omega_+) \sin(\omega_+) + g(\omega_+) \cos(\omega_+)) + \frac{U_0}{2} (f(\omega_-) \sin(\omega_-) + g(\omega_-) \cos(\omega_-)) \quad (1.22)$$

donde $\omega_+ = \omega_c + \omega_m$, $\omega_- = \omega_c - \omega_m$, y las funciones $f(\omega)$ y $g(\omega)$ son la parte real e imaginaria del divisor de tensión de la función de transferencia dadas por las siguientes expresiones:

$$f(\omega) = \operatorname{Re} \left(\frac{1}{1 - j \frac{Y_Q}{\omega C_m}} \right); g(\omega) = \operatorname{Im} \left(\frac{1}{1 - j \frac{Y_Q}{\omega C_m}} \right) \quad (1.23)$$

donde Y_Q es la admitancia del sensor a la frecuencia correspondiente.

Como puede comprenderse el sensor es simultáneamente atacado por dos frecuencias de prueba $\omega_+ = \omega_c + \omega_m$, $\omega_- = \omega_c - \omega_m$.

El desplazamiento entre las dos frecuencias de prueba ($2\omega_m$) puede ser fácilmente controlado por una apropiada selección de la frecuencia moduladora que es mantenida constante durante todo el test de impedancia.

Después, multiplicando la señal de entrada y eliminando la señal de alta frecuencia y la componente continua (dc) por un apropiado filtrado (demodulación de u_2), se obtiene la siguiente señal de baja frecuencia a la salida:

$$u_{out} = \left(\frac{1}{8}\right) khU_0^2 \left(-(f(\omega_+) + f(\omega_-)) \cos 2\omega_m t + (g(\omega_+) - g(\omega_-)) \sin 2\omega_m t \right) \quad (1.24)$$

La señal demodulada está formada por dos señales coherentes de frecuencia $2\omega_m$, cuya amplitud contiene la información de impedancia del sensor a través de las funciones $f(\omega)$ y $g(\omega)$ dadas por la Ec (1.23). A partir del modelo de impedancia dinámica del sensor LEM [Cernosek et al. 1998], y estimando los parámetros del resonador sin carga, los autores obtienen la parte real e imaginaria de la impedancia superficial de carga, mediante un ajuste no lineal de los datos obtenidos a la amplitud de la componente en cuadratura $g(\omega_+)$ y $g(\omega_-)$.

Esta configuración tiene tres ventajas en comparación con los analizadores de impedancias clásicos:

- II. La información de la fase y la magnitud de la impedancia del sensor se lleva en la amplitud de una señal de baja frecuencia; lo que hace que sea más fácil y precisa su adquisición.
- III. Debido a que la señal de interés está formada por la diferencia entre dos señales coherentes, cualquier señal de ruido parásito es cancelada.
- IV. La forma diferencial de la señal permite el incremento de la sensibilidad en el caso que el sensor trabaje con cargas muy amortiguantes. En efecto, dentro de un cierto rango, un incremento en la frecuencia de modulación, incrementa la diferencia entre $g(\omega_+)$ y $g(\omega_-)$; esto crea un efecto amplificador manteniendo el ruido en un nivel bajo, y por lo tanto aumentando la relación señal/ruido.

Este método original podría considerarse como una mejora de los sistemas de análisis de impedancia clásicos y se puede utilizar en cualquier aplicación de QCM a excepción de los Fast QCM.

3.2 Método de la Respuesta al Impulso y Desvanecimiento.

Los métodos de respuesta al impulso y desvanecimiento se basan en el mismo principio. Para ilustrarlo se tendrá en cuenta el circuito eléctrico de la Figura 3.3.

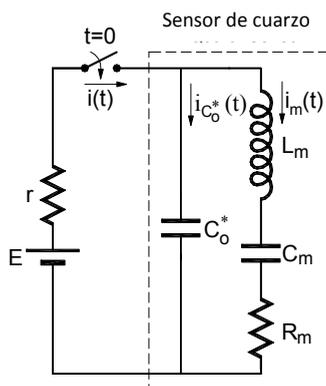


Figura 3.3: Diagrama para mostrar el principio de funcionamiento de método de la respuesta al impulso.

En el instante inicial el interruptor conectado a una fuente de tensión de valor E , con una resistencia de salida r de pequeño valor se conecta al sensor representado por el circuito BVD. La corriente $i(t)$ evolucionará según la expresión (se asume que $r \ll R_m$):

$$\begin{aligned}
 i(t) &= i_{C_o^*}(t) + i_m(t) \\
 &\approx \frac{E}{r} e^{-\frac{t}{rC_o^*}} + \frac{E}{L} \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{L_m C_m} - \left(\frac{R_m}{2L_m}\right)^2}} e^{-\frac{R_m}{2L_m} t} \sin\left(\sqrt{\frac{1}{L_m C_m} - \left(\frac{R_m}{2L_m}\right)^2} t\right)
 \end{aligned} \quad (1.25)$$

El primer término se asocia a la corriente que atraviesa la capacidad paralela, $i_{C_o^*}(t)$, con una constante de tiempo $\tau_{C_o^*} = rC_o^*$, mientras que la constante de tiempo del segundo término, asociada a la corriente que atraviesa la rama dinámica del sensor, $i_m(t)$, es $\tau_m = 2L_m/R_m$.

Considerando los valores típicos para un resonador de cuarzo AT de 10MHz con carga (Tabla 3.1) y $r=2\Omega$, la constante de tiempo del desvanecimiento $\tau_{C_o^*}$ es cerca de 10^6 veces menor que τ_m . Por lo tanto, la corriente total $i(t)$ estará

dominada principalmente por el segundo término de la ecuación (1.25) una vez haya pasado el instante inicial. Con un adecuado circuito adaptador, la oscilación amortiguada se puede grabar en un osciloscopio digital y posteriormente almacenarla, vía GPIB, en un ordenador. Un ajuste numérico de la curva grabada permite obtener la constante de tiempo τ_m y la frecuencia de la oscilación amortiguada dada por (ecuación (1.26)):

$$f_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_m C_m} - \left(\frac{R_m}{2L_m}\right)^2} \quad (1.26)$$

La constante de tiempo τ_m se puede relacionar con el factor de calidad, Q_R , usando la expresión aproximada $Q_R \approx 2f_s L_m / R_m = \pi \tau_m f_s$; donde f_s es la MSRF del QCR con carga. Así, la frecuencia de las oscilaciones amortiguadas se puede poner en función de f_s y Q_R obteniéndose:

$$f_m = f_s \sqrt{1 - \frac{1}{4Q_R^2}} \quad (1.27)$$

De esta forma, midiendo la constante de tiempo y la frecuencia de las oscilaciones amortiguadas se puede determinar el factor de calidad y la MSRF. Se puede considerar, sin incurrir en errores significativos, que la reducción del factor de calidad es proporcional al incremento en la resistencia dinámica; de esta forma se puede realizar la medida de la magnitud. En la práctica, el método de respuesta al impulso es difícil de realizar por dos motivos fundamentales:

- I. Pulsos con pendientes ideales infinitas son difíciles de conseguir.
- II. Otros armónicos diferentes de los deseados se pueden excitar, para evitarlo se necesitan circuitos adicionales que interfieren con la respuesta del sensor.

Tabla 3.1: Valores típicos para los parámetros del modelo BVD de un QCR en corte AT a 10 MHz

C_0^* (pF)	10
L_m (mH)	7,5
C_m (fF)	33,7
R_m (Ω)	100-5000

En lugar del método de la respuesta al impulso se utiliza, en la práctica, el método del decaimiento [Rodahl et al. 1996b; Rodahl et al. 1996c]. Los fundamentos del método de medida son muy parecidos a los ya descritos. Un resonador piezoeléctrico se conecta a un generador de señal aproximadamente sintonizado a la frecuencia del armónico deseado. Para un instante que se considera $t=0$, la señal del generador se desconecta mediante la apertura de un relé. En este instante la tensión o la corriente (dependiendo si es la frecuencia de resonancia paralelo o la serie la que se excita de acuerdo con la configuración eléctrica) [Rodahl et al. 1996a] se desvanece, evolucionando según una sinusoidal atenuada exponencialmente, que matemáticamente se puede expresar como:

$$A(t) = A_0 e^{-\frac{t}{\tau_m}} \sin(2\pi ft + \Phi) \quad t \geq 0 \quad (1.28)$$

Donde A_0 es la amplitud para un tiempo $t = 0$, Φ es la fase y f es la frecuencia dada por:

$$f \approx f_i \sqrt{1 - \frac{1}{4Q_L^2}} \quad (1.29)$$

Donde f_i es la MSRF (f_s) del QCR con carga o la frecuencia de resonancia paralelo, f_p , relacionadas por la ecuación:

$$f_p = f_s \sqrt{1 + \frac{C_m}{C_0^*}} \quad (1.30)$$

En la ecuación (1.29), se ha asumido de forma implícita que el factor de calidad es el mismo en ambos modos, serie y paralelo, y se expresa por:

$$Q \cong \frac{L\omega_s}{R} \cong \frac{L\omega_p}{R} \quad (1.31)$$

En el modo de excitación serie, los efectos de la capacidad paralelo se eliminan por el cortocircuito de la rama dinámica y la frecuencia de las oscilaciones amortiguadas se encuentra muy próxima a la verdadera MSRF. Esta es la principal ventaja de este método.

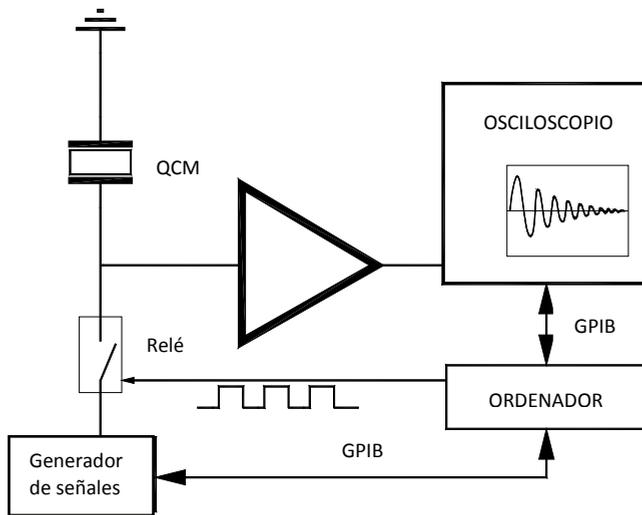


Figura 3.4: Configuración experimental para medir la frecuencia de resonancia paralela y el efecto de disipación paralelo.

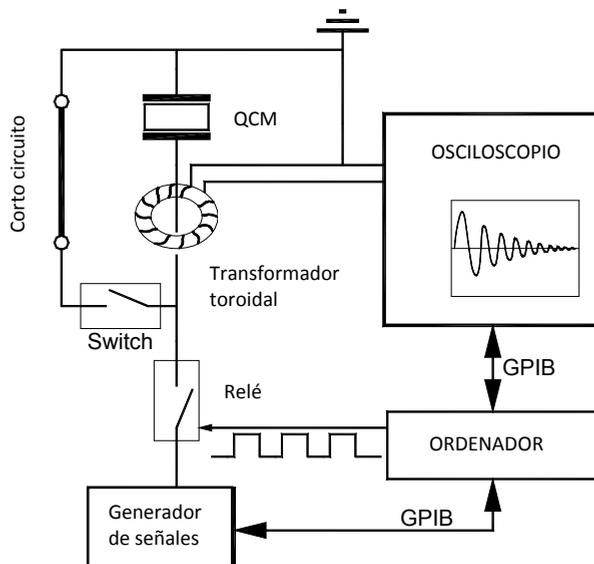


Figura 3.5: Configuración experimental para medir la frecuencia de resonancia serie y el efecto de disipación serie.

La precisión del método de desvanecimiento es muy elevada, siempre y cuando la medida de la frecuencia y la envolvente se realicen de forma precisa. Esta medida se complica para cargas fuertemente amortiguadas. Esta técnica reduce el precio del instrumental que se necesita en comparación con los analizadores de impedancias o de redes. Sin embargo, la calidad y las dimensiones de los equipos que se necesitan todavía son elevadas, principalmente si se quiere una determinación muy precisa de la frecuencia y de la envolvente de la sinusoidal amortiguada exponencialmente. Así, este método es más apropiado para entornos de laboratorios que para aplicaciones de sensores en las que se requiere la caracterización de múltiples dispositivos con medidas continuas.

3.3 Osciladores.

3.3.1 Principio Básico de un Oscilador LC

Un oscilador LC consiste en un amplificador con realimentación positiva, incluyendo un circuito resonador LC, como elementos de control de frecuencia. En el caso más general el circuito resonador puede involucrar transformadores o resonadores piezoeléctricos. En el último caso, cuando un resonador de cuarzo controla la frecuencia de oscilación, se le llama “Oscilador a cristal (crystal oscillator)”.

La Figura 3.6, muestra el funcionamiento básico de un oscilador LC, en el tiempo $t = 0$, el switch $S1$ es cerrado y el condensador C , es cargado con el voltaje de la fuente. Una vez que el condensador ha sido cargado, el switch $S1$ es abierto y el switch $S2$ es cerrado. La Figura 3.7a muestra la situación donde $i_g=0$, la corriente i en el circuito obedece a la siguiente ecuación diferencial:

$$i'' + \frac{1}{LC}i = 0 \quad (1.32)$$

Esta corriente corresponde a una señal senoidal cuya frecuencia es $\omega_s = (LC)^{-1/2}$. Esta frecuencia es igual a la frecuencia de la resonancia eléctrica del circuito LC.

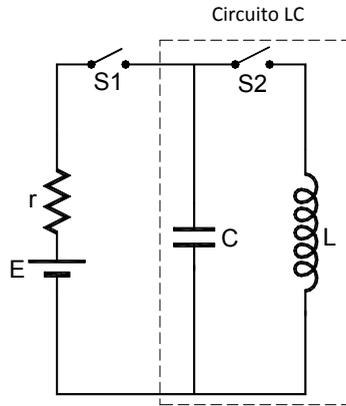


Figura 3.6: Diagrama que ilustra el principio de funcionamiento de un circuito resonante.

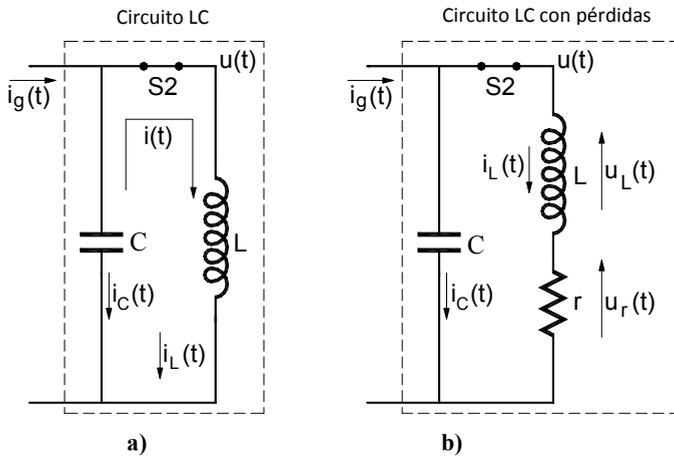


Figura 3.7: Parte de la Figura 3.6 que explica el fenómeno de la resonancia eléctrica. a) Resonador con carga. b) Resonador sin carga.

El diagrama fasorial de la Figura 3.8a ofrece un punto de vista diferente. Tomando el voltaje u como referencia, las corrientes i_L e i_C a través de la bobina y el condensador, respectivamente, tienen la misma magnitud pero signo contrario, por lo tanto:

$$C\omega u = \frac{u}{L\omega} \tag{1.33}$$

La ecuación anterior es únicamente válida para la frecuencia de resonancia serie ω_s . Como consecuencia, el circuito LC descrito, puede proporcionar una señal senoidal de amplitud constante.

A continuación, considerando las inevitables pérdidas representadas en la Figura 3.7b, por la pequeña resistencia r en serie con la bobina. El nuevo, diagrama fasorial es mostrado en la Figura 3.8b, dejando clara la necesidad de una corriente i_g , proveniente de un generador externo, por ejemplo un amplificador, a fin de mantener la magnitud de voltaje u constante. De lo contrario, la amplitud de este voltaje senoidal disminuiría en la forma de una función exponencial decreciente.

En conclusión, se hace necesario el uso de una fuente externa que compense las pérdidas de energía debido a la resistencia. Una configuración típica de un circuito formado por un amplificador y un circuito resonador LC es mostrado en la Figura 3.9a, donde el condensador C es cambiado por dos condensadores C_1 y C_2 .

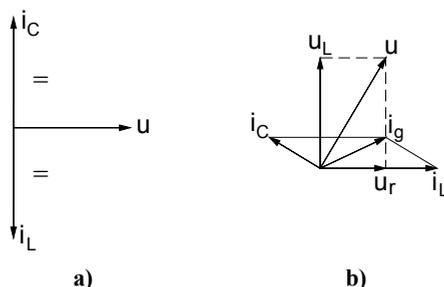


Figura 3.8: Diagrama fasorial correspondiente a las magnitudes del circuito de la Figura 3.7, asumiendo amplitud constante

En la Figura 3.9a, el amplificador puede ser cambiado por un transistor donde B = Base, C = Colector y E = emisor. El circuito resultante puede pertenecer a una de las típicas configuraciones: Colpitts, Hartley, Pierce o Clapp [Frerking,M.E.78; Parzen,B. et al83].

El circuito mostrado en la Figura 3.9a es muy usado para comprender el principio básico de funcionamiento de los osciladores LC y sus limitaciones.

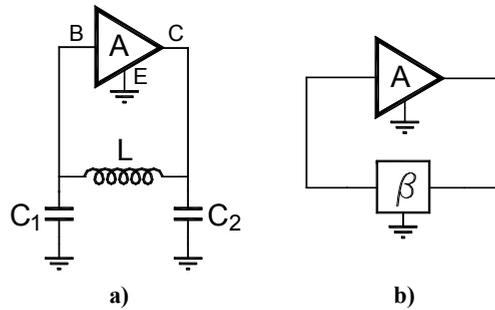


Figura 3.9: Esquema que muestra el funcionamiento básico de un oscilador. a) Circuito tanque con realimentación. b) La realimentación se muestra como una caja negra.

3.3.2 Condición de Oscilación

El circuito mostrado en la Figura 3.9a puede ser esquemáticamente representado como lo muestra la Figura 3.9b, que debe cumplir las condiciones de oscilación derivadas de la siguiente ecuación:

$$A\beta=1 \quad (1.34)$$

La ecuación anterior involucra dos condiciones:

- a) La condición de ganancia.

$$|A\beta|=1 \quad (1.35)$$

- b) La condición de fase:

$$\arg A + \arg \beta = 0 \quad (1.36)$$

Esta condición está extremadamente relacionada con el concepto de estabilidad, como se verá más adelante. Las condiciones anteriores se conocen como “Condiciones de Barkhausen” y su aplicación permite obtener la relación entre los diferentes parámetros del oscilador incluyendo los del resonador. [Ehahoun et al. 2002]. Los circuitos de la Figura 3.9a y la Figura 3.9b pueden ser usados para entender fácilmente las dos configuraciones básicas del oscilador a cristal: Modo serie y paralelo.

3.3.3 Modo Paralelo del Oscilador de Cristal.

En esta configuración, el cristal piezoeléctrico se comporta como una inductancia y se utiliza en lugar de la bobina como se muestra en la Figura 3.9a. Esto es posible debido al carácter inductivo de la impedancia del cristal piezoeléctrico en el margen de frecuencia entre las frecuencias de resonancia correspondientes a fase nula en una determinada resonancia. Así, en el modo paralelo la fase del cristal es positiva, pero en general no se conoce con exactitud.

En el modo paralelo, la frecuencia de oscilación corresponde a la frecuencia de resonancia eléctrica del circuito serie formada por los condensadores C_1 , C_2 y la inductancia equivalente L_{eq} del cristal piezoeléctrico a la frecuencia de oscilación ω_0 , dado por:

$$L_{eq} = \frac{X_{eq}}{\omega_0} \quad (1.37)$$

Donde X_{eq} , es la reactancia equivalente sin pérdidas del cristal a la frecuencia de oscilación ω_0 , dada por:

$$X_{eq} = \frac{\omega_0^2 LC - 1}{\omega_0^2 (C + C_0) \left(1 - \omega_0^2 \frac{CC_0}{C + C_0} L \right)} \quad (1.38)$$

Donde L , C y C_0 son parámetros del modelo de circuito BVD vibrando en un rango de frecuencias cercanas a la de resonancia.

Por lo anterior, la expresión de la frecuencia de resonancia es:

$$\omega_0 = \frac{1}{\sqrt{L_{eq} C_t}} \quad (1.39)$$

Donde: $C_t = C_1 C_2 / (C_1 + C_2)$. Usando las ecuaciones (1.37), (1.38) y (1.39) y resolviendo ω_0 , se obtiene la expresión final para la frecuencia de oscilación angular:

$$\omega_0 = \frac{1}{\sqrt{L \frac{C(C_0 + C_t)}{C + C_0 + C_t}}} \quad (1.40)$$

La expresión obtenida es igual a la expresión de la frecuencia de resonancia paralela de un circuito BVD con una capacitancia paralela dada por: $C_0 + C_i$; esta es la razón por la que se llama oscilador de cristal en modo paralelo, donde el cristal resonador es usado como una inductancia; sin embargo, la frecuencia de oscilación no es la frecuencia de resonancia paralelo del cristal, si no una frecuencia a la cual el cristal resonador tiene comportamiento inductivo. Esta frecuencia depende de los valores de C_1 y C_2 y debe estar situada entre las frecuencia de resonancia de fase nula del resonador a una determinada resonancia.

3.3.4 Modo Serie del Oscilador de Cristal.

En el modo serie, el resonador es colocado entre dos puntos del lazo de realimentación; de esta manera, el cristal se comportará como si fuese un cortocircuito para cumplir la condición de fase de oscilación. En teoría, la señal que cruza a través del cristal (como cortocircuito) no experimenta ningún cambio de fase. Si el oscilador de cristal de cuarzo en modo serie está bien diseñado, el resonador piezoeléctrico controlará la frecuencia de oscilación, y el sistema oscilará en una frecuencia cercana a la frecuencia de fase cero de baja impedancia del resonador.

La Figura 3.9b permite comprender: el modo de operación del oscilador en modo serie y el concepto de estabilidad. Para hacer más fácil la explicación, se supone que el amplificador tiene una función de transferencia real y positiva. Como consecuencia, el circuito de la Figura 3.9b para comportarse como oscilador deberá cumplir con la condición de fase para una determinada frecuencia, y a dicha frecuencia el cambio de fase a través del circuito β debe ser cero. Ahora suponemos que esta frecuencia coincide con la frecuencia de resonancia de fase cero correspondiente a la menor impedancia del resonador de cuarzo a utilizar en un oscilador serie. La Figura 3.10a es un diagrama simplificado de este oscilador, donde la caja negra X en serie con el circuito β en la red de realimentación representa el resonador. La condición de fase podrá ser cumplida cuando el cambio de fase total a través del circuito β y el resonador sea igual a cero. Dado que el resonador y el circuito β tienen la misma frecuencia de fase cero, esta podrá ser la frecuencia de oscilación; en cualquier caso, la ganancia del amplificador podrá variar a fin de compensar las pequeñas pérdidas introducidas por el cristal y la red β . En conclusión y para este caso ideal, la frecuencia de oscilación corresponderá a la frecuencia de resonancia de fase cero de baja impedancia del resonador.

Veamos el caso en que el cambio de fase a través del circuito β a la frecuencia de fase cero de baja impedancia del resonador no sea cero. Este caso permite introducir el concepto de estabilidad y comprender el problema asociado

al uso de los osciladores para monitorizar la frecuencia apropiada del sensor piezoeléctrico. La Figura 3.10b ilustra esta situación donde la línea continua representa la fase de la impedancia del resonador en un rango de frecuencias cercanas a la frecuencia de fase cero de mínima impedancia del resonador.

Suponiendo ahora que la variación de la fase a través del circuito β a la frecuencia de resonancia de fase cero es $-\alpha$, la condición de oscilación requiere que: $\arg X + \arg \beta = 0$, esto hace que $\arg X = \alpha$; en consecuencia, la frecuencia de oscilación varía una cantidad Δf_i con respecto a la frecuencia de resonancia de fase cero, como se muestra en la Figura 3.10b.

Cuando el factor de calidad Q de los resonadores es muy alto, el desplazamiento de la frecuencia es muy pequeño, debido a la pronunciada pendiente de la función de transferencia fase-frecuencia del sensor. Sin embargo, cuanto menor es Q mayor es el grado de variación de la frecuencia, como puede ser observado en la curva 2 de la Figura 3.10b. Este concepto fundamental permite el entendimiento del problema asociado con la monitorización de los parámetros del sensor como la MSRF y la resistencia dinámica con un oscilador.

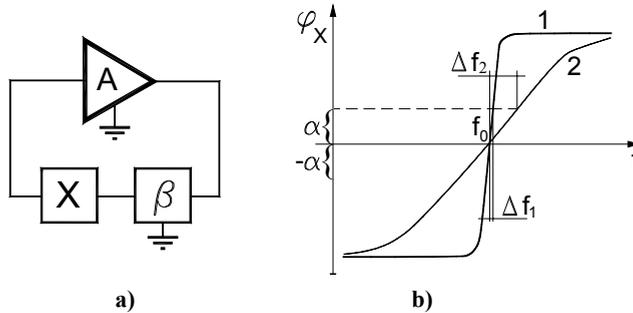


Figura 3.10: Circuito esquemático que ilustra la operación básica de un oscilador de cristal. a) El circuito incluye el dispositivo resonador en la rama de realimentación. b) La rama ilustra la alta relación entre la estabilidad de la frecuencia y el factor de calidad de la rama de realimentación del resonador.

3.3.5 Problemática Asociada a la Medida de la MSRF

Los sistemas descritos anteriormente interrogan de forma pasiva el resonador de cuarzo y con un adecuado circuito, se puede medir de forma aislada los parámetros característicos deseados del sensor, es decir, el circuito externo no interfiere en la respuesta del sensor; esta es la gran ventaja de los métodos

descritos. Sin embargo, un oscilador es un circuito formado por un amplificador con realimentación positiva que usa el resonador como elemento de control de la frecuencia. Así, en osciladores los sensores forman parte del bucle de realimentación y la frecuencia de oscilación se caracteriza por una cierta fase de la impedancia del cuarzo, la cual depende tanto del resonador de cuarzo como del circuito externo al sensor. Cuando las características reales de los amplificadores y del resto de los componentes que forman el oscilador se tienen en cuenta, es complicado conocer de forma precisa la función que relaciona la frecuencia con las fases del circuito externo y del sensor. Más aún, en general, la fase del sensor para la condición de oscilación no se puede conocer de forma precisa, lo que hace más aguda la problemática asociada a los osciladores.

Cuando el desfase que se produce en el circuito exterior alrededor de las frecuencias de resonancia se puede considerar constante, la fase de la impedancia del cuarzo a la que se produce la oscilación también se puede considerar constante. Así pues, cuando las propiedades del resonador se alteran debido a los efectos de la carga, la fase del resonador cambia y se desplaza la frecuencia de oscilación del conjunto hasta encontrar una nueva frecuencia en la cual la fase del sensor cumpla la condición de oscilación. Además, debido al principio de funcionamiento del oscilador, la verdadera MSRF no se puede medir de forma continua cuando se utiliza un oscilador para medir los cambios de frecuencia inducidos por la carga; al menos, en un oscilador en el que la fase de la impedancia del cuarzo para la condición de oscilación se mantiene constante. Esto se puede mostrar utilizando el circuito BVD como modelo del sensor (Figura 1.2c).

Se puede entender que la MSRF no depende de los valores específicos de la resistencia dinámica R_m y de la capacidad paralela C^*_ρ . Así, si la resistencia dinámica cambia mientras permanecen constantes L_m y C_m la MSRF no cambia pero si lo hace la fase del cuarzo. En esta situación, la frecuencia de oscilación cambiará para encontrar la fase del cuarzo correspondiente a la condición de oscilación y este desplazamiento de frecuencia supone un error en la medida de la MSRF cuando es uno de los parámetros de interés. La Figura 3.11 muestra como la frecuencia de oscilación y la variación de la frecuencia con respecto a la frecuencia del resonador al vacío depende de la fase de oscilación, para cumplir con la condición de oscilación. De esta forma diferentes osciladores pueden proporcionar diferentes desplazamientos de frecuencia para el mismo resonador y con las mismas condiciones de carga experimental. Esto puede dar origen a falsas conclusiones e interpretaciones. Por otra parte, puede ocurrir que la oscilación cese si no se puede cumplir la condición de oscilación para una determinada condición de carga.

Otra consideración que hace clara la elección de la MSRF como uno de los parámetros de interés, es su independencia de las capacitancias parásitas en paralelo con el sensor. Por otro lado, debido al principio de funcionamiento del

oscilador, las capacitancias paralelas con el sensor siempre tienen importantes efectos en la frecuencia de oscilación; esto se debe a que el oscilador busca una cierta fase y no una determinada frecuencia del sensor. De este modo, un cambio en la capacidad paralelo debido a efectos parásitos, no cambia la MSRF, pero si la fase del sensor y por consiguiente varía la frecuencia de oscilación. [Auge et al. 1994; Barnes 1992; Tiaan et al. 1990].

Como se mostró, la frecuencia de oscilación no solo depende de la carga de masa (inductancia dinámica), sino también de la disipación (resistencia dinámica). Esto debe tenerse en cuenta cuando se usa un oscilador en una aplicación específica, donde las propiedades físicas de la carga pueden cambiar, produciendo cambios tanto en la masa como en la disipación.

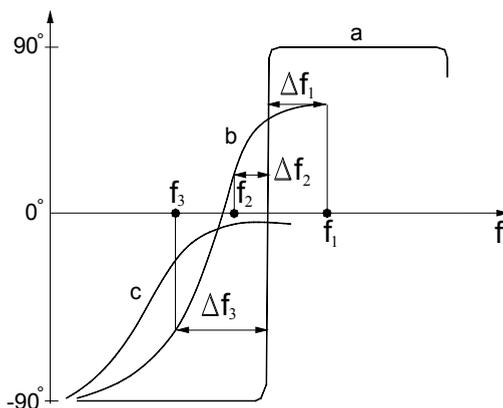


Figura 3.11: Gráfica que ilustra los diferentes cambios de la frecuencia con respecto a la frecuencia de resonancia del resonador sin carga. Asociado a las diferentes fases de oscilación para cumplir con la condición de oscilación de un oscilador.

3.3.6 Problemática Asociada a la Medida de la Resistencia Dinámica

En una gran número de aplicaciones en las que los resonadores de cuarzo se utilizan como sensores se necesita otra magnitud, además del desplazamiento de la MSRF, para discriminar las contribuciones de distintos fenómenos físicos [Martin et al. 1991b]. En lo que concierne a los osciladores, muchos diseños incorporan un sistema de control automático de ganancia (Automatic Gain Controller, AGC) para la medida de la actividad del sensor de cuarzo en resonancia [Borngräber et al. 2002; Bottom, V.E.82; Chagnard et al. 1996; Hayward 1992; Hayward et al. 1994; Paul et al. 1998; Wessendorf 1993]. El

sistema AGC intenta mantener el nivel de la señal en un punto del oscilador constante y en un valor prefijado. Con este propósito genera una tensión, (tensión AGC), que modifica la ganancia del amplificador para mantener el nivel de la señal constante en el punto seleccionado en relación a una tensión de referencia. En muchos diseños se asegura una proporcionalidad entre la tensión AGC y el cambio en la resistencia dinámica [Auge et al. 1994; Borngräber et al. 2002; Chagnard et al. 1996; Eichelbaum et al. 1999; Wessedorf 1993]. En algunos de estos sistemas AGC la proporcionalidad se justifica sólo desde un punto de vista físico [Chagnard et al. 1996]. En otros, se obtienen expresiones matemáticas que con algunas simplificaciones muestran esta proporcionalidad [Wessedorf 1993], pero también se confirma que esta proporcionalidad se pierde en algunos casos [Martin et al. 1997].

Se puede demostrar que incluso en la situación más ideal, es muy difícil lograr que el cambio de tensión proporcionado por un sistema AGC incluido en un oscilador sea proporcional al cambio de resistencia dinámica; a menos que la capacitancia paralela del sensor sea suprimida o compensada. [Arnau et al. 2002].

3.3.7 Osciladores para Sensores QCM

A pesar de los inconvenientes mencionados anteriormente, de los circuitos osciladores QCR para aplicaciones como sensores; su bajo costo, su capacidad de integración y monitorización continua, son algunas características que hacen de los osciladores una buena opción para la mayoría de aplicaciones como sensores químicos. En esa sección se presentará una revisión de las diferentes configuraciones de osciladores usados como interfaz de caracterización en las últimas dos décadas.

En aplicaciones de medida de gases o vapores, el resonador tiene un alto factor Q lo que hace que los osciladores sean una muy buena opción para un sensor. Si no se necesitan requisitos especiales, se pueden usar las configuraciones clásicas: Pierce, Colpitts, Miller, etc. Para una matriz de sensores, sería ventajoso que una de las caras del cristal estuviera conectada directamente a tierra para evitar el acoplamiento entre los osciladores, aunque esta recomendación puede ser innecesaria si se mantiene un cierto nivel de aislamiento entre los circuitos. [Ni et al. 2003].

Para aplicaciones en las que el QCR debe estar en contacto con líquidos, el factor Q del resonador es drásticamente reducido, por ejemplo para un AT QCR a 10 MHz el factor Q es reducido de 80000 a 3000, con sólo una cara en contacto con agua. De otro lado, la amortiguación y el factor Q pueden variar durante el experimento. Esta reducción implica tener en cuenta un cuidado

especial a la hora de diseñar un oscilador: por una parte en la selección de la configuración más adecuada y por otra parte en la selección de los componentes del circuito oscilador, principalmente en términos de estabilidad de sus características eléctricas en función de los cambios de las variables externas como la temperatura, la humedad, etc. La razón se ha explicado antes (ver Figura 3.10b). Para un factor Q alto, cambios en la fase del sensor, debido a condiciones externas son fácilmente compensados con pequeños cambios en la frecuencia del resonador y aparecen en la señal como pequeños ruidos. Para un factor Q bajo, pequeños cambios de fase en el oscilador o en el resto de componentes del bucle del oscilador tendrán que ser compensados con mayores cambios en la frecuencia de oscilación. En este caso, el ruido no es despreciable y un buen control de las variables externas tendrá que ser aplicado para minimizar este problema. Por lo tanto, se debe tener sumo cuidado a la hora de diseñar la celda, la temperatura se debe mantener lo más estable posible, el ruido electrónico del circuito se debe disminuir al mínimo, el sensor debe ser protegido de las vibraciones con un apropiado sistema inercial, etc. Este aspecto que no suele tenerse en cuenta, es muy importante para disminuir los niveles de ruido en los osciladores y es uno de los aspectos más importantes para incrementar la resolución de los QCR mediante el incremento de la frecuencia. [Rodríguez-Pardo et al. 2006; Rodríguez-Pardo et al. 2004; Rodríguez-Pardo et al. 2005]. La selección de la apropiada configuración del oscilador es otro aspecto muy importante.

En 1980 los trabajos de Konash y Bastiaans [Konash et al. 1980], demostraron que los QCM también podrían ser usados en un medio líquido y que era posible mantener la estabilidad del oscilador cuando el resonador tenía una cara en contacto con el medio líquido, esta investigación abrió el camino para muchas aplicaciones en diferentes campos como la electroquímica y la biología. La explicación física de por qué el resonador puede mantener la oscilación a pesar de las tremendas cargas del contacto con el líquido, se dio más tarde por el conocido trabajo de Kanazawa y Gordon [Kanazawa et al. 1985].

En 1990, el trabajo de Reed et al. [Reed et al. 1990], permitió extender las aplicaciones QCR a medios viscoelásticas. [Davis et al. 1989; Schumacher 1990; Shana et al. 1990]. Durante esos años, el uso de los osciladores era una práctica común y la atención se centraba en explicar algunas inconsistencias en los experimentos; por ejemplo, se obtenían diferentes variaciones de frecuencias para diferentes osciladores bajo las mismas condiciones del cristal [Kurosawa et al. 1990; Schumacher 1990]. Se plantea la necesidad de definir una referencia común de fase de trabajo de los sensores de cuarzo en contacto con un medio líquido. Proponiéndose la fase de 0° para el sensor, bajo condiciones de oscilación [Schumacher 1990]. Se comprobó, entonces que la condición de fase cero, no siempre se cumplía para todas las cargas del resonador [Tiean et al.

1990], y entonces se generalizó el uso del analizador de impedancia como una interfaz adecuada para la caracterización de los sensores piezoeléctricos, con la desventaja de su elevado coste [Johannsmann et al. 1992; NoëL M et al. 1994; Reed et al. 1990; Yang et al. 1993].

A principio de los años 90, Barnes analiza la mayoría de osciladores usados para sensar en entornos líquidos [Barnes 1991]. En este trabajo, se incluye una clara explicación de por qué razón dos osciladores diferentes ofrecen diferentes medidas de frecuencia a las mismas condiciones del sensor.

Se discuten los dos modos de oscilación del cristal: el modo paralelo presenta un rango menos restrictivo de operación que el modo serie y puede ser diseñado para forzar la oscilación bajo condiciones de carga pesadas, por otra parte la condición de fase del sensor es más complicada de controlar.

El trabajo de Barnes presenta los siguientes aspectos importantes, que serían claves en el diseño de osciladores para sensores QCR:

- a. En aplicaciones electroquímicas o biológicas, uno de los electrodos del cristal se debe conectar a tierra, para un mejor control de la capacidad paralela.
- b. La evaluación de la resistencia serie dinámica sería muy útil en algunas aplicaciones.
- c. La implementación de un controlador automático de ganancia, estabilizará la ganancia del bucle, para una operación más estable.
- d. La capacitancia paralela (capacidad estática y capacidad parásita), jugará un papel determinante en la frecuencia de oscilación, especialmente cuando el cristal está configurado en modo paralelo de oscilación [Barnes 1992].

En efecto, la evaluación del amortiguamiento del sensor en un medio líquido juega un papel importante en el trabajo de Martin y Granstaff en 1991 [Martin et al. 1991b]; mostrando que la medida simultánea de la variación de la frecuencia y la resistencia dinámica permite diferenciar entre las contribuciones de la masa y los efectos del líquido en la respuesta del sensor. Por lo tanto, los sistemas de control automático de ganancia, que han sido implementados en los osciladores, no sólo estabiliza la señal, sino que además permiten evaluar las pérdidas del sensor. Por último, la compensación de la capacidad paralela ha sido uno de los aspectos claves tenidos en cuenta, en el desarrollo de las nuevas interfaces que caracterizan la QCM.

A partir de entonces, se han realizado grandes esfuerzos en el diseño de osciladores para aplicaciones en entornos líquidos. Osciladores en modo

paralelo, se hacen operar bajo condiciones de un gran desfase negativo ($\approx -76^\circ$), para forzar la oscilación del cristal bajo condiciones de cargas altas [Hayward 1992; Hayward et al. 1994]. Sin embargo, los esfuerzos más importantes se han realizado en el diseño de osciladores en modo serie, con el resonador trabajando en condición de fase cero y con uno de los electrodos del cristal conectado a tierra, como por ejemplo: Oscilador acoplado por emisor [Borngräber et al. 2002; Eichelbaum et al. 1999; Fruböse et al. 1993; Soares 1993], Oscilador Lever [Wessendorf 1993; Wessendorf 1995], Oscilador tipo puente activo [Wessendorf 1998; Wessendorf 2001] y Oscilador tipo puente equilibrado [Benes et al. 1995; Benes et al. 1999].

Como se ha mencionado, la frecuencia de oscilación depende de la condición de fase del bucle. Por otra parte, la condición de fase del resonador depende de la fase de trabajo del resto de componentes del circuito. Dado que no es posible controlar la frecuencia de oscilación, la otra alternativa es mantener constante la fase de oscilación del cristal para un amplio rango de cargas; por lo menos de esta manera se tendría un punto de referencia en la respuesta del sensor. Para conseguir este objetivo se debe mantener (en la medida de lo posible) constante la fase del resto de componentes del circuito, en un rango de frecuencias tal, que permita un amplio margen de cargas. Por tanto, se debe realizar una buena selección de los componentes y una apropiada configuración [Auge et al. 1994; Wessendorf 1993]. Una vez que este requisito ha sido cubierto, la cuestión es decidir a qué fase debe trabajar el sensor para operar en un modo más ideal.

La razón para desarrollar osciladores en modo serie, que trabajen alrededor de la condición de fase cero, es que se asume que la capacidad paralela tiene un efecto menor sobre la frecuencia de oscilación cercana a la fase cero del sensor. En efecto, la MSRF no depende de la capacidad paralela, y para pequeñas cargas la frecuencia de fase cero está muy cercana a la MSRF. Sin embargo, si se pudiera compensar la capacidad paralela, por ejemplo usando un inductor en paralelo con el resonador, el oscilador podría funcionar a la MSRF. Sin embargo, en principio se desconoce la frecuencia de oscilación y la compensación de la capacidad paralela no es fácil de lograr sin instrumentos adicionales. Por lo tanto, el uso de un inductor para compensar la capacidad paralela, no es habitual.

Para algunos osciladores en modo serie, la condición de fase óptima no es la fase cero, sino otra condición de fase diferente de cero, que le permita oscilar lo más cercano a la MSRF en todo el rango de carga a controlar (rango de carga para valores de resistencia dinámica del cristal de 100 a 700 Ω), generalmente el valor de fase de oscilación para estos casos es de $-38^\circ \pm 3^\circ$ [Eichelbaum et al. 1999; Fruböse et al. 1993; Soares 1993; Soares et al. 1994]. En otros casos, aunque se han diseñado osciladores para que trabajen a la condición de fase cero, la no idealidad de los componentes del circuito hace que éste oscile a una condición de fase cercana a la fase cero ($\approx -6^\circ$ para el oscilador Lever [Wessendorf

1993] y $\approx 3,5$ para el oscilador de puente activo [Wessendorf 1998; Wessendorf 2001]).

El oscilador tipo puente equilibrado, en principio, permite la compensación de la capacidad paralela y entonces la frecuencia de oscilación es teóricamente controlada por la condición de fase cero de la impedancia dinámica [Benés et al. 1995; Benés et al. 1999]. De esta forma, idealmente el circuito oscila a la MSRF.

A continuación se realizará una breve descripción de los osciladores mencionados anteriormente.

3.3.7.1 Oscilador Acoplado por Emisor

Es una de las configuraciones que mejor cumple con los requisitos del resonador QCM en un medio líquido.

El principio de funcionamiento del oscilador acoplado por emisor para condiciones de resonancia en serie puede ser estudiado con ayuda del diagrama mostrado en la Figura 3.12.

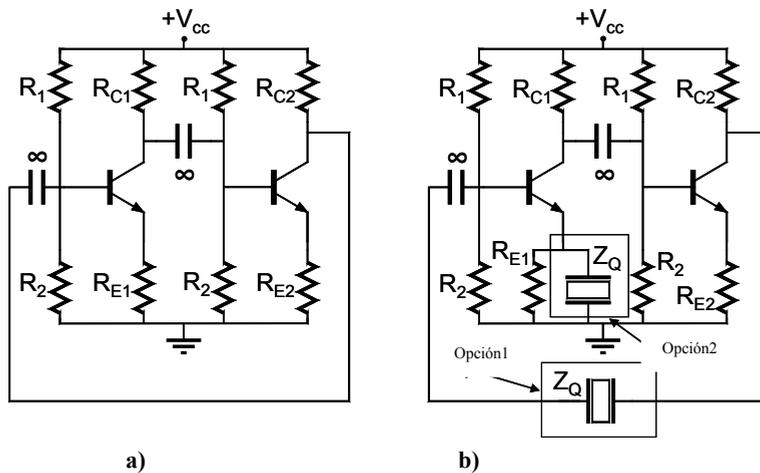


Figura 3.12: Esquema básico de funcionamiento del oscilador acoplado por emisor. a) Esquema básico. b) Con el resonador conectado en modo serie.

Dos etapas de amplificadores inversores en cascada, proporcionan un desfase cero y una ganancia de bucle dada por el producto de las ganancias de los dos inversores:

$$A_{Loop} = A_1 A_2 = \frac{R_{C1}}{R_{E1}} \frac{R_{C2}}{R_{E2}} \quad (1.41)$$

De esta manera, si $A_{LOOP} = I$ con desfase total nulo, el circuito podría en principio oscilar. Sin embargo no hay elementos especiales dentro del circuito de la Figura 3.12a con una respuesta fase-frecuencia lo suficientemente fuerte para determinar la frecuencia a la cual se cumplen las condiciones de ganancia de bucle y de fase para oscilación. Si un resonador de cristal que tiene respuesta fase-frecuencia muy fuerte en torno a la resonancia se incluye estratégicamente dentro del circuito de la Figura 3.12a, el resonador podrá controlar la frecuencia para las condiciones de oscilación.

Para condiciones de resonancia en serie, el resonador podrá ser conectado de dos manera diferentes, como se indica en la Figura 3.12b.

En la opción 1: El sensor está en el bucle de realimentación y controla la frecuencia de oscilación cercana a su frecuencia de fase cero. Algunos osciladores han sido diseñados siguiendo este esquema [Auge et al. 1995; Frerking, M.E.78]. El resonador conectado al circuito de acuerdo a la opción 1 no cumple con uno de los requisitos de una QCM en un medio líquido, especialmente para aplicaciones electroquímicas, puesto que uno de sus contactos no está conectado a masa. La opción 2 presenta un enfoque más atractivo, puesto que cumple con el requisito anterior.

En un oscilador bien diseñado, la ganancia del oscilador debe ser máxima para la frecuencia de operación deseada y debe ser minimizada para otras frecuencias [Mathys 1992]. Para la opción 2, la ganancia del bucle viene dada por la ecuación (1.41):

$$A_{Loop} = A_1 A_2 \approx \frac{R_{C1}}{Z_Q} \frac{R_{C2}}{R_{E2}} \quad (1.42)$$

Suponiendo que a la frecuencia de oscilación $R_{E1} // Z_Q \approx Z_Q$. De lo contrario, se puede incluir un *RF-choke* en serie con R_{E1} , para poder desacoplar R_{E1} a altas frecuencias.

De esta forma, la ganancia es máxima cuando la impedancia del sensor es mínima y cercana a la resonancia.

Asumiendo el comportamiento ideal del circuito, la condición del bucle de fase es controlada en torno a la frecuencia de fase cero de baja impedancia del resonador. Para cargas ligeras y pequeñas capacitancias paralelas la impedancia del cuarzo a la frecuencia de fase cero de baja impedancia se aproxima a la resistencia dinámica (R_m). Con estas condiciones y haciendo $R_{C1}=R_{E2}$ en la ecuación (1.42). El bucle de ganancia para el sistema podría ser:

$$A_{Loop} = A_1 A_2 \approx \frac{R_{C2}}{R_m} \quad (1.43)$$

Por lo tanto, si se cumple la condición de oscilación ($A_{Loop}=1$), entonces $R_{C2}=R_m$ y la medida de R_{C2} cuando el sistema comienza la oscilación nos da el método para evaluar el factor de amortiguamiento del sensor.

Este concepto se ha aplicado con éxito en la caracterización de líquidos y aplicaciones electroquímicas. [Fruböse et al. 1993; Soares 1993; Soares et al. 1994]. Estos autores observaron que la frecuencia de fase cero no es la más cercana a la MSRF: un condensador en paralelo a R_{C1} les permitía controlar las condiciones de la fase en torno a $-38^\circ \pm 3$. Se ha demostrado teóricamente que este valor corresponde a la condición de fase óptima de oscilación [Soares et al. 1994] y confirmado por otros trabajos [Eichelbaum et al. 1999]. Queda claro que el cambio de la frecuencia de oscilación con respecto a la MSRF depende de la capacidad paralela, la carga y el ángulo de fase [Martin et al. 1997]. Por otro lado, es claro que cuando se monitoriza una frecuencia diferente a la MSRF, la frecuencia y los cambios de amortiguamiento obtenidos no son adecuados para ser usados en los modelos de resonadores descritos, tales como el concepto de carga acústica de Kanazawa o los modelos de Martin. Lo que si resulta ser ventajoso es conocer la fase de oscilación del resonador y la medida del amortiguamiento a esta fase, puesto que con estos valores se puede hallar la verdadera MSRF y la resistencia dinámica [Arnau et al. 2002; Borngräber et al. 2002; Wessedorf 1993].

Los componentes más críticos en el Oscilador acoplado por emisor, y en general en cualquier configuración, son los transistores, sus parámetros dependientes de la temperatura, su capacitancia parásita y su característica de amplificación no lineal, son inconvenientes que necesitan ser eliminados. Afortunadamente el uso de las fuentes de corriente controladas por tensión, comúnmente conocidas como Amplificadores de Transconductancia (OTA: Operational Transconductance Amplifier), pueden ser usadas como un transistor más cercano a la idealidad. Un OTA al igual que un transistor tiene tres terminales: una entrada de alta impedancia (B: base), un pin de baja impedancia de entrada/salida (E: Emisor) y un pin de salida de corriente (C: colector). Un voltaje AC centrado en cero, proporciona una corriente de salida bipolar centrada en cero. La transconductancia puede ser ajustada con una resistencia

externa, permitiendo un gran ancho de banda. De otro lado la transconductancia del OTA es constante en un gran rango de corrientes del colector, lo cual permite tener el ancho de banda independiente de la ganancia. El desfase es, en principio, bastante constante sobre un gran rango de frecuencias. Debido a estas excelentes características, la OTA ha recibido el nombre de “El transistor Diamante” (DT: Diamond Transistor) [Henn,Ch. 1995; OPA660 1995].

La configuración como amplificador con terminal E-común, análoga a la configuración de emisor común en los transistores bipolares, se describe en la Figura 3.13a y b. Idealmente el voltaje de la base B es transferido al emisor E, de baja impedancia. La corriente a través del emisor es reflejada al colector C en una proporción fija. La diferencia de funcionamiento en comparación con un transistor bipolar consiste en que un voltaje positivo entre B-E causa una corriente positiva a través del colector C, de esa forma el emisor común basado en OTA's es un no inversor comparado con el emisor común basado en transistores bipolares que si es inversor. Adicionalmente el OTA mantiene la transconductancia constante sobre la temperatura.

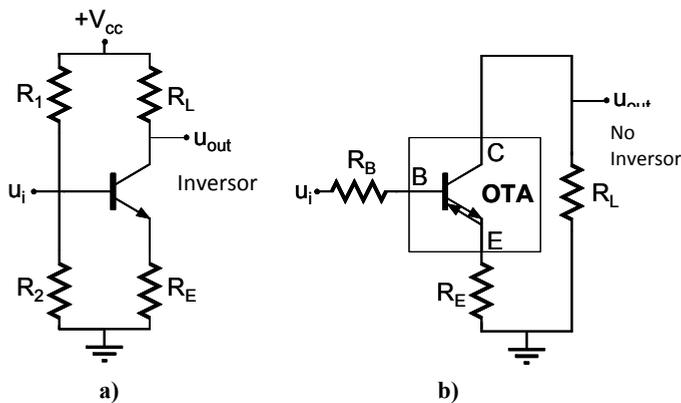


Figura 3.13: Analogía entre: a) Emisor común con BJT b) Emisor común con OTA.

Para el circuito que se muestra en la Figura 3.13b. La transconductancia equivalente del OTA está dada por:

$$g_m' = \frac{1}{r_E + R_E} \quad (1.44)$$

Donde $r_E = 1/g_m$, g_m es la transconductancia del OTA. La ganancia del amplificador en emisor común de la Figura 3.13. Está dado por:

$$\frac{u_0}{u_i} = g_m' R_L = \frac{R_L}{r_E + R_E} \quad (1.45)$$

Con un OTA se puede diseñar un oscilador acoplado por emisor (Emitter Coupled), conectando el cristal de acuerdo a la opción 1, como se mostró en la Figura 3.12b. [Auge et al. 1994; Auge et al. 1995]. La Figura 3.14, muestra el esquema básico de acuerdo a la opción 2 de la Figura 3.12b. [Borngräber et al. 2002; Eichelbaum et al. 1999]. Un diseño compacto se logra usando el circuito integrado OPA660 que incluye un buffer y un OTA [OPA660 1995].

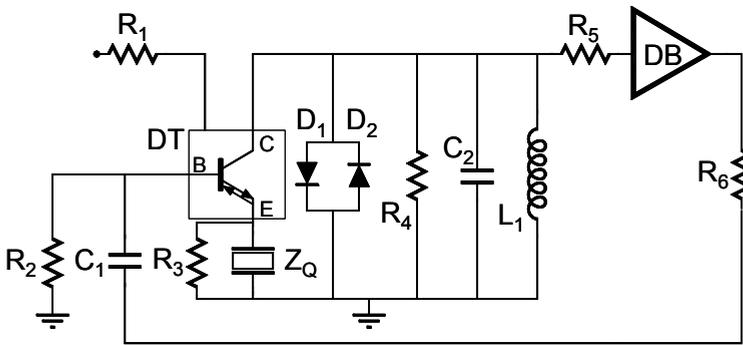


Figura 3.14: Diseño práctico de un Oscilador acoplado por emisor con una OTA adaptado de [Eichelbaum et al. 1999]

El amplificador en emisor común no inversor basado en un OTA y el buffer, proporcionan idealmente un desfase cero y una ganancia de acuerdo a la ecuación (1.45), dado por:

$$\frac{u_0}{u_i} = g_m' R_4 = \frac{R_4}{(Z_Q // R_3) + r_E} \quad (1.46)$$

Con una apropiada selección de R_4 para cubrir un gran rango de cargas dinámicas, la ganancia del bucle es mayor que la unidad y la estabilidad de la amplitud es proporcionada por la conexión anti paralela de los diodos D_1 y D_2 . El filtro paso-alto formado por R_2 - C_1 permite el control total del bucle de fase donde el desfase se ha fijado en -40° de acuerdo a la literatura. [Früböse et al. 1993; Soares et al. 1994]. La ganancia se ha fijado con R_4 y la transconductancia ha sido fijada a través de R_1 . El circuito tanque L_1 - C_2 ha sido diseñado para que su frecuencia de resonancia este cercana a la frecuencia de resonancia del

sensor, de esta manera reduce la ganancia en las frecuencias no deseadas, eliminando así las oscilaciones parásitas.

El circuito estabilizador de amplitud constituido por dos diodos, puede ser remplazado por un control automático de ganancia (AGC) capaz de proporcionar, en principio, una evaluación del factor de amortiguamiento del resonador a la condición de fase de oscilación [Borngräber et al. 2002].

3.3.7.2 Oscilador Lever y Oscilador Tipo Puente Activo

El oscilador Lever [Martin et al. 1997; Wessedorf 1993; Wessedorf 1995] y el Oscilador tipo puente activo [Wessedorf 1998; Wessedorf 2001] son dos enfoques diferentes de una configuración más general llamada Oscilador tipo puente. (Algunas referencias sobre Oscilador tipo puente - *Bridge Oscillator* (BO) pueden ser vistas en [Benjaminson 1984; Benjaminson 1986] y los trabajos de Wessedorf se pueden consultar en [Wessedorf 1998; Wessedorf 2001]).

En la Figura 3.15 se muestra un esquema de un Oscilador tipo puente estándar - *Standard Bridge Oscillator* (SBO), el bucle de ganancia que gobierna la condición de oscilación puede ser representado como:

$$A_{loop} = A_v (\beta_p - \beta_n) \quad (1.47)$$

Donde el lazo de realimentación positivo

$$\beta_p = \frac{R_2}{R_1 + R_2} \quad (1.48)$$

Y el lazo de realimentación negativo

$$\beta_n = \frac{Z_Q}{R_f + Z_Q} \quad (1.49)$$

Para cumplir la condición de oscilación se necesita que $A=1$ y $\beta_p > \beta_n$.

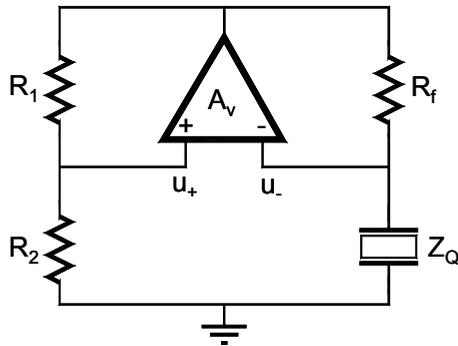


Figura 3.15: Configuración de un oscilador tipo puente estándar (SBO).

Las condiciones del bucle de fase son determinadas por la diferencia $\beta_v - \beta_n$, asumiendo que el amplificador no introduce ningún desfase. El amplificador debe suministrar suficiente ganancia para mantener la oscilación. El exceso de ganancia del bucle es limitado por las características no lineales de los componentes activos.

Para la condición de oscilación de fase cero del resonador, la realimentación positiva está diseñada para tener un desfase igual a cero. En esas condiciones la impedancia del resonador Z_Q tendrá que ser real y por tanto, la frecuencia de fase cero de baja impedancia será excitada por el circuito. Hay que hacer notar que a una frecuencia de fase cero de alta impedancia del cristal, la ganancia del lazo de realimentación negativo se podría incrementar hasta $\beta_n \approx 1$, haciendo improbable la oscilación a esta frecuencia.

Para pequeñas cargas, la fase del resonador es cero y Z_Q puede ser aproximadamente la resistencia dinámica R_m , pero para cargas pesadas los efectos de la capacitancia paralela tienen una importante contribución en la relación fase-frecuencia. Esta influencia negativa, debe ser evitada con una apropiada compensación de la capacidad paralela, por ejemplo usando un inductor en paralelo. Al compensar la capacidad paralela, se aumenta drásticamente el rango de cargas en las que puede operar el oscilador. De esta manera, a partir de ahora la impedancia del sensor será remplazada por la resistencia dinámica en las ecuaciones.

Es importante conocer la forma en que la respuesta fase-frecuencia del resonador afecta al oscilador. A una respuesta fase-frecuencia abrupta el factor de calidad Q es alto, y las pequeñas variaciones de las condiciones de trabajo

afectarán muy poco la estabilidad de la frecuencia de oscilación. La pendiente de la respuesta fase-frecuencia, evaluada a la frecuencia de resonancia serie dinámica ω_s , es proporcional al factor Q del resonador. Entonces, el cociente entre la respuesta fase-frecuencia del bucle de ganancia y el resonador a la MSRF, proporciona el parámetro característico M_Q [Wessedorf 1998],

$$M_Q = \frac{d\theta_{Loop}/d\omega}{d\theta_{res}/d\omega} = \frac{(\beta_n - 1)\beta_n}{(\beta_p - \beta_n)} \quad (1.50)$$

que da información acerca de la mejora o el empeoramiento de la respuesta fase-frecuencia del oscilador con respecto a la del resonador.

La expresión dada para M_Q indica que una apropiada selección de los parámetros β_v en relación a β_n proporciona una magnitud M_Q superior a 1 siempre y cuando $\beta_v - \beta_n$ sea lo suficientemente pequeña. Sin embargo, mientras mayor sea la magnitud M_Q mayor debe ser la ganancia A_v para mantener la condición de oscilación $A_v = 1/(\beta_v - \beta_n)$. Para un valor fijo de β_v , M_Q incrementa con β_n ; de esta forma, el factor Q del oscilador es mayor con relación al factor Q del resonador para incrementos de R_m , lo cual es recomendable para cargas pesadas.

Para un valor fijo de $\beta_v=1$, el factor de calidad Q del oscilador está limitado por el Q del resonador.

Un aplicación práctica de un Standard Bridge Oscillator se presenta en la Figura 3.16, donde el circuito esquemático es presentado en la Figura 3.16a y el circuito equivalente en la Figura 3.16b.

Para el circuito equivalente de pequeña señal, se tienen en cuenta las siguientes consideraciones: el colector común formado por el transistor Q_3 funciona como un seguidor ideal; el circuito paralelo $C_C - L_C$ resuena a la frecuencia de oscilación y drásticamente reduce la ganancia a las frecuencias no deseadas; L_1 es un *RF-choke* que provee igualdad para los transistores Q_1 y Q_2 ; el inductor L_0 se ajusta para compensar la capacitancia paralela y de esta manera hacer que la impedancia del sensor a la frecuencia de fase cero sea R_m ; y los transistores son considerados con idénticas características y alta β , entonces la corriente a través de las bases puede ser poco significativa en relación a la corriente de colector o emisor.

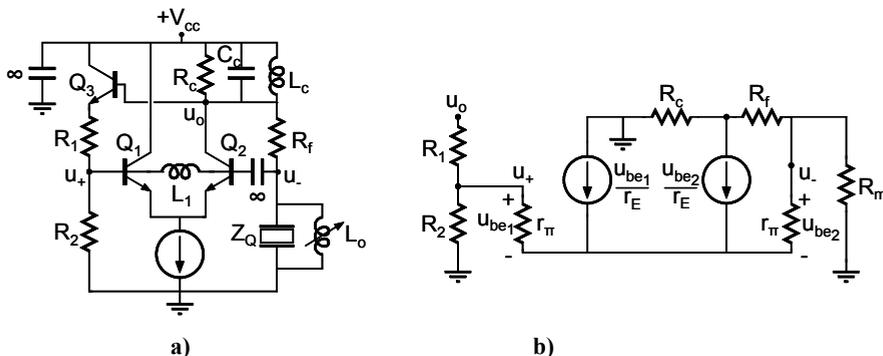


Figura 3.16: Esquema de una realización práctica de un SBO. a) Esquema real. b) Circuito equivalente.

Las siguientes ecuaciones gobiernan las señales del circuito equivalente de la Figura 3.16b.

$$\frac{u_{be1}}{r_E} + \frac{u_{be2}}{r_E} \approx 0 \tag{1.51}$$

$$u_+ - u_- = u_{be1} - u_{be2} \tag{1.52}$$

$$u_0 \approx - \left(\frac{u_{be2}}{r_E} + \frac{u_0}{R_f + R_m} \right) R_c \tag{1.53}$$

$$u_+ \approx \frac{R_2}{R_1 + R_2} u_0 \tag{1.54}$$

$$u_- \approx \frac{R_m}{R_f + R_m} u_0 \tag{1.55}$$

La combinación de las ecuaciones anteriores permite obtener la ganancia A_v :

$$A_v = \frac{u_0}{u_+ - u_-} = \frac{R_c}{2r_E} \frac{R_f + R_m}{R_f + R_m + R_c} \tag{1.56}$$

Substituyendo u_+ y u_- de las ecuaciones (1.54) y (1.55) en la ecuación (1.56), se obtiene la siguiente ecuación para la ganancia de lazo:

$$A = \frac{R_c}{2r_E} \frac{1}{1 + \frac{R_c}{R_f + R_m}} \left(\frac{R_2}{R_1 + R_2} - \frac{R_m}{R_f + R_m} \right) = 1 \angle 0^\circ \tag{1.57}$$

De la ecuación (1.57) se pueden hacer las siguientes consideraciones para un SBO en contacto con un líquido:

- a. R_f tendrá que ser seleccionada de tal manera que cubra apropiadamente el rango de cargas esperado durante el experimento. De acuerdo al valor máximo de β_n , la magnitud de β_v debe ser seleccionada, teniendo en cuenta que una baja magnitud de M_Q podrá requerir un alto valor de A_v , cuyo valor está limitado por $R_c/2r_E$.
- b. Para cargas muy amortiguantes, se debe escoger la máxima ganancia $A_v=R_c/2r_E$ de tal manera que se cumpla la condición de arranque de la oscilación desde el estado inicial.
- c. El exceso de ganancia podrá ser limitado por la no linealidad de los amplificadores. En este caso la resistencia intrínseca del emisor r_E depende de la amplitud de la señal y del punto de trabajo. Para un SBO el punto de trabajo de los dispositivos activos es similar a las amplitudes de las señales en las bases, que son condicionadas externamente por la realimentación β_v y β_n , que son similares para valores altos de M_Q . De esta forma, cambios en los valores de r_E solo pueden ocurrir por cambios drásticos en la amplitud de oscilación o por cambios en los puntos de trabajo de los dispositivos activos, que operan bajo condiciones controladas por ejemplo por un sistema de control automático de ganancia (AGC). Debido a fuertes cambios en la amplitud de oscilación, inducidos por la pobre estabilidad de la frecuencia y el ruido, es más adecuado la implementación de un sistema AGC para mantener al mínimo el exceso de ganancia y para permitir la oscilación en el instante inicial; esto mejora la linealidad, la amplitud y la estabilidad de la frecuencia. Adicionalmente los AGC permiten monitorizar las pérdidas del resonador, a pesar de aumentar la complejidad del sistema.

3.3.7.3 Oscilador Lever (palanca)

La realización práctica se muestra en la Figura 3.17. El bucle de ganancia está regido por la ecuación (1.57).

$$\frac{R_c}{2r_E} \frac{1}{1 + \frac{R_c}{R_f + R_m}} \left(1 - \frac{R_m}{R_f + R_m} \right) = 1 \angle 0^\circ \quad (1.58)$$

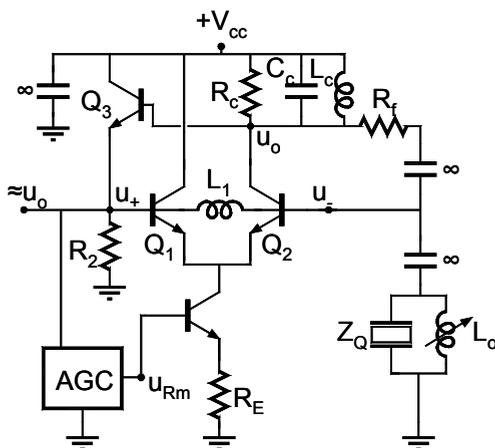


Figura 3.17: Realización práctica de un oscilador tipo palanca.

Como se mencionó anteriormente, $\beta_p=1$ y la condición de fase de oscilación es controlada por la realimentación negativa β_n que aumenta con R_m , que también aumenta M_Q , limitándose en este caso a 1. De esta manera, en esta configuración el factor Q del oscilador nunca mejorará el factor Q del resonador.

La ganancia A_v está ligada al valor de R_m . De modo que A_v incrementa cuando R_m incrementa. Sin embargo, este incremento es únicamente significativo para valores de R_f y R_C similares a la magnitud de R_m . Incluso con este aumento de la magnitud de A_v , se necesitan además fuertes cambios de r_E cuando varían las pérdidas del resonador a lo largo de un relativo amplio rango de cargas. Como mencionamos, si un circuito AGC no es utilizado para controlar la amplitud de oscilación, el oscilador puede sufrir de problemas de estabilidad, sobre todo a altas frecuencias de oscilación. [Auge et al. 2003].

Por otro lado, idealmente, el oscilador trabaja a la condición de fase cero, de esta manera cuando los efectos de las capacidades parásitas son tenidos en cuenta, la condición de fase del resonador en el caso de los líquidos frecuentemente usados ($R_m > 200$), se desvía a $\approx -6^\circ$ [Wessendorf 1993]. Por otro lado, para bajas cargas, la ganancia está controlada por el resonador y la condición de fase está determinada por los efectos parásitos.

El circuito ha sido probado con éxito para líquidos y se observa que es necesario compensar la capacitancia paralela para una correcta operación en todo el rango de cargas [Martin et al. 1997].

También se demostró que cuando no se logra una compensación perfecta de la capacitancia paralela, la fase de oscilación del cristal es negativa, coincidiendo con otros trabajos [Eichelbaum et al. 1999; Fruböse et al. 1993; Soares 1993; Soares et al. 1994].

3.3.7.4 Oscilador en Puente Activo (ABO) [Wessendorf 1998; Wessendorf 2001; Wessendorf 2001].

El esquema simple de una realización práctica es descrito en la Figura 3.18. La fuente de corriente ha sido sustituida por una baja impedancia de emisor R_E , con $\beta_p < 1$ y una alta dependencia de la resistencia intrínseca del emisor r_E . El análisis en pequeña señal del circuito equivalente de la Figura 3.18b proporciona las siguientes ecuaciones que gobiernan la operación del sistema:

$$\frac{u_{be1}}{r_E} + \frac{u_{be2}}{r_E} \approx \frac{u_E}{R_E} \quad (1.59)$$

$$u_+ - u_- = u_{be1} - u_{be2} \quad (1.60)$$

$$u_0 \approx -\frac{R_c}{r_E} u_{be2} \quad (1.61)$$

$$u_- \approx \frac{R_m}{R_m + R_f} u_+ \quad (1.62)$$

$$u_E = u_- - u_{be2} \quad (1.63)$$

donde $R_c = R_2 // R_3$.

Combinando las ecuaciones anteriores se obtiene una nueva ecuación que describe la ganancia de lazo:

$$A_{loop} = A_v (\beta_p - \beta_n) = 1 \angle 0^\circ \quad (1.64)$$

donde:

$$A_v = \frac{R_c}{r_E (1 + \beta_p)}; \beta_p = \frac{R_E}{R_E + r_E}; \beta_n = \frac{R_m}{R_f + R_m} \quad (1.65)$$

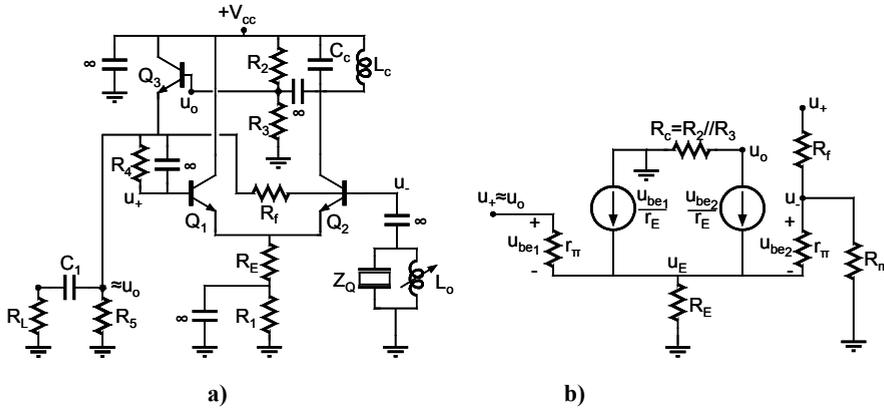


Figura 3.18: Esquema de un oscilador en puente activo. a) Realización práctica. b) Circuito equivalente.

En el ABO los puntos de trabajo de los transistores Q_1 y Q_2 son similares como en el caso del SBO ($R_f \approx R_f$) en la Figura 3.18a; sin embargo bajo condiciones de oscilación, la amplitud de la señal en las bases son completamente diferentes: la base de Q_1 tiene una amplitud de oscilación similar a u_0 mientras que la base de Q_2 opera a una fracción de amplitud de la señal de salida u_0 . Esto hace que la magnitud de A_v y β_p estén en función de r_E .

Para cargas altas, el valor de R_m es alto y R_f tendrá que ser seleccionada apropiadamente para cubrir un amplio rango de cargas, por ejemplo $R_f = 2500\Omega$; β_p debe ser elegida inferior a 1 con R_E de un adecuado bajo valor que permita aprovechar la ventaja de tener $M_Q > 1$ para altos valores de R_m . Una vez que R_f , R_E y el valor representativo de R_m han sido bien determinados, el valor de r_E para $A=1$ es calculado y se obtiene el correspondiente punto de trabajo. Bajo esas condiciones, un incremento de R_m produce un aumento de u y reduce la amplitud de oscilación mientras incrementa β_n ; por otra parte, la nueva condición de oscilación requiere un pequeño valor de r_E para mantener la ganancia de lazo $A=1$, que, a su vez, aumenta β_p permitiendo un cierto grado de adaptación a una gama más amplia de cargas. El incremento relativo de β_n y β_p también incrementa M_Q permitiendo una mayor estabilidad de frecuencia. La estabilidad en la amplitud es mejorada en comparación con un SBO; cambios relativamente pequeños en la amplitud de la señal de oscilación son suficientes para alcanzar un nuevo valor de r_E que mantenga la oscilación (condición de ganancia de lazo). De esta forma, conforme R_m aumenta, la amplitud de oscilación disminuye, en una proporción casi lineal con el incremento de las pérdidas del resonador [Wessedorf 2001].

Este enfoque ha sido probado para cargas altas (R_m en el orden de 3500Ω para un cristal de 5MHz en corte AT). La fase de oscilación en un experimento real está alrededor de -10° en el rango mencionado de carga ($200 < R_m < 3500$). Esta desviación es debido a las capacitancias parásitas de los dispositivos activos, principalmente a la capacitancia base-colector de Q_2 que crea un efecto Miller que influye fuertemente en la respuesta de fase del sistema. Mediante la sustitución de Q_2 por un amplificador cascode, el rendimiento mejora reduciendo el desfase a -3.5° [Wessedorf 2001]. Esta fase de oscilación es buena si se compensa la capacitancia paralela.

La ventaja de esta configuración es que la amplitud de oscilación decrece en relación relativamente lineal conforme R_m aumenta, lo que evita la necesidad de usar un sistema AGC para obtener la información de las pérdidas del resonador, que pueden ser directamente obtenidas, al medir la amplitud de la señal de oscilación. Como en el caso del oscilador tipo palanca, para impedancias por debajo de 300Ω la ganancia de lazo está mal controlada por el resonador, a menos que la resistencia R_f sea cambiada por una resistencia apropiada de menor valor; el valor de M_Q es bajo, los dispositivos activos operan en un modo no lineal y de esta forma la condición de fase es determinada por los efectos parásitos. Por lo tanto, se debe buscar un punto de compromiso entre la fase y un amplio rango de carga.

Como se puede notar hasta el momento, para que el oscilador funcione a una condición de oscilación razonablemente cerca a la fase cero, se debe realizar un diseño apropiado y una buena selección de los componentes. La conveniencia de estos criterios de oscilación reside, básicamente, en la precisión con la que la capacitancia paralela es compensada. Para cargas altas la contribución de la capacitancia paralela en la relación fase-frecuencia no se puede despreciar, incluso para pequeñas capacitancias alrededor de 1-3pF [Martin et al. 1997; Wessedorf 1993]. Con una compensación ideal de la capacidad paralela, la frecuencia de oscilación a fase cero, podrá ser exactamente la MSRF. La necesidad de compensar la capacidad paralela se hace más evidente cuando existe una cierta distancia entre el sensor y el circuito oscilador, y la capacitancia paralela es altamente incrementada por la capacidad del cable de conexión.

3.3.7.5 Oscilador Diferencial Equilibrado [Benes et al. 1995; Benes et al. 1999]

Un concepto diferente de oscilador permite, como mínimo de manera teórica, una perfecta compensación de la capacitancia paralela a diferentes frecuencias.

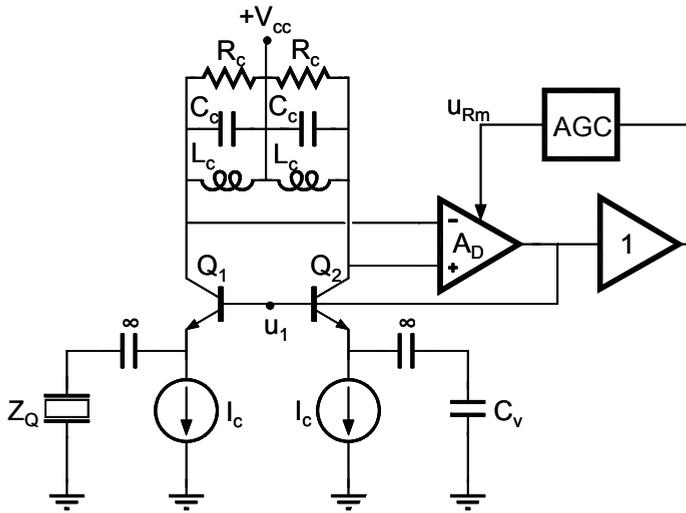


Figura 3.19: Diagrama esquemático del principio de funcionamiento de un oscilador diferencial equilibrado.

El principio del oscilador diferencial equilibrado se presenta en la Figura 3.19. Dos ramas idealmente iguales forman una configuración diferencial; la señal de entrada u_i es transferida al emisor de Q_1 y Q_2 y la corriente que circula por los emisores es transformada en tensión en los colectores y realimentada a la entrada después de una amplificación diferencial. Para una perfecta compensación ($C_v=C^*_0$), la ganancia ideal del circuito estaría definido como:

$$A = \frac{R_c}{Z_m} A_D = 1 \angle 0^\circ \tag{1.66}$$

Asumiendo que no existe un desfase en el amplificador diferencial, la fase-cero del la rama dinámica del resonador gobierna la condición de fase de oscilación del circuito. La mínima ganancia A_D para la oscilación podría ser $A_D=R_m/R_c$; de esta forma, una apropiada selección de R_c permitiría controlar un amplio rango de cargas. Para un mejor funcionamiento se puede implementar un AGC que, a su vez, proporcionaría la información de las pérdidas del resonador.

El oscilador diferencial equilibrado usa un condensador para compensar la capacitancia paralela; este tipo de compensación capacitiva puede ser extendido a otro tipo de osciladores, usando el circuito que se muestra en la Figura 3.20 [Behrends et al. 2001; Geelhood,S..et.al.01]. El mayor problema de esta técnica

es la falta de idealidad de los transformadores, la selección del condensador C_V y la calibración de la compensación capacitiva.

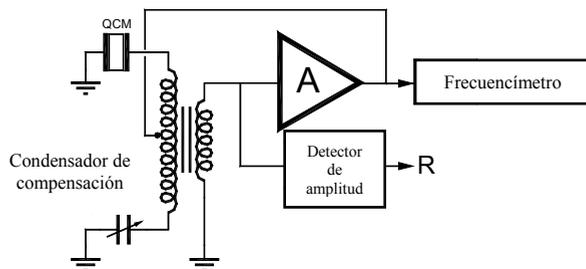


Figura 3.20: Diagrama esquemático de un circuito para la compensación de la capacidad paralela basada en un transformador.

Se ha presentado una revisión de los diferentes osciladores propuestos como interfaz para QCM en medios líquidos. Como se puede observar el oscilador acoplado por emisor, diseñado inicialmente para que oscilara a la fase cero, ha sido finalmente ajustado para que oscile a una fase cercana a -40° . Si se conoce el valor de la fase de oscilación, se puede calcular la resistencia dinámica y la MSRF real, siempre y cuando, previamente se haya caracterizado el cristal sin carga y se haya calibrado el circuito oscilador [Borngräber et al. 2002]; pero para esto se necesita un analizador de impedancias, lo cual es una desventaja.

Los osciladores tipo puente y puente activo son simples y pueden ser usados como interfaz para caracterizar un amplio rango de cargas, pero la precisión en la medida de la frecuencia y de las pérdidas, depende de la idealidad de los componente y más aún, depende de la precisión con la que se compensa la capacidad paralela por medio del inductor en paralelo, que no es fácil y además esta compensación es válida únicamente para ciertas frecuencias.

Aparentemente, el oscilador diferencial equilibrado es una excelente alternativa y con un apropiado diseño es posible compensar la capacidad paralela en un amplio margen de frecuencias y entonces la MSRF y las pérdidas del resonador (R_m), se podrán medir con mayor precisión.

En aplicaciones electroquímicas y de biosensores, donde las pérdidas del resonador y la capacidad paralela se mantiene aparentemente constante durante todo el experimento, la variación de la frecuencia, que es el parámetro de interés, es prácticamente independiente de la fase de oscilación y entonces, los osciladores representan una buena opción de caracterización frente a otras técnicas; destacándose por la relativa sencillez y reducido tamaño del circuito. Si

se realiza un buen control de las variables ambientales, se puede reducir el ruido y aumentar la estabilidad del sistema oscilador.

3.4 Sistema de Interfaz para Sensores QCM Basados en Técnicas de Enganche.

Estas técnicas apuntan a la simplicidad de los osciladores, mientras disminuyen sus limitaciones. A partir del análisis previo que se ha realizado a los osciladores, se puede afirmar que las limitaciones de estos sistemas se deben a que los osciladores dependen de unas condiciones de lazo en las que el sensor forma parte; entonces, la fase de oscilación del resonador será aquella necesaria para compensar los desfases del resto de componentes del bucle. Toda no idealidad de la respuesta fase-frecuencia del circuito externo al resonador, debido a los dispositivos activos, es transferida al sensor, que cambia la fase y la frecuencia con el fin de cumplir con la condición de oscilación. Se ha demostrado que con una buena selección de los componentes y una condición de fase cero del circuito externo al sensor en virtud de la compensación de la capacidad paralela, se pueden obtener buenos resultados. Entonces, el problema de la dependencia de la no idealidad de los componentes activos puede ser solucionado si el cristal es pasivamente interrogado por un oscilador externo a una frecuencia cercana a la MSRF. Existen dos técnicas propuestas:

- a. Oscilador enganchado a la frecuencia de fase cero del resonador, con compensación de la capacitancia paralela.
- b. Oscilador enganchado a la frecuencia de máxima conductancia del sensor.

A continuación se estudiarán algunos circuitos que incorporan estas técnicas:

3.4.1 Técnicas de PLL con Compensación de la Capacidad Paralela.

En esta técnica la frecuencia de un oscilador controlado por tensión (VCO), externo, es mantenida constante cuando se alcanza la frecuencia de fase cero de la rama dinámica del sensor. Para cumplir con este objetivo, esta técnica debe estar acompañada simultáneamente de la compensación de la capacitancia paralela, la cual es controlada por un sencillo proceso de calibración. En la Figura 3.21 se muestra un circuito que implementa la técnica de PLL con una compensación de la capacidad paralela. [Arnau et al. 2002].

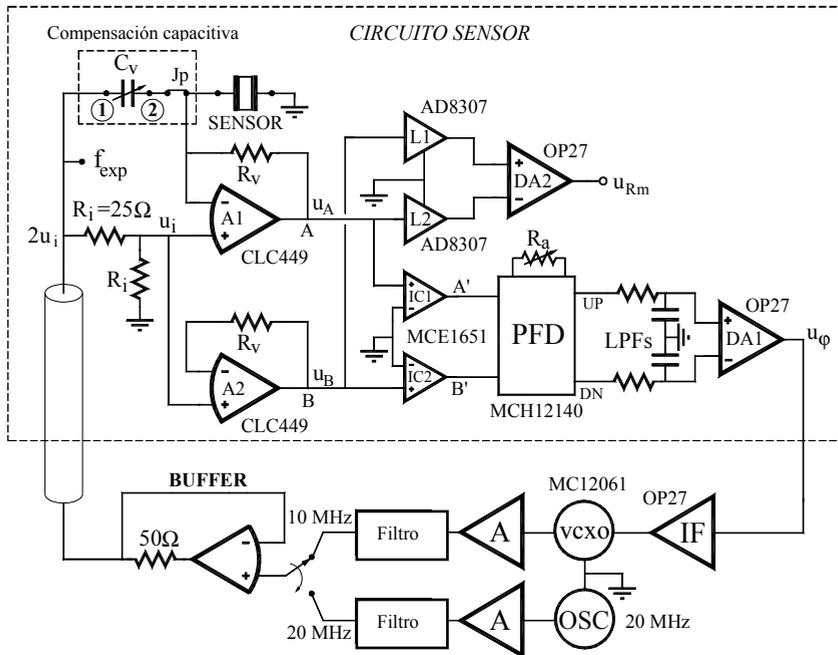


Figura 3.21: Circuito para la compensación de la capacitancia paralela, basada en técnicas de PLL.

Algunos trabajos previos y similares al circuito mostrado en la Figura 3.21, no tienen una de las caras del resonador conectada a masa e involucran procedimientos de calibración más complejos para asegurar que existe una perfecta compensación de la capacidad paralela y que el sistema está enganchado a la MSRF [Arnau et al. 2000b; Ferrari et al. 2000; Ferrari et al. 2001]. Por el contrario, el circuito mostrado en la Figura 3.21, permite ser calibrado fácil y eficazmente sin la necesidad elementos nuevos y costosos. Cuando el sensor y el sistema de compensación capacitiva se eliminan (ver Figura 3.21), el circuito se convierte en dos ramas idealmente iguales formando un sistema diferencial. Un simple procedimiento de calibración que consiste en la aplicación de una señal de prueba a la entrada, lo cual se puede hacer abriendo la salida del integrador y conectando la entrada de control del VCO a tierra. El sistema se calibra cuando un nivel de voltaje dc se mantiene constante a la salida del integrador (idealmente por una voltaje cero a la entrada del integrador), debido a que el detector fase/frecuencia (PFD) provee un voltaje igual a cero a la salida ($u_{\phi}=0$), cuando las fases de las señales de entrada son iguales. Esto asegura que las fases de las señales en los puntos A y B son iguales.

Después de que el bucle de frecuencia ha sido bien calibrado, se incorporan al circuito el sensor y el sistema de compensación capacitiva y se le aplica a la entrada una señal con una frecuencia apropiada, a la cual se anula el comportamiento dinámico del sensor, permitiendo así medir la capacitancia paralela. Se puede aplicar a la entrada, por ejemplo una señal de baja frecuencia lejos de la frecuencia de resonancia o incluso un armónico paralelo de la frecuencia de resonancia fundamental, en este caso se aplican 20MHz (El doble de la frecuencia de resonancia del cristal). En este caso, un voltaje dc se mantendrá estable a la salida del integrador cuando la capacitancia paralela sea exactamente compensada por el condensador variable. Si la capacidad paralela no cambia durante el experimento, el sistema deberá enganchar a la frecuencia MSRF cuando se conecte el VCXO a 10MHz.

En el circuito mostrado en la Figura 3.21, A1 y A2 deben ser dos amplificadores operacionales con un buen ancho de banda. Además se recomienda que sean amplificadores realimentados por corriente para una mejor respuesta fase-frecuencia a diferentes ganancias. IC1 e IC2 son dos comparadores usados para aumentar la pendiente de la señal de entrada al PFD mejorando la detección de la fase. DA1 e IF controlan el VCO. L1 y L2 son dos amplificadores logarítmicos que permiten con el DA2 evaluar las pérdidas R_m del resonador sin la necesidad de usar un AGC para mantener constante la señal de entrada $2u_i$.

Una versión mejorada del sistema anteriormente descrito se muestra en la Figura 3.22 [Arnau et al. 2007].

El objetivo de este sistema es llevar a cabo una compensación continua de la capacidad paralela, permitiendo monitorizar un parámetro adicional, importante en algunas aplicaciones. El concepto del diseño fue presentado en otros trabajos previos [Ferrari et al. 2006; Ferrari et al. 2003], es decir, el sensor es excitado con dos frecuencias y asumiendo el comportamiento lineal del resonador, se compensa la capacitancia paralela C_o^* de manera automática al mismo tiempo en que el sistema se engancha a la MSRF del sensor. El nuevo diseño sigue el concepto descrito anteriormente. En el presente diseño, se usan dos PLL uno para el seguimiento de la frecuencia de oscilación y otro para la compensación de la capacitancia paralela. El PLL encargado del seguimiento de la MSRF del sensor está basado en un detector fase-frecuencia (PFD) en lugar de un multiplicador, como en el caso de la referencia [Ferrari et al. 2006] y [Ferrari et al. 2003]. En esta configuración el amplificador no inversor encargado de controlar el sensor tiene, idealmente, la misma respuesta a diferentes frecuencias dentro de un ancho de banda de operación lineal, ya que solo una resistencia R_v es incluida en la realimentación a diferencia de [Ferrari et al. 2006; Ferrari et al. 2003], donde, una resistencia en paralelo con un condensador se usan para obtener un desfase de 90° en la señal de alta frecuencia, pues es necesario para

que el multiplicador funcione como un detector de fase. (Ver Fig. 3 en [Ferrari et al. 2003]). Por lo tanto, la calibración del PLL en el nuevo diseño se realiza de una manera más fácil y exacta siguiendo el procedimiento explicado anteriormente [Arнау et al. 2002]. La compensación de la capacitancia paralela del circuito mostrado en la Figura 3.22 se realiza de la misma manera que en el circuito de la Figura 3.21, basado en la detección de la fase, pero a una frecuencia cuatro veces mayor que la fundamental..

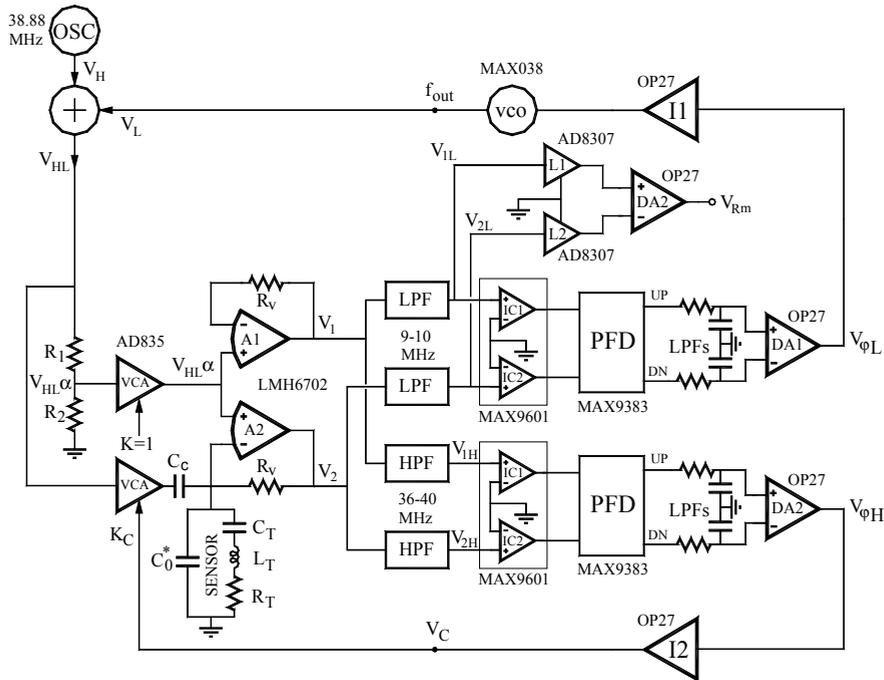


Figura 3.22: Esquema práctico de un sistema de interfaz electrónica para QCM basado en un PLL que permite la compensación automática de la capacidad paralela.

Las magnitudes que gobiernan el funcionamiento del sistema son:

- El cambio de fase entre las señales V_1 y V_2 .
- Las dos frecuencias f_H y f_L .

Las frecuencias f_H corresponden en este caso a una señal de frecuencia fija igual a cuatro veces la frecuencia de resonancia fundamental del sensor y f_L es la señal que hace el barrido en frecuencia, al rededor de la frecuencia de resonancia

serie del sensor. El cambio de fase de las frecuencias bajas f_L controla el PLL encargado del seguimiento de la frecuencia; mientras, el cambio de fase de la frecuencia alta f_H controla el PLL encargado de la compensación de la capacitancia paralela.

Por lo tanto, la ecuación que controla el sistema es la siguiente:

$$\begin{aligned}
 V_{2HL} &= (1 + R_v Y_T + j\omega R_v (C_0^* - C_c)) V_{1HL} \\
 V_{1HL} &= V_{HL} \alpha; \\
 C_c &= \left[\frac{K_c}{\alpha - 1} \right]; \\
 \alpha &= \frac{R_1}{R_1 + R_2} \\
 Y_T &= \frac{1}{\left[j\omega L_T + R_T + \frac{1}{j\omega C_T} \right]}
 \end{aligned} \tag{1.67}$$

El subíndice *HL* en las ecuaciones previas, significa que el voltaje de la señal corresponde a la suma de dos señales sinusoidales: V_H con una frecuencia f_H fija generada por el oscilador auxiliar cuya frecuencia es cuatro veces la frecuencia de resonancia fundamental del sensor, y V_L con frecuencia f_L generada por el VCO alrededor de la frecuencia de resonancia serie del sensor.

A la frecuencia auxiliar f_H , donde únicamente importa el comportamiento capacitivo del sensor, la ecuación (1.67) queda reducida a:

$$V_{2H} = (1 + j\omega R_v (C_0^* - C_c)) V_{1H} \tag{1.68}$$

Y el desfase entre las señales V_{1H} y V_{2H} está dado por:

$$\Phi(V_{2H}, V_{1H}) = \arctan(2\pi f_H R_v C_r) \tag{1.69}$$

Donde:

$C_r = (C_0 - C_c)$ y es la capacitancia residual no compensada.

Como se puede notar, cuando $C_r = 0$, el desfase es cero y el amplificador diferencial DA2 tiene una salida de cero voltios que hace que el integrador I2 mantenga un voltaje de constante a la salida. Esta es la única condición de estabilidad para que el bucle se mantenga fuera de saturación. En el caso en que

$C_r \neq 0$, el amplificador DA2 proporciona una señal a su salida, que es integrada por I2 hasta que se alcance una nueva condición de estabilidad $C_r = 0$. La señal V_C del integrador I_2 puede ser usada para monitorizar los cambios en la capacidad paralela del sensor y para hacer un seguimiento continuo de su magnitud.

La sensibilidad de la compensación capacitiva está limitada por la sensibilidad del detector de fase. Asumiendo una sensibilidad del detector de fase de 0.1° para la frecuencia f_H alrededor de 40 MHz y $R_v = 237\Omega$, la capacitancia residual no compensada obtenida resolviendo C_r de la ecuación (1.69) es cercana a 30fF.

A la frecuencia f_L , asumiendo que la capacitancia paralela ha sido bien compensada ($C_r = 0$), la ecuación (1.67) se reduce a:

$$V_{2L} = (1 + R_v G_T + j R_v B_T) V_{1L} \quad (1.70)$$

Donde:

$$G_T = \frac{R_T}{(R_T^2 + X_T^2)}$$

$$B = -\frac{X_T}{(R_T^2 + X_T^2)}$$

$$X_T = \omega L_T - \frac{1}{\omega C_T}$$

Como se puede notar en la ecuación (1.70), las señales V_{1L} y V_{2L} podrán estar en fase cuando X_T se anule y esto solo sucede a la frecuencia de resonancia, $f_s = (2\pi L_T C_T)^{-1/2}$. A esta frecuencia, el amplificador diferencial DA1 tiene un voltaje igual a cero a la salida, que hace que el integrador I1 mantenga una señal de dc estable a la salida. Esta es la única condición de estabilidad, para que el bucle se mantenga fuera de saturación. Si la frecuencia de resonancia serie cambia, se producirá un desfase entre las señales y el amplificador DA1 dará una señal diferente de cero a la salida, que será integrado por I1 hasta alcanzar de nuevo la condición de estabilidad, permitiendo enganchar la frecuencia a la nueva frecuencia f_s . Se puede notar que el voltaje a la entrada del VCO puede ser usado como una medida directa del cambio de la frecuencia de resonancia, siempre y cuando la gama de frecuencias del VCO sea estrecha, lo suficiente para tener una buena sensibilidad frecuencia/voltaje. Un ancho de banda estrecho del VCO puede reducir el rango dinámico del PLL, sin embargo, esto se puede evitar con el sistema descrito en [Torres et al. 2006].

De acuerdo a lo anterior y reduciendo la ecuación (1.70), se obtiene:

$$V_{2L} = \left[1 + \frac{R_v}{R_T} \right] V_{1L} \quad (1.71)$$

Midiendo los niveles de las tensiones V_{2L} y V_{1L} se puede obtener la resistencia R_T .

En el circuito en la Figura 3.22, el VCA conectado a la salida del divisor resistivo formado por R_1 y R_2 es únicamente incluido por simetría.

Un concepto diferente de compensación capacitiva es usado a bajas frecuencias muy por debajo de la frecuencia de resonancia, por ejemplo 50KHz, [Ferrari et al. 2006; Ferrari et al. 2003]. Donde la compensación paralela detecta un voltaje nulo en lugar de una condición de fase; el esquema es descrito en la Figura 3.23, donde la componente de baja frecuencia V_L está ahora encargada de la compensación de la capacitancia paralela.

La señal diferencial $V_{2L}-V_{1L}$ dada por la ecuación (1.72), está desfasada 90° y aplicada a una de las entradas del multiplicador. La señal V_{1L} esta aplicada a la otra entrada; de esta forma, el multiplicador podrá proporcionar un voltaje cero al integrador únicamente cuando $C_r=0$, normalmente cuando la señal $V_{2L}-V_{1L}$ se hace nula.

$$V_{2L} - V_{1L} = j\omega R_v (C_0^* - C_c) V_{1L} \quad (1.72)$$

Aplicando el mismo concepto de excitar el sensor a diferentes frecuencias, diferentes armónicos pueden ser monitorizados al mismo tiempo. Recientemente un diseño simple ha sido introducido [Ferrari et al. 2007] (ver Figura 3.24).

El esquema descrito en la Figura 3.24 utiliza un detector de fase basado en multiplicadores, al igual que en las referencias [Ferrari et al. 2006; Ferrari et al. 2003] y también incluye una compensación de capacitancia paralela, aunque no automática, por simplicidad.

El concepto clave de las técnicas PLL es la de la compensación exacta de la capacitancia paralela. Otra técnica alternativa es enganchar a la frecuencia de máxima conductancia que coincide con la MSRF en muchos casos.[Arnau et al. 2000a]. Debido a que la conductancia del sensor no está influenciada por la capacitancia paralela, esta técnica evita la necesidad de compensarla.

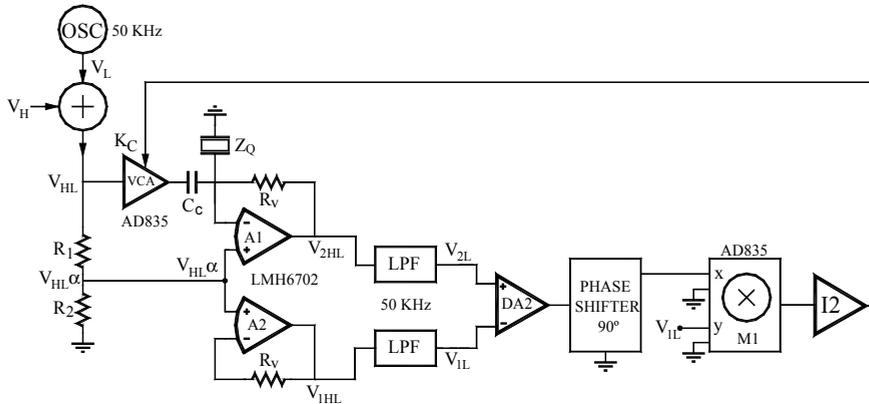


Figura 3.23: Compensación de la capacitancia paralela usando la técnica de voltaje nulo en lugar de la detección de fase nula.

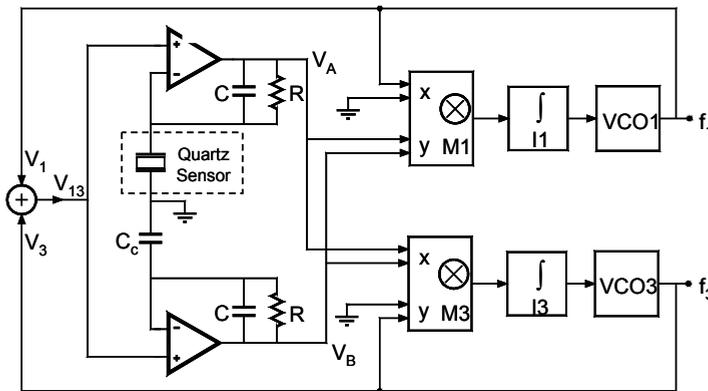


Figura 3.24 Sistema de interfaz para QCM basado en técnicas de PLL y excitado simultáneamente por dos frecuencias.

3.4.2 Técnicas de Enganche a la Frecuencia de Máxima Conductancia.

El esquema del concepto de esta técnica se presenta en la Figura 3.25.

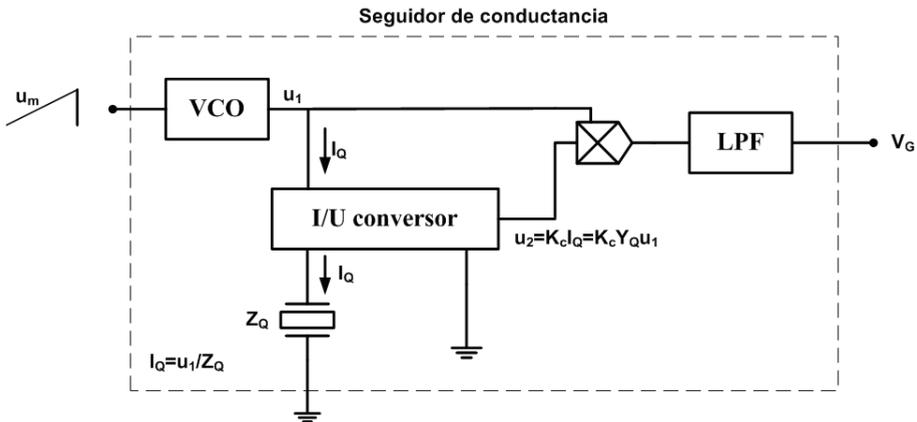


Figura 3.25: Esquema del principio de funcionamiento de las técnicas de enganche a la frecuencia de máxima conductancia.

El sensor es pasivamente interrogado por una señal que realiza un barrido en un rango de frecuencias cercanas a la frecuencia de resonancia. La corriente a través del sensor es convertida a tensión y multiplicada por la señal de interrogación. La componente de baja frecuencia V_G a la salida del multiplicador es proporcional a la conductancia.

El problema ahora es como detectar o bloquear al máximo de esta señal. Algunos esfuerzos se han dirigido hacia este objetivo. Nakamoto y Kobayashi [Nakamoto et al. 1994] han propuesto un circuito que se basa en este concepto, usando un detector de pico para encontrar el máximo de esta señal; al detector de pico le adicionaron un circuito digital permitiendo la adquisición de la tensión correspondiente a la entrada del VCO y el valor de la tensión V_{Gmax} . Este barrido se repite cíclicamente cada segundo. Los valores de voltaje adquiridos de la entrada del VCO y el voltaje pico de la conductancia proporcionan la información acerca de la frecuencia de resonancia y las pérdidas del resonador. Con el fin de aumentar la resolución en frecuencia, se ha usado un VCXO. El diseño funciona bien para sensores con alta Q , pero el aplanamiento del pico de conductancia para resonadores de baja Q hace difícil la detección del pico de máxima conductancia, disminuyendo la precisión de las mediciones.

Un nuevo método de enganche a la frecuencia de la máxima conductancia ha sido presentado por Jakoby et al. [Jakoby et al. 2005]. En este método, el bloque de la Figura 3.25 se incluye dentro de otro bucle, como lo muestra la Figura 3.26. De acuerdo con este esquema, la señal de salida del VCO es una frecuencia modulada por dos señales: una señal u_c que viene del integrador y otra señal auxiliar (u_{aux}) de baja frecuencia, que viene de un generador externo.

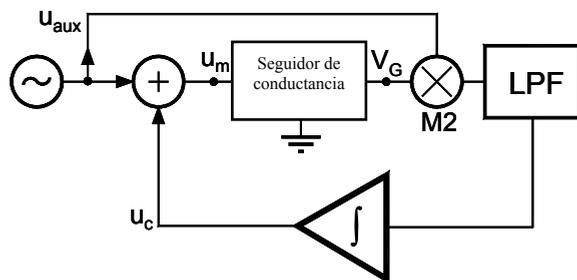


Figura 3.26: Bucle automático de enganche a la máxima conductancia.

La señal que viene del integrador determina la frecuencia central o la portadora a la salida del VCO en la Figura 3.25, y la señal de baja frecuencia provee la señal moduladora, con una desviación que depende de la amplitud de la señal. Por lo tanto, este sistema implementa una modulación en frecuencia cuya frecuencia portadora varía hasta alcanzar y engancharse a la frecuencia de máxima conductancia. En efecto, la tensión moduladora del generador externo es conectada a una entrada del multiplicador del bucle externo M2; este voltaje modulador provee una desviación de frecuencia alrededor del valor de la portadora, que produce un cambio en el voltaje V_G a través de la respuesta conductancia-frecuencia. Este voltaje A.C. reduce su amplitud a cero cuando alcanza el punto máximo de la conductancia, lo que hace que la salida del multiplicador M2 (entrada del integrador) sea de cero voltios y se establezca la frecuencia de la portadora al valor de la máxima conductancia.

En esta técnica, la señal que interroga al sensor es una señal modulada en frecuencia, la información del valor de la frecuencia a la máxima conductancia se obtiene a través del voltaje a la salida del integrador bajo condiciones de enganche. En este caso, la resolución en frecuencia depende de la resolución en la medida del voltaje, que a su vez depende de la relación voltaje-frecuencia del VCO; para una resolución alta, amplios rangos de voltaje deben cubrir estrechos rangos de frecuencia; entonces, un VCXO puede ser una buena solución, aunque el rango de la frecuencia dinámica sea drásticamente reducido.

3.5 Interfaz para Aplicaciones de fast-QCM.

Un *fast* - QCM se puede definir como un QCM en el que los cambios de la frecuencia monitorizada ocurren a una tasa muy elevada, por ejemplo 1000 veces por segundo. Esto significa que la frecuencia de resonancia característica del resonador está cambiando a razón de 1000 veces por segundo. En estos

momentos no hay una interfaz, a excepción de los osciladores, capaz de monitorizar la frecuencia de resonancia de este tipo de cristales; las técnicas basadas en PLL, pueden ser una muy buena opción alternativa para proveer un voltaje directamente proporcional al cambio de la frecuencia. Sin embargo, para tener suficiente sensibilidad frecuencia-voltaje, es necesario cubrir un margen de frecuencias muy estrecho de enganche con un amplio margen de tensión; sin embargo, esto reduciría el rango dinámico del sistema, por lo tanto se debe desarrollar una nueva técnica de PLL especial para este objetivo.

El hecho de que los osciladores son capaces de realizar el seguimiento de las variaciones de la frecuencia de resonancia, no resuelve el problema, porque esos cambios muy rápidos de frecuencia no son fáciles de medir y se deben desarrollar técnicas especiales para monitorizarlos. Un sistema ha sido propuesto para resolver este problema en aplicaciones de electrogravimetría-*ac* [Torres et al. 2007; Torres et al. 2006].

La electrogravimetría-*ac* está basada en una microbalanza de cuarzo electroquímica (EQCM) usada en régimen dinámico. En la electrogravimetría-*ac* la señal de salida del sistema fast QCM puede ser considerada como una señal de frecuencia modulada, en que la señal moduladora es la tensión sinusoidal aplicada a la celda electroquímica. Es importante notar que la frecuencia de resonancia del QCM está en el rango de los mega-Hertz, mientras que la perturbación aplicada se encuentra en un rango de frecuencia de 1mHz a 1KHz. Los cambios experimentales de la frecuencia, en relación a la frecuencia central del QCM, que se suelen encontrar cuando la perturbación senoidal se aplica a las celdas electroquímicas, están en el rango de los 10 a los 50 Hz. Para obtener una función de transferencia de electrogravimetría fiable (EGTF), la relación $\Delta m/\Delta E$ debe obtenerse con gran exactitud. El problema es que Δm está relacionada con el cambio de la frecuencia del QCM, que debe ser obtenido con alta resolución, alrededor de 0.1-0.5 Hz, y puede ocurrir que en un amplio margen de frecuencias, a velocidades de hasta 1KHz. Es bien conocido que la medida de la frecuencia de una señal que esta alrededor de los 10MHz con una precisión de 0.1Hz y con un tiempo de muestreo menor que 0.1ms, no es fácil y es un problema común de los medidores de frecuencias.

Por otra parte, ya que se está interesado en el seguimiento exacto de los cambios de la frecuencia y no necesariamente en el valor absoluto de frecuencia, un convertidor frecuencia/voltaje, podría ofrecer una señal de tensión directamente relacionada con los cambios de la frecuencia ocurridos durante el experimento electroquímico. Esta tensión podrá ser usada junto con el voltaje de la señal de perturbación como entrada a un analizador de función de transferencia (TFA), por ejemplo Solartron 1254, para obtener la EGTF. Por lo tanto el objetivo es obtener un conversor frecuencia/voltaje lo suficientemente sensible y con muy poca distorsión de amplitud y fase en un rango de 1mHz a 1KHz de la señal de perturbación.

Es bien conocido, que un sistema basado en PLL es ideal como conversor frecuencia-voltaje (F-V). Pero en este caso es necesario tener una muy alta sensibilidad F-V y además un rápido seguimiento de la frecuencia; que no es común en los típicos circuitos demoduladores de frecuencia. Los PLL de baja frecuencia se usan actualmente en electrogavimetria-ac, sin embargo, en estos sistemas el filtro paso-bajo hace que la respuesta del sistema sea lenta y la señal demodulada presente distorsión en fase y amplitud [Gabrielli et al. 2007].

Un nuevo sistema basado en PLL ha sido propuesto, cuyo diagrama de bloques se muestra en la Figura 3.27 [Torres et al. 2007; Torres et al. 2006].

En el circuito un mezclador principal funciona como un detector de fase, un filtro paso-bajo seguido por un circuito acondicionador de señal y un oscilador de cristal controlado por tensión (VCXO), forman el bucle principal de un PLL. Se usa un VCXO con un conversor frecuencia-voltaje (V/F) de alta ganancia, en lugar de un simple oscilador controlado por voltaje (VCO), para mejorar la sensibilidad F-V; sin embargo, el rango dinámico y el rango de enganche del PLL se reducen. Este es un nuevo problema, ya que no se conoce “a priori” la frecuencia central del sistema QCM (f_T).

Un oscilador controlado numéricamente (NCO) es usado para corregir este problema. La frecuencia del NCO (f_{NCO}) se selecciona de tal manera que la suma de la frecuencia proveniente del sistema QCM y la del NCO ($f_T + f_{NCO}$) este dentro del rango dinámico del VCXO y el rango de enganche del PLL; con este propósito, se adiciona el mezclador secundario seguido de un filtro que seleccione la señal cuya frecuencia sea la diferencia entre la frecuencia del VCXO y la frecuencia del NCO ($f_R = f_{VCXO} - f_{NCO}$). Un algoritmo implementado en una FPGA (Field Programmable gate array) integrada al circuito, realiza una medición aproximada de la frecuencia central del QCM durante un tiempo de 100ms, con un error máximo de 10Hz, y controla de forma apropiada la frecuencia del NCO. La FPGA únicamente cambia la frecuencia del NCO cuando la desviación de la frecuencia central del sistema QCM se sale del rango de enganche del PLL. Por lo tanto, el NCO se usa para extender el margen de enganche del PLL alrededor de una frecuencia apropiada y una vez que el PLL está enganchado, el VCXO aumenta la ganancia de conversión frecuencia/tensión. En otras palabras el NCO realiza un ajuste grueso, mientras el bucle principal realiza un ajuste fino de la frecuencia que sigue el PLL.

El sistema descrito ha sido implementado con éxito, con una sensibilidad superior al 15mV/Hz y con un ancho de banda de la respuesta amplitud-frecuencia y fase-frecuencia superior a 2.5KHz. Esto significa que el sistema puede seguir los cambios de frecuencia superiores a 2.5KHz con una insignificante distorsión en la variación de la amplitud y distorsión de la fase. El sistema ha sido aplicado con éxito en la caracterización de polímeros [Torres 2007].

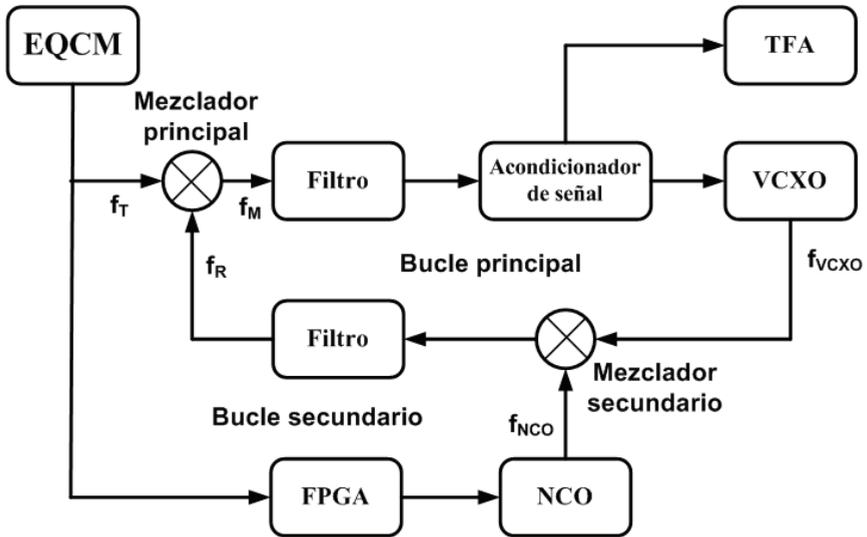


Figura 3.27: Esquema de la interfaz electrónica para la operación de *Fast-QCM* tomado de [Torres et al. 2006].

***CAPÍTULO II:
JUSTIFICACIÓN Y
OBJETIVOS***

CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Tras el análisis del estado del arte se ha puesto de manifiesto el tremendo esfuerzo llevado a cabo en los últimos 50 años por disponer de sistemas de caracterización para resonadores piezoeléctricos adecuados para la aplicación de la técnica de microbalanza en medios fluidos. La viabilidad de operar con el sensor en contacto con medios líquidos ha extendido enormemente el campo de aplicaciones a los entornos bioquímico y electroquímico, en tal medida que la QCM puede ser considerada como una técnica alternativa, simple, rápida y de bajo coste en comparación con otras técnicas convencionales. No obstante, el aumento de la sensibilidad y del límite de detección, así como de la robustez y fiabilidad del sistema en su conjunto y la capacidad de detección multianálisis son retos pendientes de los sistemas basados en sensores de onda acústica en general, y en particular en la QCM.

Acometer estos retos supone trabajar simultáneamente en 4 líneas diferentes: a) aumento de la frecuencia fundamental de los QCR con el objetivo de aumentar la sensibilidad, b) mejorar la relación señal/ruido (S/N) del sistema de caracterización, incluyendo no sólo el subsistema electrónico sino el conjunto de todas sus partes: subsistemas de flujo y de control de los parámetros del entorno tales como: temperatura, presión, vibración, etc., con el objetivo de mejorar el límite de detección, c) mejorar la robustez y fiabilidad del sistema, lo que supone aumentar el control de los procesos y facilitar su automatización, con el objetivo de aumentar el grado de repetitividad en los experimentos y el control de los parámetros del sistema en su conjunto, lo que facilitará la calibración del mismo y redundará en la mejora de los puntos a) y b) anteriores; y d) disponer de sistemas de caracterización electrónicos suficientemente simples y sencillos, viables para trabajar con sensores de alta frecuencia y con gran capacidad de integración que permitan implementar un sistema de detección con arrays de sensores, con el objetivo de proporcionar un sistema multianálisis.

Abordar los cuatro retos anteriores de forma simultánea es una labor de investigación de gran envergadura que se escapa de los límites razonables de un único trabajo de tesis, por ello en el grupo de investigación se aborda esta tarea entre varios proyectos de investigación coordinados que en ocasiones presentan cierto grado de solapamiento inevitable.

En el presente trabajo de tesis se aborda parte del último reto indicado anteriormente con el siguiente objetivo:

- Diseño y desarrollo de un sistema interfaz electrónico de caracterización suficientemente preciso para aplicaciones QCM en medio líquido, con capacidad para trabajar a alta frecuencia y fácilmente integrable.

Este objetivo es un objetivo clásico, como ya se ha podido reconocer tras el estudio del arte anterior. Sin embargo, no conseguido de forma totalmente satisfactoria en los siguientes aspectos:

- 1.- Los sistemas más precisos, tales como analizadores de impedancia o de redes son excesivamente costosos, voluminosos y no permiten una caracterización multisensor.
- 2.- Los sistemas basados en analizadores ad-hoc y los basados en bucles de enganche de fase son bastante precisos pero tienen dos problemas fundamentales: el diseño para sistemas de alta frecuencia se complica en exceso y su capacidad de integración está limitada, por lo que resulta inviable su utilización en sistemas multidetección.
- 3.- Los sistemas osciladores permiten trabajar a altas frecuencias y su capacidad de integración es elevada, por lo que son buenos candidatos como sistemas de caracterización para altas frecuencias y con capacidad multianálisis, sin embargo son sistemas poco precisos y más inestables cuando se trabaja con QCRs de bajo factor de calidad y alta frecuencia.

En consecuencia, el objetivo planteado es coherente con las necesidades del estado del arte actual y con la línea de investigación del grupo donde se ha desarrollado este trabajo de investigación.

Tras el estudio previo, es coherente, en base a las necesidades de aumento de frecuencia y capacidad multianálisis, profundizar en la técnica del oscilador como paso inicial, ya que es, de todos los sistemas estudiados en el estado del arte, el que reúne mejores capacidades de integración y puede utilizarse de forma “sencilla” a frecuencia muy elevadas. Sin embargo será necesario tratar de mejorar su precisión en la caracterización del sensor en medios fluidos. En segundo lugar se deben investigar configuraciones alternativas a los osciladores

y finalmente los diferentes sistemas deben validarse a partir de una aplicación real, comparando sus resultados. En definitiva, los objetivos plantados son:

1.- Profundizar en la técnica de oscilador para la caracterización de los sensores QCM en medios fluidos, tratando de mejorar la precisión en los parámetros de caracterización.

2.- Investigar y proponer técnicas de caracterización, alternativas a los osciladores, viables para su funcionamiento hasta muy altas frecuencias y con gran capacidad de integración, y por tanto viables para caracterizar un sistema de array de sensores, especialmente útiles para aplicaciones bioquímicas; realizar su diseño y validar su funcionamiento.

3.- Validar y comparar los sistemas desarrollados en una aplicación experimental real.

***CAPÍTULO III:
APORTACIÓN I:
OSCILADOR***

CAPÍTULO III: OSCILADOR

Los sistemas que actualmente caracterizan en su totalidad a los resonadores piezoeléctricos suelen ser de gran tamaño y de costes elevados, lo que dificulta y limita las aplicaciones. Por otra parte, los sistemas que caracterizan adecuadamente la frecuencia y la resistencia del resonador, basados fundamentalmente en técnicas de enganche de fase, son adecuados para ciertas frecuencias y requieren, en principio, diseños sofisticados que limitan su capacidad de integración. Finalmente, los osciladores utilizados generalmente informan únicamente de la frecuencia y aquéllos que disponen de medida de resistencia tienen un margen de funcionamiento limitado debido, principalmente, al efecto conjunto de la resistencia y de la capacidad paralelo. Por lo tanto, existe la constante necesidad de buscar nuevos sistemas, o de proponer mejoras a los ya existentes, que permitan la obtención de los parámetros más importantes de acuerdo a la aplicación, a la vez que: sean de coste moderado, se puedan usar, por su tamaño, como sensores en entornos diferentes a los del laboratorio y permitan, además, aumentar la sensibilidad en la medida. A pesar de las limitaciones, los sistemas basados en osciladores permiten cumplir en gran medida con los requisitos observados de simplicidad y capacidad de integración, aunque es necesario ampliar su capacidad de caracterización y extender su rango de aplicaciones.

En la actualidad, los osciladores además de los analizadores de impedancias son el sistema elegido para caracterizar cristales de alta frecuencia (HFF-QCM). [Bustabad et al. 2009; Stehrer et al. 2009a; Uttenthaler et al. 2001a]. Este capítulo comprende el diseño de un oscilador que mejore las prestaciones de los desarrollados hasta el momento para entorno líquido, permitiendo aumentar las aplicaciones, la sensibilidad en la medida y sirviendo, al mismo tiempo, como plataforma para implementar sistemas de HFF-QCM.

4 MÉTODOS

4.1 Método de Caracterización: Seguimiento de Frecuencia (OSCILADOR)

La interfaz propuesta para la microbalanza de cuarzo se basa en un oscilador diferencial equilibrado (Balanced Bridge Oscillator, ver Figura 3.19) [Benes et al. 1995; Benes et al. 1999]. Este tipo de osciladores, en principio, parece ofrecer como ventaja la compensación de la capacitancia paralela, a través de un sistema diferencial. Lo cual le confiere una característica especial. Además, el cristal de cuarzo tiene uno de los electrodos conectado directamente a masa, lo que presenta una ventaja en aplicaciones electroquímicas o biológicas y permite un mejor control de los efectos parásitos.

El principio ideal de funcionamiento del Oscilador Diferencial Equilibrado (ver Figura 3.19) consiste, en términos generales, en la existencia de dos ramas idealmente iguales en configuración diferencial. La señal de entrada u_i es transferida al emisor de Q_1 y Q_2 , la corriente que circula por el emisor es convertida a voltaje en el colector y realimentada a través del amplificador diferencial. En la práctica el principio de funcionamiento ideal presentado anteriormente no se cumple, principalmente por el uso de transistores, lo cual constituye una de las principales desventajas del circuito estudiado.

Teniendo en cuenta lo anterior, la Figura 4.1 muestra el diagrama de bloques del sistema propuesto. Los transistores Q_1 y Q_2 de la Figura 3.19 han sido reemplazados por dos amplificadores de Transconductancia o transistores diamante OTA1 y OTA2, respectivamente; el circuito integrado AD835 permite configurar las dos ramas en modo diferencial, al mismo tiempo que permite usarse como amplificador de ganancia variable para el control automático de ganancia (AGC). El AGC fija la condición de ganancia del bucle, y además proporciona información sobre la R_m de la QCM. Las entradas diferenciales del AD835 permiten, idealmente, realizar la compensación de la capacidad paralelo.

La tensión en la base de los OTA's (u_1) es transferida al emisor, y la corriente del emisor es convertida a tensión en el colector. La diferencia entre las tensiones de salida de los colectores de los OTA1 y OTA2 se amplifica en el circuito integrado AD835, que al mismo tiempo multiplica la señal diferencia por la tensión proporcionada por el controlador automático de ganancia (AGC). La tensión del AGC controla la amplitud de la señal de salida del OTA1, y la señal de salida del AD835 es realimentada a la entrada (base de los OTA's).

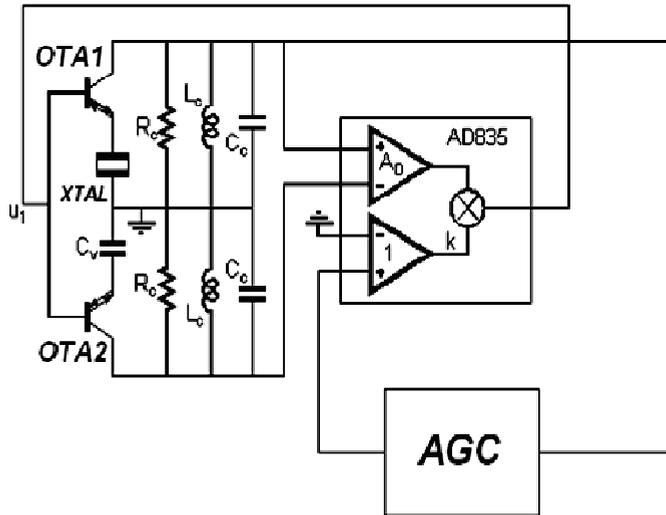


Figura 4.1: Diagrama de bloques del sistema propuesto

El principio de funcionamiento del sistema propuesto se describe de la siguiente manera:

La adecuada selección de la amplitud de la tensión de salida del colector del OTA1 y del valor de R_c permite controlar un gran rango de cargas.

El circuito paralelo $C_c - L_c$ funciona como un filtro cuya frecuencia central está cercana a la frecuencia de resonancia del cristal.

Es posible que se dé una pequeña desviación de la fase debida a la resistencia intrínseca del emisor r_E , siendo $r_E = 8\Omega$; esta desviación de fase estará alrededor de $0,28^\circ$ para una compensación capacitiva de 10pF a 10MHz.

El sistema propuesto está gobernado por las siguientes ecuaciones:

$$i_x = u_1 * Y_x \tag{3.1}$$

Donde:

i_x : es la corriente que atraviesa el cristal.

u_i : es la señal en la base del OTA del cristal.

Y_x : es la admitancia del cristal.

Si suponemos que el resonador esta oscilando a su frecuencia de resonancia y que el filtro LC está también a su frecuencia de resonancia (impedancia infinita, $f_0=1/(2\pi(LC)^{1/2})$), la señal del colector del OTA1 (u_0) se podría definir como:

$$u_0 = i_x R_C = u_1 R_C \left(j\omega C_0 + \frac{1}{R_m} \right) \quad (3.2)$$

De forma similar se puede decir que la señal del colector de la OTA2 estaría dada por:

$$u_{cv} = u_1 R_c j\omega C_v \quad (3.3)$$

Si las señales u_0 y u_{cv} son aplicadas a la entrada diferencial del multiplicador AD835 y suponiendo que la capacitancia paralela estuviera perfectamente compensada ($C_0=C_v$), se obtendría:

$$u_0 - u_{cv} = u_1 \frac{R_c}{R_m} \quad (3.4)$$

Al multiplicar la señal $u_0 - u_{cv}$ por la señal de control (V_{AGC}) que procede del AGC se obtiene:

$$(u_0 - u_{cv}) * V_{AGC} = u_1 V_{AGC} \frac{R_c}{R_m} \quad (3.5)$$

Como la señal de salida del multiplicador es realimentada a la base de los OTA's, entonces:

$$u_1 = (u_0 - u_{cv}) * V_{AGC} \quad (3.6)$$

Remplazando la ecuación (3.6) en la ecuación (3.5).

$$\frac{R_c}{R_m} V_{AGC} = 1 \quad (3.7)$$

La ecuación (3.7), proporciona la condición de ganancia de bucle para oscilación a la frecuencia de resonancia serie dinámica del resonador, bajo condición de compensación perfecta de la capacidad paralelo C_0 ; de lo contrario,

la ecuación (3.7), se podría escribir de una forma más general: (teniendo en cuenta la impedancia general del resonador).

$$\frac{R_c}{Z_{eq}} V_{AGC} = 1 \quad (3.8)$$

$$Z_{eq} = Z_m // Z_{Cr} \quad (3.9)$$

Donde:

Z_m : Impedancia de la rama dinámica del sensor.

Z_{Cr} : Impedancia de la capacitancia paralela residual que no se ha compensado. ($C_r = C_0 - C_v$; $Z_{Cr} = 1/j\omega C_r$).

La ecuación (3.8) presenta una condición de ganancia de bucle y de fase del oscilador más general; sin embargo, sigue asumiendo que las características de los componentes del circuito son ideales, en especial las características de ganancia y fase de los OTAs, así como de los amplificadores del multiplicador, y asume también que el circuito paralelo que actúa de filtro no produce ningún desfase a la frecuencia de oscilación. La validación experimental del circuito determinará el grado de cumplimiento de la ecuación anterior.

4.1.1 Descripción Detallada del Sistema Propuesto.

A continuación se presenta una descripción detallada de la interfaz para microbalanza de cuarzo que ha sido diseñada. El sistema está dividido en dos partes: el oscilador y el control automático de ganancia.

4.1.1.1 Oscilador.

El circuito electrónico diseñado se muestra en la Figura 4.2. Como amplificador se ha utilizado el amplificador de transconductancia OPA860 [OPA860 2005] (ver Figura 4.3). La resistencia R_C condiciona la amplificación de los OTAs, y se debe seleccionar de acuerdo a las características de los líquidos que se desean medir; en este caso en particular se ha escogido $R_C = 1K\Omega$, lo cual garantiza que se mantenga la oscilación del sistema para un margen de valores de la resistencia dinámica del resonador comprendido entre 10Ω y 850Ω ($10\Omega < R_m < 850\Omega$). Para aplicaciones en biosensores R_C puede ser del orden de

500Ω ya que R_m estará en torno a los 220 Ω (R_m aproximada del agua para un resonador típico de 10MHz con electrodo de 5mm de diámetro). Si R_m toma valores superiores a 850Ω, el valor de R_C debe aumentarse; esto presenta el inconveniente de restringir el funcionamiento del oscilador a medidas exclusivamente en medio líquido, ya que para medidas con el resonador sin carga (R_m aprox. = 20Ω en aire) se alcanzarían valores muy altos de ganancia y el OTA del cristal entraría en saturación.

El filtro LC conectado en paralelo a la resistencia R_{C1} (ver Figura 4.3), está diseñado como filtro paso-banda, su frecuencia de resonancia (f_{0r}) corresponde a la siguiente ecuación:

$$f_{0r} = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \quad (3.10)$$

Los elementos L y C que forman el filtro han sido seleccionados de tal manera que f_{0r} este alrededor de 10 MHz (frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo) en esta aplicación. Si se desea usar otro resonador de cuarzo a una frecuencia de oscilación diferente de 10 MHz, el circuito L-C debe cambiar de valores, haciendo su f_{0r} cercana a la nueva frecuencia de resonancia. El hecho de poder trabajar a distintas frecuencias cambiando únicamente el resonador y algunos elementos simples del circuito, es lo que proporciona mayor versatilidad a la técnica de oscilación, y en particular al sistema propuesto, en relación al resto de técnicas estudiadas; y le confiere, en principio, capacidad para la implementación de sistemas basados en HFF-QCM de forma simple; de los que se espera obtener mayor sensibilidad.

Acompañando a los esquemas de las distintas partes del circuito, se incluyen a continuación detalles de diseño de las distintas etapas que forman el circuito oscilador propuesto, haciendo especial hincapié en los aspectos del diseño real que afectan a las asunciones realizadas previamente para el cálculo de las condiciones de oscilación.

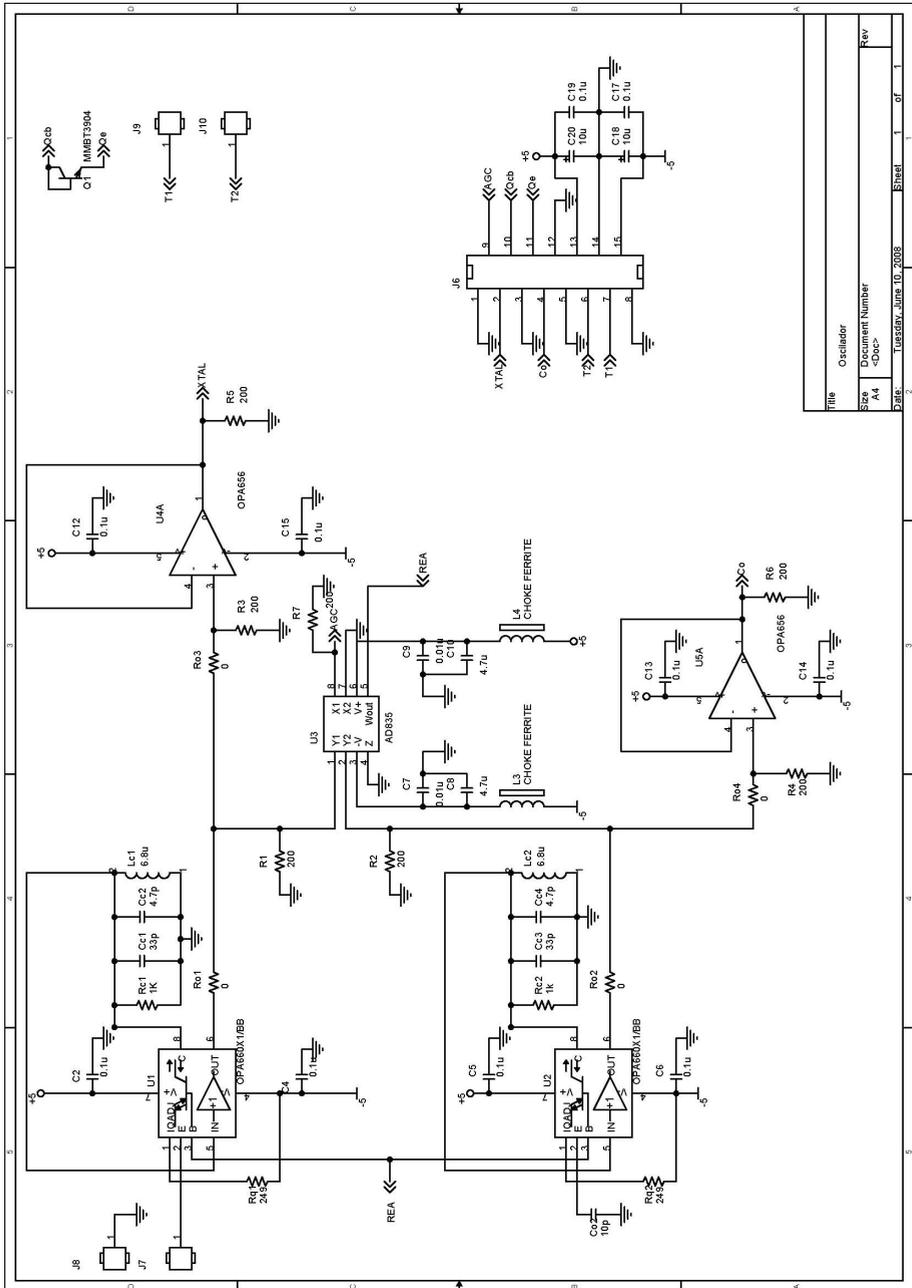


Figura 4.2: Esquema Circuito Oscilador.

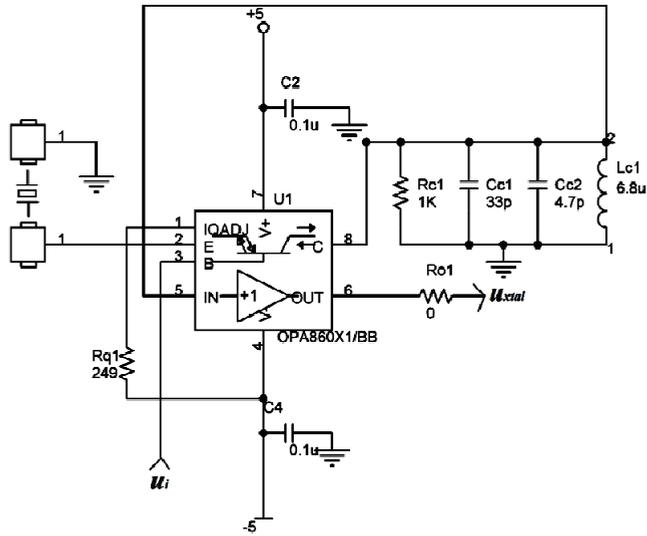


Figura 4.3: Diseño del amplificador del cristal usando una OPA860

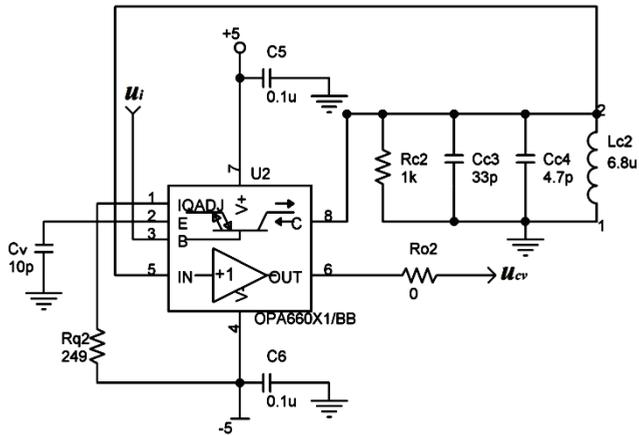


Figura 4.4: Amplificador de la rama de compensación capacitiva

La rama formada por el OTA2 (ver Figura 4.4) debe ser exactamente igual y con las mismas características que la rama formada por el OTA1. El cristal de cuarzo se ha remplazado por el condensador C_v , que debe ser del mismo valor

que el condensador C_0^* del cristal, según el modelo BVD de la Figura 1.2c. Para determinar el valor exacto de C_v se deben tener en cuenta las capacidades adicionales generadas por la celda, los cables de conexión y la misma placa de circuito impreso. En el momento en que se alcanza la condición $C_v=C_0^*$, la frecuencia de oscilación solamente refleja, idealmente, los efectos producidos por la contribución de la carga en la frecuencia de resonancia serie dinámica del resonador (según el modelo BVD Figura 1.2). Es importante indicar que el valor de la capacidad paralelo no se conoce con total precisión, por lo tanto el valor correspondiente de la capacidad C_v debe escogerse de manera aproximada. Inicialmente se seleccionó una capacidad $C_v=10pF$, valor de orden similar a la capacidad paralela C_0 .

El circuito de filtrado a la salida del OTA2, debe ser exactamente igual al usado en el OTA1, para que exista simetría entre ambas ramas.

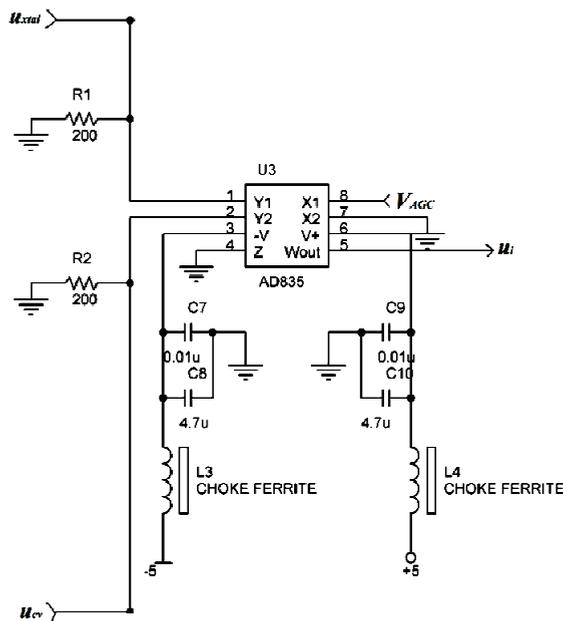


Figura 4.5: Multiplicador AD835 configurado como amplificador de ganancia variable.

El multiplicador AD835 (ver Figura 4.5) cumple dos funciones de acuerdo a su configuración: la primera es hacer la diferencia entre las señales de la rama del OTA1 y la rama del OTA2, y la segunda función es tomar la señal compensada y multiplicarla por el valor de la señal de control del AGC. De esta

manera la amplitud de la señal del OTA1 estará controlada por el valor de consigna del controlador AGC. La señal a la salida del AD835 es realimentada a las bases de los OTAs.

4.1.1.2 Control Automático de Ganancia (AGC)

El diagrama de bloques del control automático de ganancia (AGC) se muestra en la Figura 4.6, de acuerdo a [Martinez.G 2001]. El circuito electrónico del control automático de ganancia, se puede consultar en la Figura 4.8

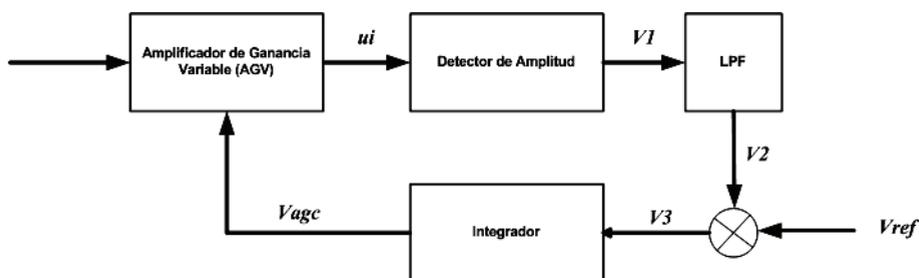


Figura 4.6: Diagrama de bloques del control automático de ganancia.

El multiplicador AD835 del circuito oscilador realiza las funciones del amplificador de ganancia variable (AGV).

Como detector de amplitud se usó el AD835, pero esta vez configurado como multiplicador, para obtener el cuadrado de u_i . Mediante un filtrado a la salida del multiplicador se puede obtener un nivel de tensión que está relacionado con la amplitud de la señal u_i .

En efecto, si

$$u_i = V \text{sen}(\omega t) \quad (3.11)$$

La siguiente ecuación describe el funcionamiento del detector de amplitud:

$$v_1 = u_i^2 = V \text{sen}(\omega t) * V \text{sen}(\omega t) = \frac{V^2}{2} - \frac{V^2 \cos(2\omega t)}{2} \quad (3.12)$$

Filtrando la componente de alta frecuencia de la señal v_1 , se obtiene la señal v_2 , que es proporcional al cuadrado de la tensión de pico de la señal senoidal.

$$v_2 = \frac{V^2}{2} \tag{3.13}$$

Como puede observarse, la señal de control v_2 , es proporcional al cuadrado de la tensión de pico de la señal senoidal u_i y puede tomarse como señal de referencia de la amplitud de la misma.

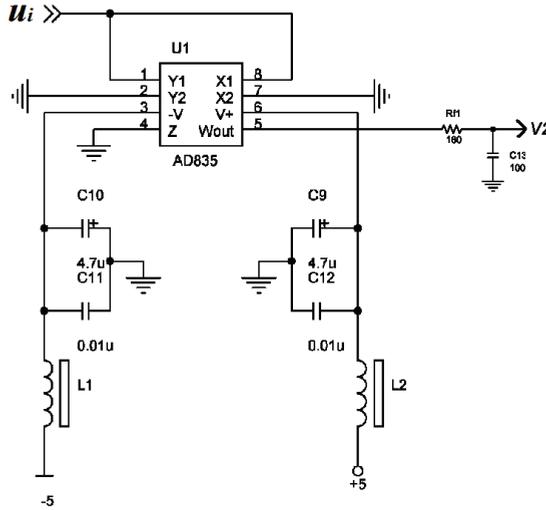


Figura 4.7: Detector de amplitud.

Como comparador se usa un amplificador en configuración diferencial [Schilling,D.L. et al93], cuya salida (v_3) se describe de acuerdo a la siguiente ecuación (ver Figura 4.9):

$$\begin{aligned} Rd1 &= Rd3 = 100\Omega \\ Rd2 &= Rd4 = 200\Omega \\ v_3 &= \frac{Rd2}{Rd1}(v_2 - V_{ref}) \end{aligned} \tag{3.14}$$

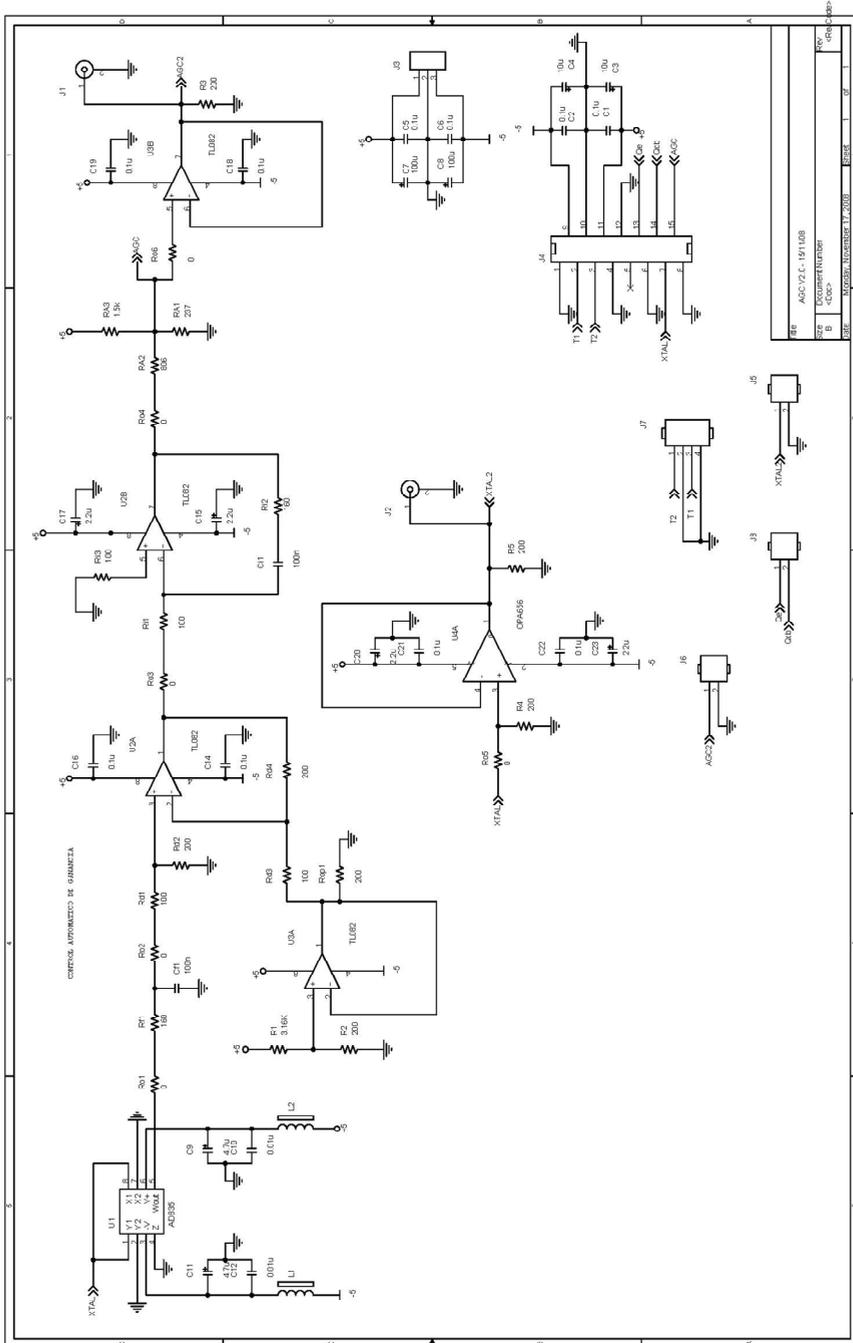


Figura 4.8: Esquema Control Automático de Ganancia.

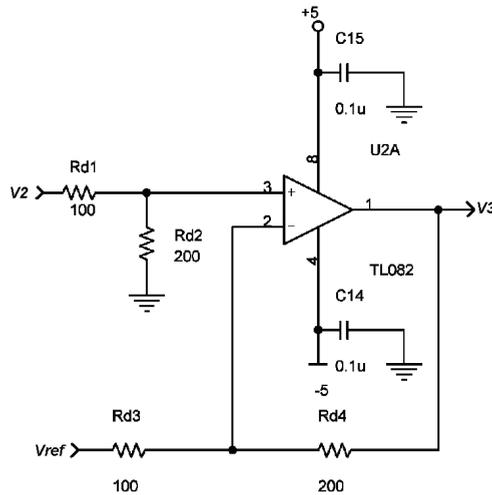


Figura 4.9: Circuito comparador.

La función del circuito integrador es dar estabilidad al bucle de control automático de ganancia. En efecto, en el momento que la señal de interés se iguala a la de referencia, la salida del circuito comparador se hace igual a cero ($v_2=V_{ref}$, $v_3=0V$), el integrador deja de integrar y mantiene un nivel de tensión constante, lo que permite controlar la señal de salida del sistema a la amplitud deseada.

El circuito integrador es mostrado en la Figura 4.10, que responde a la función de transferencia [Arnau,A. et al00]:

$$F(s) = -\frac{1 + \tau_2 s}{\tau_1 s} \tag{3.15}$$

La respuesta en frecuencia del filtro integrador se muestra en la Figura 4.11.

Donde: $\tau_1=R_i1 * C_i1=1x10^{-5}s$ y $\tau_2=R_i2 * C_i1=1.6x10^{-5}s$ y la frecuencia de corte del filtro es $f_c=1/2\pi\tau_2 \approx 10KHz$.

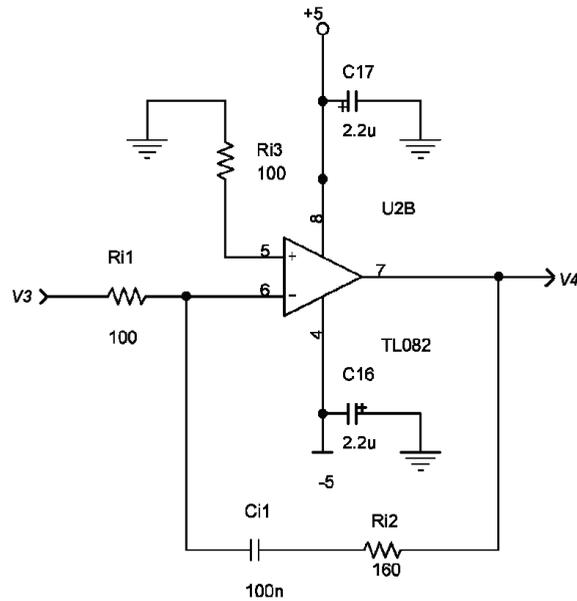


Figura 4.10: Circuito integrador

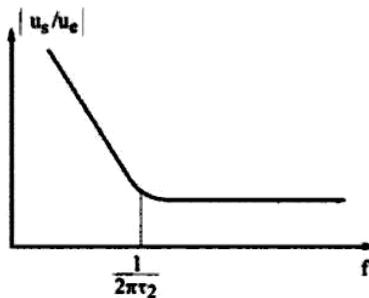


Figura 4.11: Respuesta filtro integrador

Como la salida del integrador puede tomar valores entre $-3,5\text{V}$ y $3,5\text{V}$, se hace necesario limitar la respuesta del integrador con el circuito resistivo que se muestra en la Figura 4.12a. La respuesta del circuito resistivo se puede observar en la Figura 4.12b. La función de este circuito es hacer que la respuesta del integrador tome solo los valores comprendidos entre 0V y $1,2\text{V}$. El motivo es que si la señal de salida del integrador, que en última es el tensión de control

V_{agc} , toma valores por debajo de cero, se estaría multiplicando la señal u_0-u_{cv} por un valor negativo y produciría un desfase de 180° en la realimentación, lo cual haría que el sistema dejara de oscilar al no cumplirse la condición de fase-cero para la oscilación. El motivo por el cual la señal se limita a 1,2V es por las restricciones de tensión a la entrada del AD835.

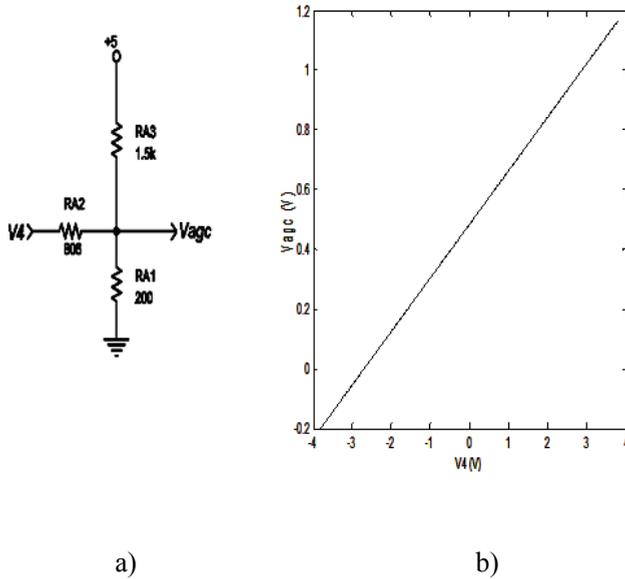


Figura 4.12: Circuito limitador de tensión.

4.1.2 Implementación

Para el diseño y simulación de los circuitos electrónicos se usó OrCAD capture v.16.0.

Las placas de circuito impreso (PCB) fueron diseñadas en OrCAD Layout v.16.0. El sistema se encuentra dividido en dos placas: oscilador y control automático de ganancia (AGC).

4.1.2.1 *Circuito Oscilador*

El circuito electrónico del oscilador se muestra en la Figura 4.2. La placa de circuito impreso es un diseño a cuatro capas TOP, BOTTOM, GND y POWER (+5V) cuyos *layouts* se muestran en la Figura 4.14, Figura 4.15, Figura 4.16 y Figura 4.17.

El diseño final se puede observar en la Figura 4.13.

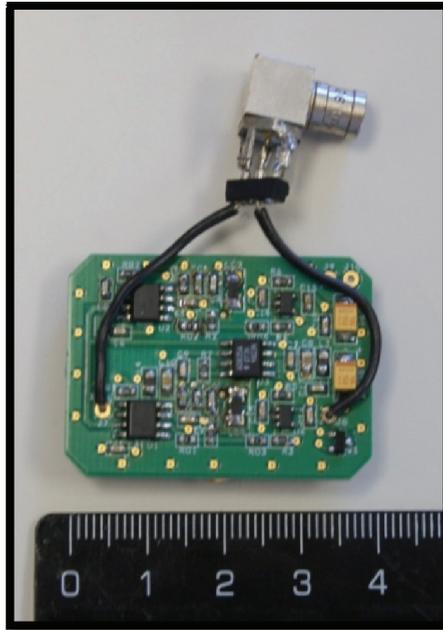


Figura 4.13: Fotografía: diseño final del circuito oscilador

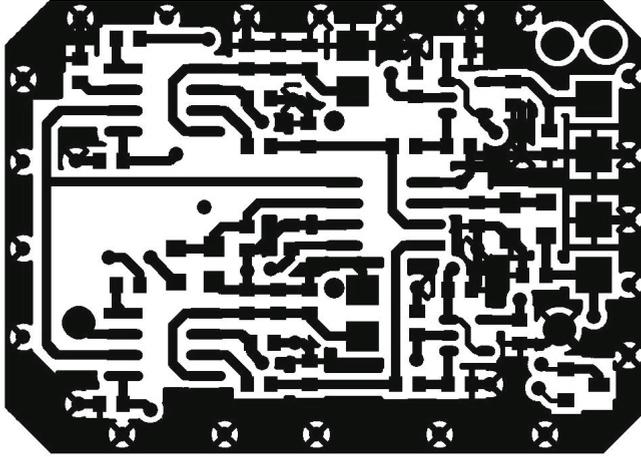


Figura 4.14: Capa TOP - circuito oscilador

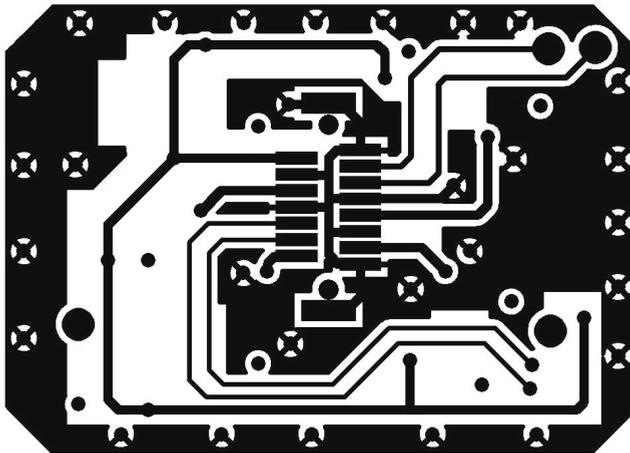


Figura 4.15: Capa BOT - circuito oscilador

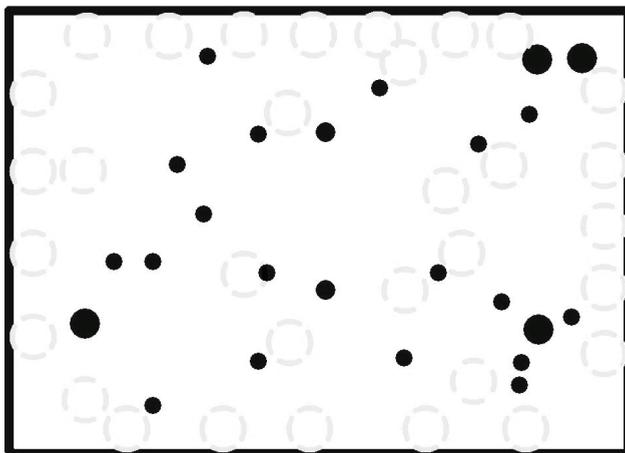


Figura 4.16: Capa GND - circuito oscilador.

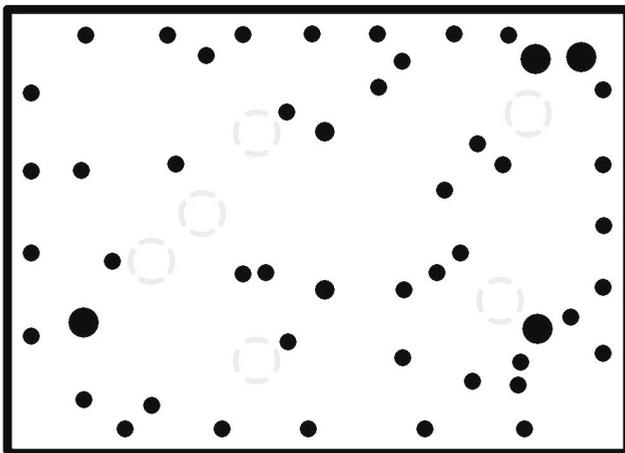


Figura 4.17: Capa PWR - circuito oscilador

4.1.2.2 Circuito Control Automático de Ganancia.

La Figura 4.18 muestra el circuito implementado, encargado de realizar el control automático de la ganancia del oscilador. El circuito impreso es un diseño a cuatro capas (TOP, BOTTOM, GND y POWER). Las imágenes de sus *layouts* se muestran a continuación (Figura 4.19, Figura 4.20, Figura 4.21 y Figura 4.22).

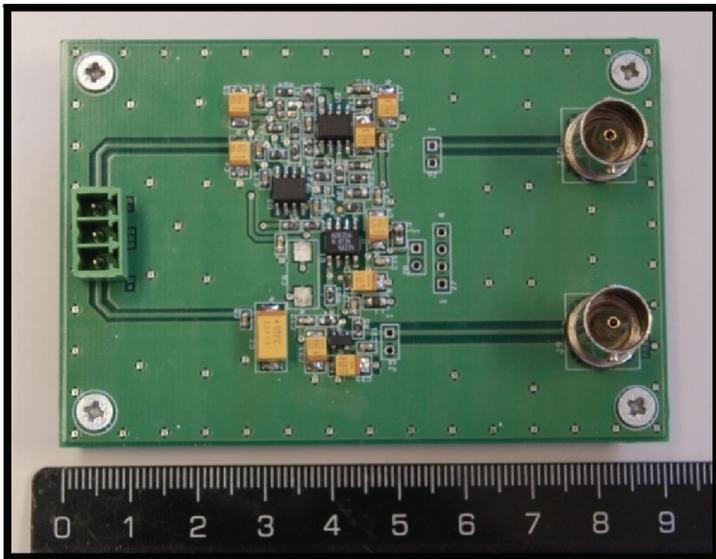


Figura 4.18: Fotografía: diseño final AGC.

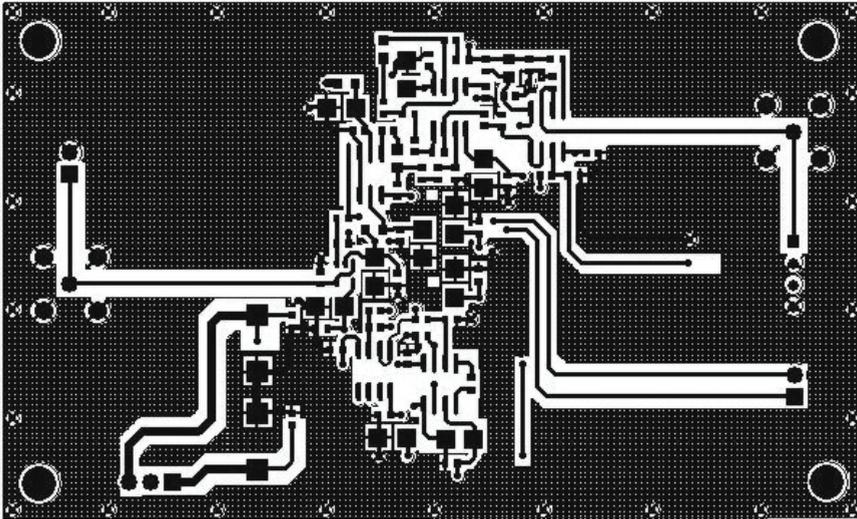


Figura 4.19: Capa TOP - circuito AGC.

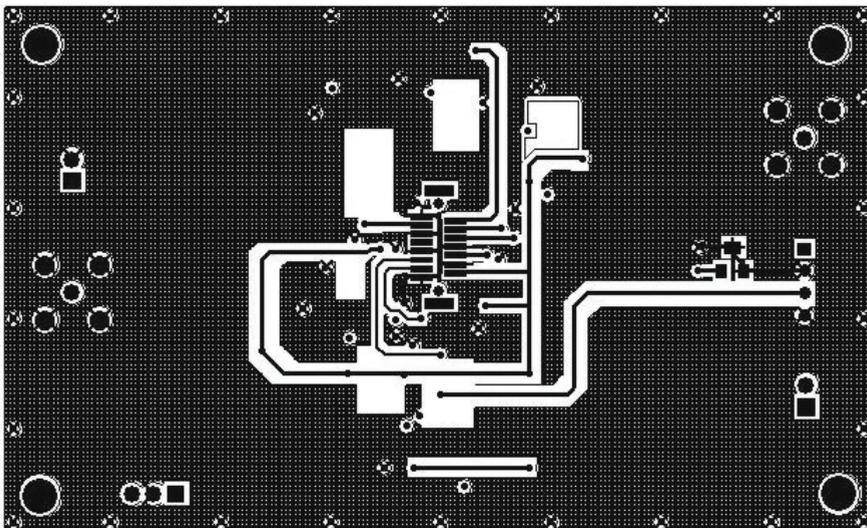


Figura 4.20: Capa BOT – circuito AGC.

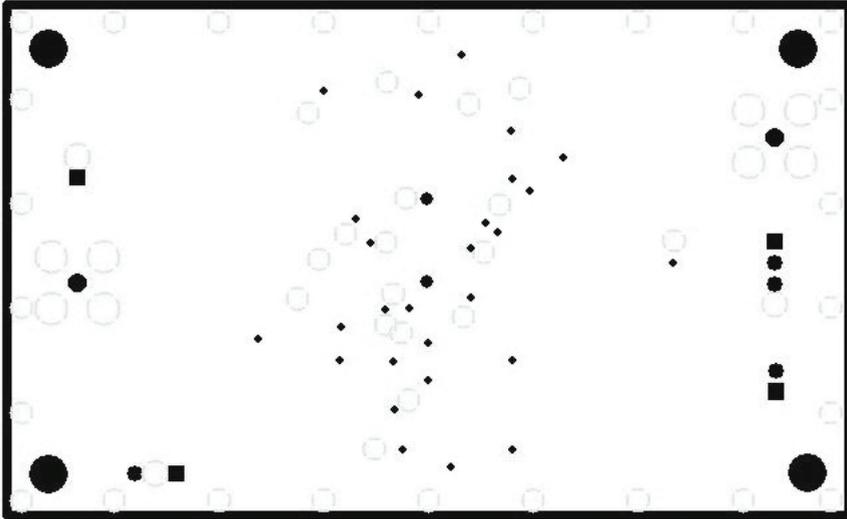


Figura 4.21: Capa GND – circuito AGC.

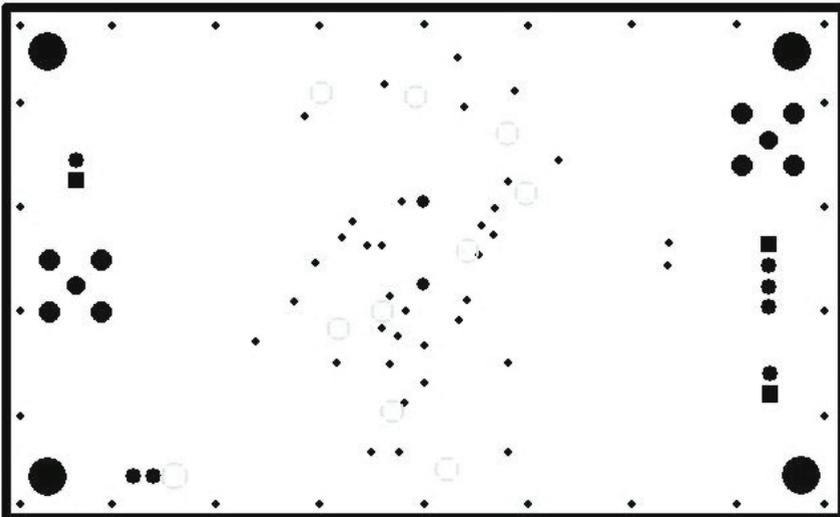


Figura 4.22: Capa PWR – circuito AGC.

Finalmente, el sistema de caracterización implementado se muestra en la Figura 4.23 y Figura 4.24.

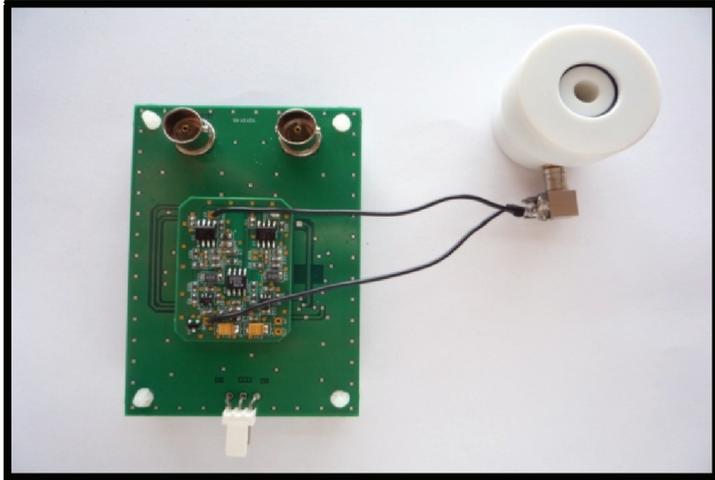


Figura 4.23: Imagen del sistema de caracterización.

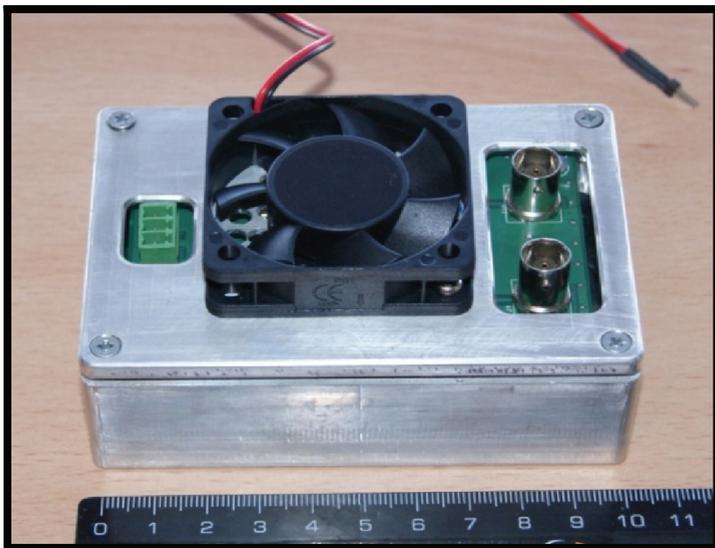


Figura 4.24: Sistema implementado.

4.2 Cristal y Celdas de Medida

4.2.1 Cristales

Para la realización de los ensayos se usaron cristales de cuarzo de corte AT, suministrados por International Crystal Manufacturing Company Inc. (ICM), con las siguientes especificaciones:

Frecuencia de resonancia = 10 MHz.

Diámetro del cristal = 13,67 mm.

Diámetro del electrodo = 5,11 mm.

Electrodos de Cr/Au, de grosor: Cr=100 Å y Au=1000 Å

4.2.2 Celdas de Medida.

4.2.2.1 Celda In-Batch



Figura 4.25: Celda de medida *in-Batch*.

En las primeras pruebas de puesta a punto y caracterización de líquidos, se utilizó una celda *in-batch*, fabricada en teflón, como la mostrada en la Figura 4.25, desarrollada por el Grupo de Fenómenos Ondulatorios de la Universidad Politécnica de Valencia (Línea Sistemas y Sensores Piezoeléctricos), donde se

ha desarrollado este trabajo de tesis. El uso de esta celda fue necesario, ya que solo se deseaba depositar una muestra de líquido sobre la superficie del cristal y observar la respuesta. La celda está fabricada en teflón y tiene una capacidad máxima de 200 μ l.

4.2.2.2 Celda de Flujo



Figura 4.26: Celda de flujo.

Para los ensayos de bioquímica se hizo necesario el uso de una celda que permitiera el flujo de líquido sobre la superficie del cristal, la celda de flujo ha sido desarrollada durante este trabajo de investigación por el Grupo de Fenómenos Ondulatorios de la Universidad Politécnica de Valencia (Línea Sistemas y Sensores Piezoeléctricos), y se muestra en la Figura 4.26. La celda se divide en dos partes:

1. Un bloque de metacrilato transparente que incluye el sistema de flujo, diseñado para que el fluido que pasa a través de él, llegue y salga del cristal formando un ángulo de 45°; este hecho, sumado a la posición vertical de la celda impiden la acumulación de burbujas sobre la superficie del electrodo del cristal. Dos racores se encargan de unir el sistema de fluidica de la celda con la tubería del ensayo.
2. Un bloque de aluminio que cumple las siguientes funciones:
 - Facilitar la conexión del cristal con el circuito de caracterización, por medio de unos contactos eléctricos en cuyo interior tienen un muelle, que permite al contacto ceder cuando se ejerce presión sobre la parte superior del mismo y en la misma dirección de la fuerza; esto ocurre al poner el cristal sobre los contactos y ejercer presión con el bloque de metacrilato (que también tiene un par de estos contactos), los

electrodos del cristal quedan unidos a los contactos de la celda, de esta manera los electrodos del cristal son prolongados hasta el conector SMB de la celda. Este tipo de contactos con muelle cumplen dos funciones, por un lado alargan los electrodos del cristal y por otro sirven de sujeción del cristal.

- Aislar por medio de un *o-ring* la cara inferior del cristal; así, solo la cara superior del cristal estará en contacto con el líquido.
- Dar soporte al cristal y al sistema de fluidica.
- Al estar fabricado de aluminio presenta una gran inmunidad al ruido electromagnético, eliminando así las interferencias parásitas; lo que se refleja en una mayor estabilidad de la señal (como se verá en el capítulo de resultados). Además, permite un mejor control de la temperatura del cristal, gracias a su alto coeficiente de conductividad térmica (209 W/m.K); siempre y cuando se trabaje bajo condiciones de temperatura controlada.

4.3 Instrumental de Medida Asociado.

- **Analizador de Impedancias:**
Analizador de impedancias HP4291A con un rango de funcionamiento de 1MHz a 1,8GHz.
- **Frecuencímetro:**
Frecuencímetro HP 53181A. Capaz de medir hasta 3GHz, además tiene un puerto GPIB que permite adquirir los datos desde el ordenador.
- **Multímetro:**
Se usó el multímetro HP 34401A de seis dígitos que, al igual que el frecuencímetro, posee un puerto GPIB para adquirir datos desde el ordenador.
- **Sistema de Adquisición de Datos.**
Para adquirir los datos desde el ordenador se usó el sistema AW SENSE IP/AQ-1 y su herramienta de software AW SENSE IP/AQ-1S ambos de la empresa AWSensors.

4.4 Ensayos: Comportamiento del Oscilador.

Se realizaron ensayos con cinco soluciones patrón de glicerol ($C_3H_8O_3$, peso molecular = 92,09), a diferentes concentraciones, como se muestran en la Tabla 4.1 (Tomados de [Weast,R. et al 1980]).

Tabla 4.1: Densidad y viscosidad del glicerol, de acuerdo a la concentración

Concentración (%)	Densidad (ρ) (Kg/l)	Viscosidad (η/η_0)
5	1,0097	1,125
15	1,034	1,486
25	1,059	2,057
35	1,085	2,969
45	1,112	4,675

El objetivo es observar la respuesta del circuito diseñado al variar la frecuencia y la resistencia dinámica del cristal, por efecto de un cambio en la viscosidad y la densidad del medio en contacto con el sensor, como lo predicen las ecuaciones (1.14) y (1.16).

La rama de compensación se configuró con un valor de capacidad lo más parecido al valor común de C_0 ; en este caso, se seleccionó un condensador de 10pF ($C_v=10\text{pF}$) y se realizaron medidas de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Medir con el oscilador (frecuencia de oscilación y tensión de salida del AGC), y con el analizador de impedancias (conductancia, susceptancia, fase de la impedancia, módulo de la impedancia y los valores de R_m , L_m , C_m , C_0), los parámetros iniciales del cristal en aire.
2. Depositar 80 μl de la muestra sobre la superficie del cristal y realizar medidas con el oscilador (frecuencia de oscilación y tensión de salida del AGC), y el analizador de impedancias (conductancia, susceptancia, fase de la impedancia, módulo de la impedancia y los valores de R_m , L_m , C_m , C_0).
3. Limpiar el cristal con agua bidestilada, etanol y secar con gas nitrógeno.
4. Repetir los pasos 1 al 3 para cada una de las muestras; se considera como muestras las soluciones patrón de glicerol y agua bidestilada.
5. Se comparan los resultados obtenidos con cada uno de los sistemas. La variación de frecuencia medida con el oscilador corresponde a la diferencia entre la frecuencia de oscilación del cristal con carga menos la frecuencia de oscilación del cristal al aire ($\Delta f_{OSC} = f_{carga} - f_{aire}$); y la variación de frecuencia medida con el analizador corresponde a la diferencia de la frecuencia a la máxima conductancia con carga menos la frecuencia a la máxima conductancia en aire ($\Delta f_{ANA} = f_{carga}(G_{max}) - f_{aire}(G_{max})$).
6. Se establece una relación entre la resistencia dinámica del cristal medida con el analizador y la tensión a la salida del controlador automático de ganancia.

7. Se representa el comportamiento de la fase de oscilación (fase de oscilación: corresponde al valor de la fase de la impedancia proporcionada por el analizador a la frecuencia de oscilación del circuito [Borngräber et al. 2002]). La Figura 4.27 ayuda a ilustrar este procedimiento, donde ϕ_{osc} es la fase de oscilación a la frecuencia de oscilación f_{osc} , (la gráfica de magnitud y fase de la impedancia es proporcionada por el analizador).

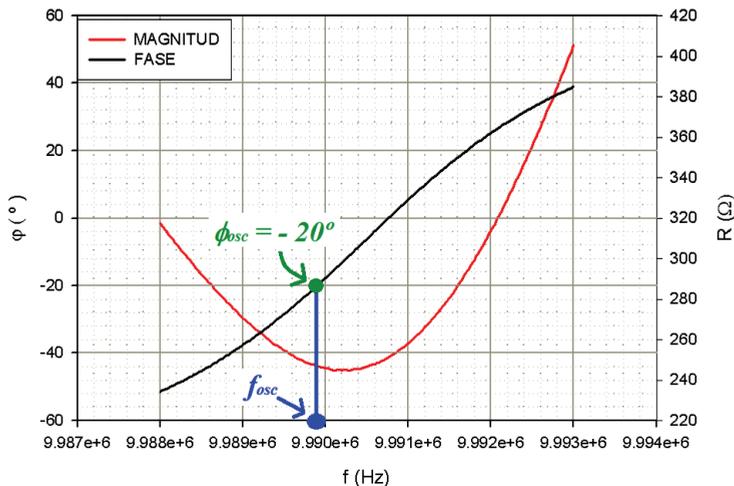


Figura 4.27: Figura que ilustra el procedimiento para determinar el valor de la fase de oscilación.

Con el fin de estudiar el efecto que produce la rama de compensación y la variación de la capacidad de compensación (C_v) en la respuesta del circuito oscilador diseñado, se modificó el circuito de la siguiente manera:

- **Modificación 1 (sin rama de compensación):** Se eliminó la rama de compensación del circuito oscilador (se quitó la resistencia R_{o2} y se conectó a masa el pin 2 del CI AD835 en el circuito de la Figura 4.2). El diagrama de bloques de la configuración final es mostrada en la Figura 4.28.
- **Modificación 2 (sin capacidad de compensación):** Se eliminó la capacidad de compensación, pero se mantuvo la rama de compensación; para esto se eliminó el condensador C_v y se repuso la resistencia R_{o2} . El diagrama de bloques de la configuración es mostrado en la Figura 4.29.
- **Modificación 3 (variación de la capacidad C_v):** Se varió la capacidad de compensación con los siguientes valores de capacidad: $C_v=6,8\text{pF}$, $C_v=10\text{pF}$ y $C_v=15\text{pF}$. El sistema se configura igual que el de la Figura 4.1.

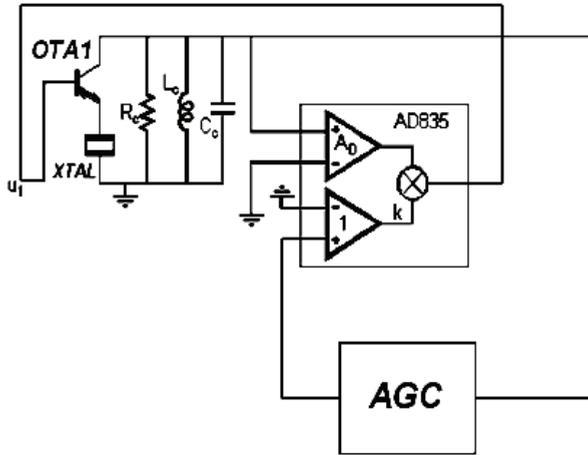


Figura 4.28: Configuración del sistema sin rama de compensación capacitiva

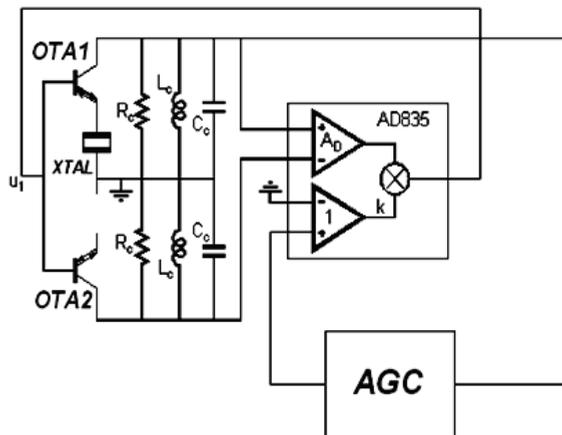


Figura 4.29: Esquema del sistema configurado sin capacidad de compensación C_v

Para cada caso, se realizaron pruebas siguiendo el protocolo expuesto anteriormente. Los efectos de la rama y la capacidad de compensación se observaron gráficamente.

4.5 Inmunoensayos.

El sistema diseñado se validó como inmunosensor piezoeléctrico para la detección del insecticida Carbaryl: en colaboración con el Grupo de Inmunotecnología del Instituto Interuniversitario de Investigación en Bioingeniería y Tecnologías Orientadas al Ser Humano (i3BH-UPV).

El pesticida Carbaryl, es un insecticida de amplio espectro perteneciente al grupo de los N-metilcarbamatos, que junto con los pertenecientes a la familia de los organofosforados inhiben la acción de la acetilcolinesterasa [Abad 1995]

Se obtuvieron curvas patrón de calibración, siguiendo los protocolos de trabajo y reactivos descritos por grupo de Inmunotecnología del i3BH-UPV [March et al. 2009e; Montoya et al. 2008].

4.5.1 Reactivos e Inmunoreactivos

La Albúmina de bovina (BSA) fracción V se obtuvo de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) y el Tween 20 de Fluka-Aldrich Chemie (Buchs, Suecia). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

4.5.1.1 Reactivos para la Inmovilización Covalente.

El 1-Ethyl-3-(3 dimethyl-amino-propyl)carbodiimide clorhidrato (EDC) y N-hydroxysuccinimide (NHS) fueron suministrados por Pierce (Rockford, IL); el ácido tióctico (TA) fue adquirido de Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania) y el agente bloqueante etanolamina, se obtuvo de Sigma (St. Louis, Mo).

4.5.1.2 Inmunoreactivos

Los inmunoreactivos usados en los inmunoensayos: el anticuerpo monoclonal (MAb): LiB CNH45 y el conjugado de hapteno: BSA CNH los produjo el grupo de Inmunotecnología como lo describe [Abad et al. 1997].

4.5.1.3 Estándares de Carbaryl

El plaguicida Carbaryl se compro al Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).

4.5.1.4 Tampones

- PBS: Solución tampón de 10mM de fosfato, ph 7,45 (tampón de trabajo).
- PBST: Solución de PBS que contiene 0,005% de Tween 20.
- Fosfato de sodio 0.1M, ph 7,5.
- Borato de sodio 0.1M, ph 8,75

4.5.2 Inmovilización Covalente

El proceso de la formación de la SAM y posterior inmovilización con enlace covalente del conjugado de hapteno a la superficie de oro del cristal (formación de la capa sensible), se muestra en la Figura 4.30 y se describe en los siguientes pasos:

1. Limpieza y preparación: se sumergió el cristal de cuarzo en solución piraña (H_2SO_4 concentrado: 30% H_2O_2 , 3:1 v/v), durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó repetidas veces con agua bidestilada y etanol. Finalmente se seco con una corriente de gas nitrógeno.
2. Se sumergió el cristal en una solución etanólica al 0,2% de ácido tióctico, dejándose toda la noche en agitación suave. Después se lavó con etanol sucesivas veces.
3. Activación de los grupos carboxílicos: a continuación se sumergió en una solución etanólica de EDC/NHS (0,2/0,05M) durante cuatro horas. Posteriormente se lavó con etanol y se seco en una corriente de gas nitrógeno. En la reacción, el EDC convierte el ácido carboxílico del alkanethiol en un ester N-hydroxisuccinimida que posteriormente reaccionará covalentemente con los grupos aminos del conjugado de hapteno.
4. Formación del enlace covalente: sobre una de las caras del cristal se depositó 60 μ l de BSA-CNH a una concentración de 10mg/ml en solución tampón de fosfato sódico 0,1M, ph 7,5; durante cuatro horas. Posteriormente se lavó con solución tampón de fosfato sódico.
5. Bloqueo: 60 μ l de 1M etanolamina en solución tampón de borato de sodio 0,1M, ph 8,75, se adicionaron y se dejaron incubar durante una hora; acto seguido se lavaron con solución tampón de borato de sodio. La función de la etanolamina es desactivar los ester-NHS que quedaron libres en la superficie del cristal.
6. Almacenamiento: Al finalizar todo el proceso, el cristal fue lavado con agua bidestilada y almacenado a 4 °C, para su posterior uso.

Todas las etapas del proceso se realizaron a temperatura ambiente.

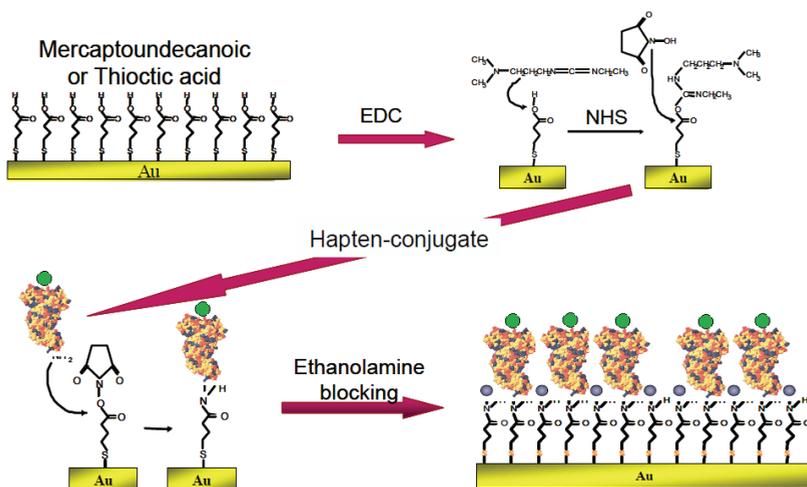


Figura 4.30: Proceso de inmovilización del conjugado de hapteno sobre el electrodo de oro del cristal. (Cortesía de la Dra. Laura Lechuga, IMM-CSIC, Madrid, España).

4.5.3 Formato de Ensayo

La detección del insecticida se realizó mediante ensayos competitivos analito–anticuerpo–conjugado de hapteno. Para la realización de los ensayos, una cantidad fija de anticuerpo monoclonal se mezcló con una solución patrón del analito y esta mezcla se hizo pasar sobre la superficie sensible del cristal. Como el analito inhibe el enlace conjugado de hapteno inmovilizado–anticuerpo, entonces una mayor concentración de analito se verá reflejada en una menor reducción de la frecuencia de resonancia del cristal.

Los patrones de Carbaryl se preparan mediante disoluciones seriadas en PBS a partir de una concentración *stock* inicial de 1mM en dimethylformamide almacenada en viales a -20 °C. Cada patrón se mezcló con una solución de concentración fija de 15,6 µg/ml del anticuerpo LIB-CNH45 en PBS. La mezcla analito – anticuerpo se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se hizo pasar sobre la superficie sensible del cristal. La frecuencia de resonancia y la resistencia dinámica del cristal se monitorizaron en tiempo real mientras ocurrió el enlace entre el conjugado de hapteno inmovilizado y el anticuerpo libre (que no se unió al analito) de la disolución.

La capa sensible del cristal se regenera con una solución de HCl al 0,1M, que rompe los enlaces conjugado de hapteno – anticuerpo.

4.5.4 Protocolo de Ensayo.

1. Se pasa un flujo de PBST durante 1,5 minutos a una velocidad de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, para estabilizar la línea de base.
2. Se inyecta 250 μl de muestra a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ y se deja pasar durante 12 minutos.
3. Regenerar con HCl al 0,1M durante 4 minutos a una velocidad de 280 $\mu\text{l}/\text{min}$ y posteriormente PBST a una velocidad de 280 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 2,5 minutos.

El ensayo se realizó a una temperatura de $25 \pm 0,1$ °C. El ciclo completo de ensayo “incluyendo regeneración” es de 20 minutos.

El cristal se lava con agua bidestilada, se seca al aire y se guarda a 4°C al finalizar el último ensayo.

4.5.5 Análisis de Datos

Las curvas patrón se obtuvieron representando la disminución de la frecuencia en función del logaritmo de la concentración del analito. Los puntos (cada punto de la curva se ensayó por duplicado) experimentales se ajustan a la ecuación logística de cuatro parámetros:

$$y = \frac{D + (A - D)}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad (3.16)$$

Donde:

A es la asíntota máxima (señal máxima en ausencia de analito, S_{max}), B es la pendiente de la curva en el punto de inflexión (relacionada con la concentración de analito que proporciona un 50% de disminución de la señal con respecto a S_{max} : C , I_{50}) y D es la asíntota mínima (señal mínima).

La curva patrón estándar se obtuvo al promediar tres curvas patrón individuales. Estas curvas se normalizaron, expresando el decremento de la

frecuencia correspondiente a cada patrón en porcentaje respecto a la señal máxima ($S_{max}=100\%$), en ausencia de analito.

4.6 Sistema de Flujo

El esquema del sistema de flujo utilizado para la realización de los inmunoensayos se muestra en la Figura 4.31.

Una bomba peristáltica se encarga de hacer fluir el líquido por el sistema a una velocidad de flujo controlada, mientras la válvula Rheodyne modelo 5011 (Supelco, Bellefonte, PA), selecciona la disolución tampón de trabajo (PBST) ó de regeneración (HCl), que fluirán en cada momento por el circuito de flujo. La válvula Rheodyne modelo 5020 (Supelco, Bellefonte, PA), permite a través de su *loop* de inyección de 250 μl , hacer pasar a la corriente principal del circuito de flujo la muestra que se vaya analizar. De esta forma, tendremos un flujo constante sobre la superficie activa del sensor.

4.7 Sistema de Termostatación

El sistema de termostatación, desarrollado por el Grupo de Fenómenos Ondulatorios de la Universidad Politécnica de Valencia (Línea Sistemas y Sensores Piezoeléctricos). Está basado en células peltier y controlado desde el ordenador mediante el puerto RS232. Permite mantener constante la temperatura en un rango de $\pm 0,1$ °C.

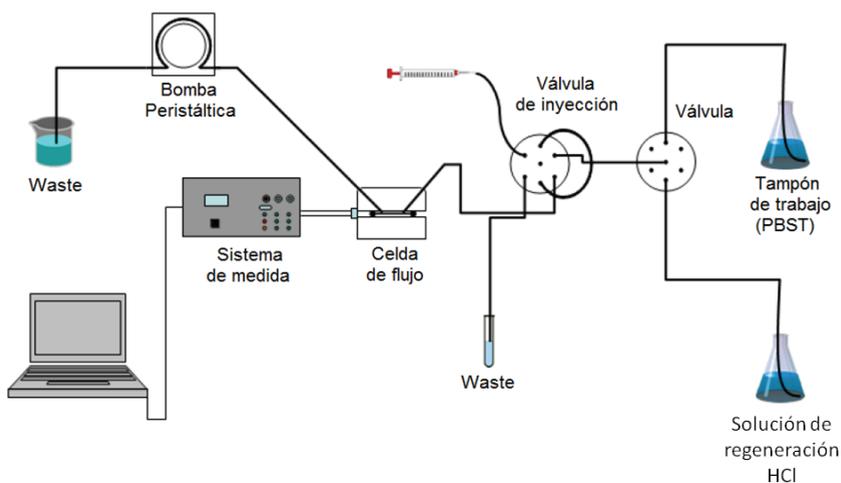


Figura 4.31: Esquema del sistema de flujo [Montoya et al. 2008].

4.8 Montaje Experimental

De acuerdo al tipo de ensayos realizados, se diseñaron dos montajes diferentes, el primero para los ensayos *in-batch* y el segundo para los ensayos en flujo.

4.8.1 Sistema Implementado de Caracterización *In-batch*.



Figura 4.32: Montaje *In-batch*

Para la realización de las pruebas *in-batch* se usó el montaje mostrado en la Figura 4.32. Consta de: fuente de alimentación, frecuencímetro, voltímetro y el sistema de caracterización diseñado, los datos son adquiridos a través del puerto GPIB. Con este montaje se buscaba observar el comportamiento del sistema oscilador. No se consideró necesario el uso de un control de temperatura. Además, era imprescindible tener fácil acceso a la celda para depositar la muestra y limpiar el cristal continuamente.

4.8.2 Sistema Completo Implementado

La Figura 4.33 muestra el sistema de caracterización completo, fue usado en los inmunoensayos y consta de: fuente de alimentación, sistema de termostatación, sistema de flúidica, bomba peristáltica y sistema de caracterización; la adquisición de datos se realizó a través de AW SENSE IP/AQ-1 y AW SENSE IP/AQ-1S (AWSensors). Este montaje permite tener controlada la temperatura de: la celda, el sistema de caracterización y las disoluciones de trabajo usados en el ensayo. Las válvulas son fácilmente accesibles desde el exterior y la inyección de la muestra se realiza desde el

exterior a través de un puerto con racor dispuesto para tal fin. Además una mesa anti vibración soporta el montaje.

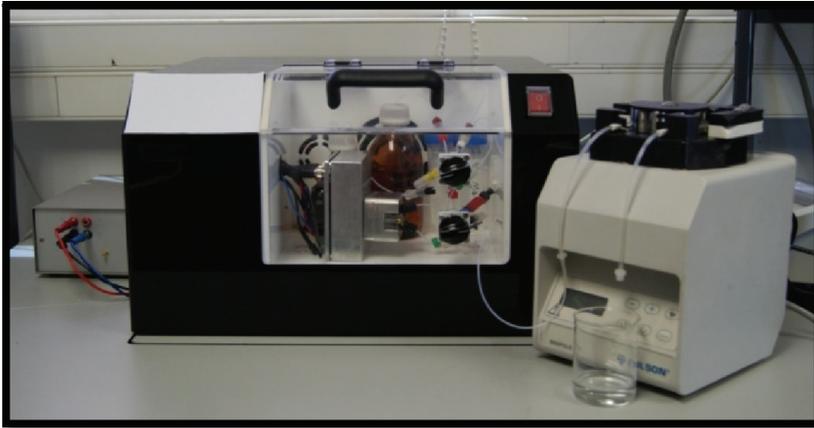


Figura 4.33: Montaje experimental del sistema.

5 RESULTADOS (OSCILADOR)

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos con el circuito oscilador diseñado, dividido en tres partes: la primera parte muestra la respuesta en frecuencia comparada con el analizador de impedancias, y la respuesta en fase obtenida con el analizador; también se establece la relación entre la tensión del control automático de ganancia y la resistencia dinámica del cristal ($R_m - V_{AGC}$) frente a los cambios de la densidad y viscosidad del medio en contacto con el sensor. La segunda parte corresponde al efecto que produce la rama de compensación de la capacidad y el valor de la misma sobre la respuesta en frecuencia, fase y la relación $R_m - V_{AGC}$ del circuito oscilador; y la tercera parte presentará los resultados de la aplicación del sistema oscilador como interfaz para un inmunosensor piezoeléctrico.

5.1 Respuesta del Circuito Oscilador.

5.1.1 Frecuencia de Oscilación

La Tabla 5.1 muestra los valores de la variación de la frecuencia medidos con el circuito oscilador ($\Delta f_{osc} = f_{carga} - f_{aire}$) y la diferencia de la frecuencia a la conductancia máxima medida con el analizador de impedancias

$(\Delta f_A = f_{carga}(G_{max}) - f_{aire}(G_{max}))$ para un variación de la densidad y la viscosidad del medio en contacto con el sensor.

La Figura 5.1 representa los datos de la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Frecuencia de oscilación.

Muestra	$\Delta f_{ANA}(\text{Hz})$	$\Delta f_{osc}(\text{Hz})$
Agua	-2301	-2992
Glicerol 5%	-2511	-3473
Glicerol 15%	-2835	-3991
Glicerol 25%	-3458	-4796
Glicerol 35%	-4786	-6508
Glicerol 45%	-6934	-9277

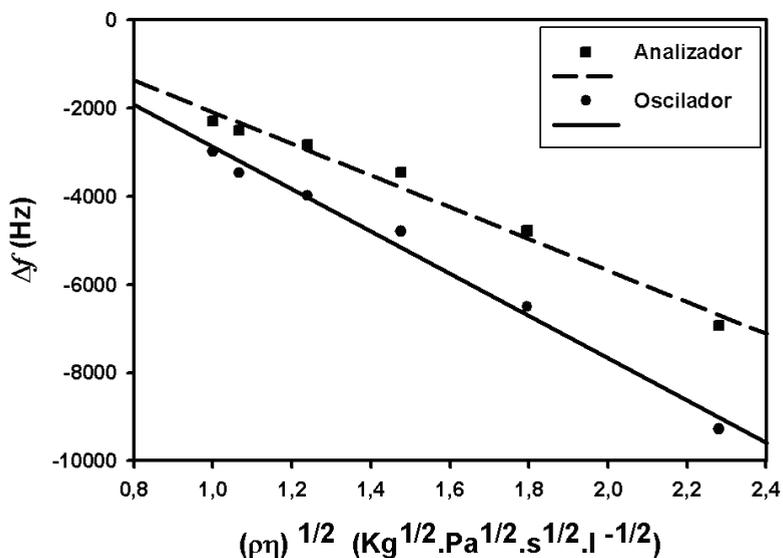


Figura 5.1: Concentración vs. Δf .

La gráfica (Figura 5.1) representa los valores de la diferencia de frecuencia, con respecto a los cambios de concentración, medidos con el oscilador y

comparados con los datos obtenidos por el analizador de impedancia. La diferencia entre las dos medidas se debe a que las frecuencias medidas por el analizador y el oscilador corresponden a fases de cristal diferentes. En efecto, la frecuencia de oscilación del circuito diseñado está gobernada por las condiciones de oscilación; por tanto, el circuito oscilará a la frecuencia en la cual se compensen todos los desfases del sistema y se cumpla la condición de fase para oscilación. Sin embargo, la frecuencia medida con el oscilador siempre corresponde a la frecuencia de máxima conductancia, muy cercana a la MSRF que para cada líquido corresponde a una fase diferente del sensor.

5.1.2 Resistencia Dinámica

La Tabla 5.2 contiene los valores de la resistencia dinámica del cristal medida con el analizador de impedancias y la tensión de salida del control automático de ganancia, para las diferentes muestras patrón.

La gráfica (Figura 5.2) muestra la relación entre la tensión (V_{AGC}) del control automático de ganancia del oscilador y la resistencia dinámica del cristal medida con el analizador.

Se puede observar que la tensión V_{AGC} ofrece una respuesta lineal al cambio de la resistencia dinámica del cristal. Al ser lineal se puede establecer una relación directa entre la tensión V_{AGC} y la R_m mediante la ecuación de la recta de regresión, que se define como:

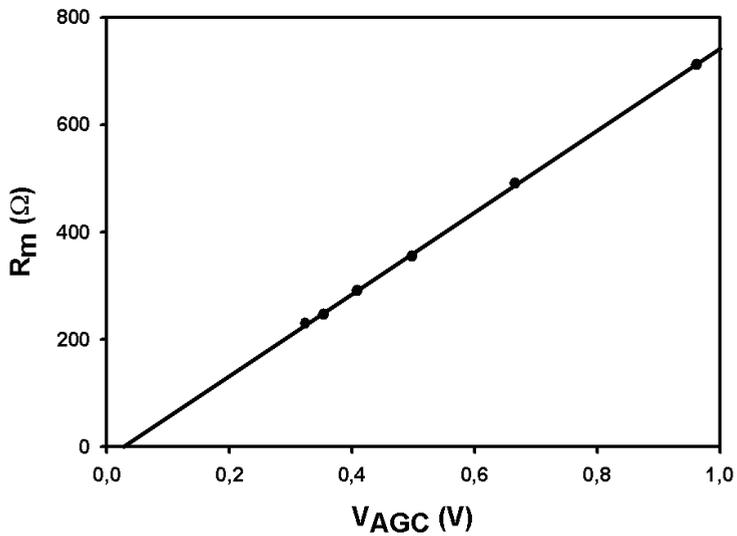
$$R_m = 762,5V_{AGC} - 21,46 \quad (3.17)$$

La ecuación devuelve el valor de R_m a partir de la tensión de salida del control automático de ganancia.

La resistencia dinámica del cristal es uno de los parámetros a medir, para garantizar que se trabaja en régimen gravimétrico, cuando los cristales de cuarzo se usan como biosensores.

Tabla 5.2: Resistencia dinámica y tensión AGC

Muestra	R_m (Ω)	V_{AGC} (V)
Agua	229,30	0,324
Glicerol 5%	245,86	0,354
Glicerol 15%	289,90	0,409
Glicerol 25%	354,59	0,498
Glicerol 35%	490,27	0,666
Glicerol 45%	711,10	0,962

Figura 5.2: V_{AGC} vs. R_m

5.1.3 Fase de Oscilación

La Tabla 5.3 contiene los valores de la fase de oscilación del cristal para las diferentes concentraciones de glicerol.

La Figura 5.3 representa la fase de oscilación del cristal. Estos valores de fase fueron obtenidos a partir de los datos registrados por el analizador para cada una de las muestras a la frecuencia de oscilación del cristal en cada caso, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Para cada una de las muestras el cristal asume un valor de fase de oscilación diferente. La fase de oscilación está alejada de la fase cero del cristal, en todo caso, convendría que estuviera lo más cercana posible a la fase correspondiente a la MSRF.

Tabla 5.3: Fase de oscilación del cristal.

Muestra	Fase (φ (°))
Agua	-28,15
Glicerol 15%	-31,51
Glicerol 25%	-32,41
Glicerol 35%	-33,22
Glicerol 45%	-37,22

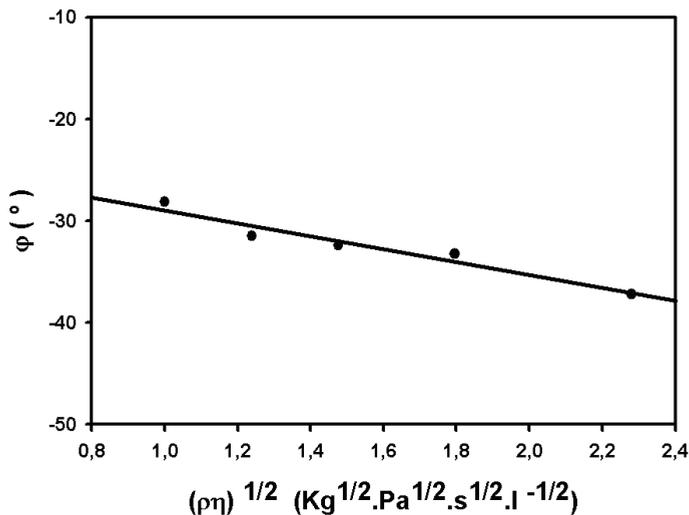


Figura 5.3: Concentración vs. Fase de oscilación del cristal.

5.2 Efectos de la Rama y la Capacidad de Compensación (C_V)

Los efectos de la rama de compensación y de la capacidad, se estudiaron a través de la realización de los mismos ensayos anteriores cambiando la configuración del circuito oscilador y comparando los resultados obtenidos.

5.2.1 Efecto de la Rama de Compensación.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

La Tabla 5.4 muestra los valores de la diferencia de frecuencia medida con el oscilador y con el analizador de impedancias, cuando el sistema está configurado sin rama de compensación capacitiva.

La Tabla 5.5 muestra los valores de la resistencia dinámica y la tensión de salida del control automático de ganancia, para el caso del oscilador sin rama de compensación capacitiva.

La Tabla 5.6 contiene los datos de la fase de oscilación del cristal para el oscilador sin rama de compensación.

Tabla 5.4: Variación de la frecuencia de oscilación (sin rama de compensación)

Muestra	$\Delta f_{ANA}(\text{Hz})$	$\Delta f_{OSC}(\text{Hz})$
Agua	-2780	-3223
Glicerol 5%	-3035	-3409
Glicerol 15%	-3493	-3902
Glicerol 25%	-4276	-4386
Glicerol 35%	-5976	-5499
Glicerol 45%	-6965	-5652

Tabla 5.5: Resistencia dinámica y tensión AGC (sin rama de compensación)

Muestra	R_m (Ω)	V_{AGC} (V)
Agua	277,96	0,347
Glicerol 5%	308,41	0,380
Glicerol 15%	369,87	0,450
Glicerol 25%	443,72	0,525
Glicerol 35%	617,52	0,723
Glicerol 45%	722,46	0,863

Tabla 5.6: Fase de oscilación del cristal (sin rama de compensación)

Muestra	Fase (φ ($^\circ$))
Agua	-21,37
Glicerol 5%	-18,5
Glicerol 15%	-18,1
Glicerol 25%	-16,04
Glicerol 35%	-12,4
Glicerol 45%	-9,95

Tabla 5.7 Valores de los elementos del circuito equivalente del cristal (sin rama de compensación)

Muestra	R_m (Ω)	L_m (mH)	C_m (fF)	C_0 (pF)
Agua	277,96	8,1283	31,329	7,46
Glicerol 5%	308,41	8,1139	31,387	7,4
Glicerol 15%	369,87	8,0781	31,529	7,4
Glicerol 25%	443,72	8,045	31,664	7,4
Glicerol 35%	617,52	8,1432	31,293	7,25
Glicerol 45%	722,46	8,0721	31,575	7,43

Además, se registraron los valores de los elementos del circuito equivalente del cristal de cuarzo de la Figura 1.2 (R_m , L_m , C_m y C_0) medidos con el analizador de impedancia, para cada una de las muestras. Los valores de los elementos obtenidos en este experimento son mostrados en la Tabla 5.7 anterior.

Los resultados gráficos se muestran en las siguientes figuras:

5.2.1.1 Efecto Sobre la Medida de la Frecuencia

La Figura 5.4 representa los datos de la Tabla 5.4. Para las concentraciones mayores, la diferencia de frecuencia medida con el oscilador es menor a la medida con el analizador, además existe una concentración para la cual la diferencia de frecuencia medida con cualquiera de los dos sistemas es la misma; para esta configuración del sistema de caracterización.

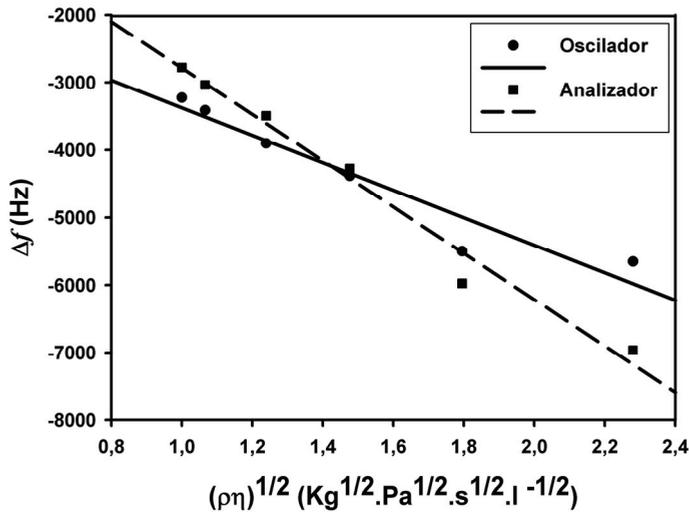


Figura 5.4: Concentración vs. Variación de la frecuencia de oscilación (sin rama de compensación)

5.2.1.2 Efecto Sobre la Medida de la Resistencia

La respuesta del control automático de ganancia es lineal con respecto a la resistencia dinámica del cristal, para esta configuración del sistema de caracterización. La tensión V_{AGC} representa el valor de la resistencia y la relación se puede establecer de acuerdo a la siguiente ecuación de la línea recta de regresión:

$$R_{m-c} = 870,1V_{AGC} - 20,15 \quad (3.18)$$

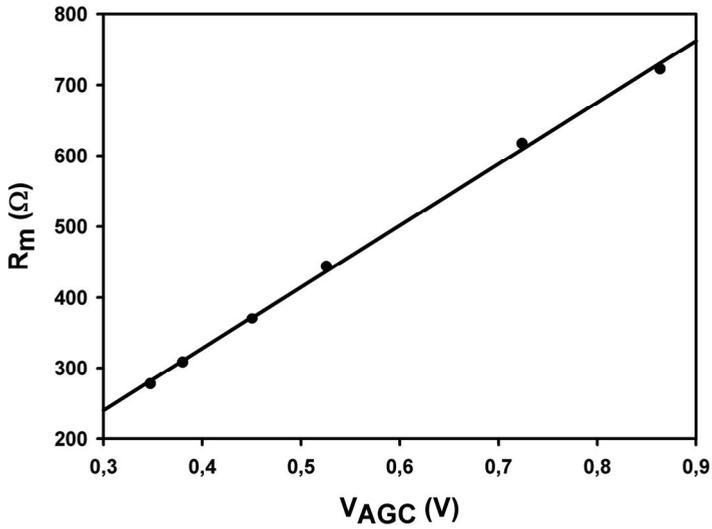


Figura 5.5: V_{AGC} vs. R_m (sin rama de compensación)

5.2.1.3 Efecto Sobre la Fase de Oscilación del Cristal.

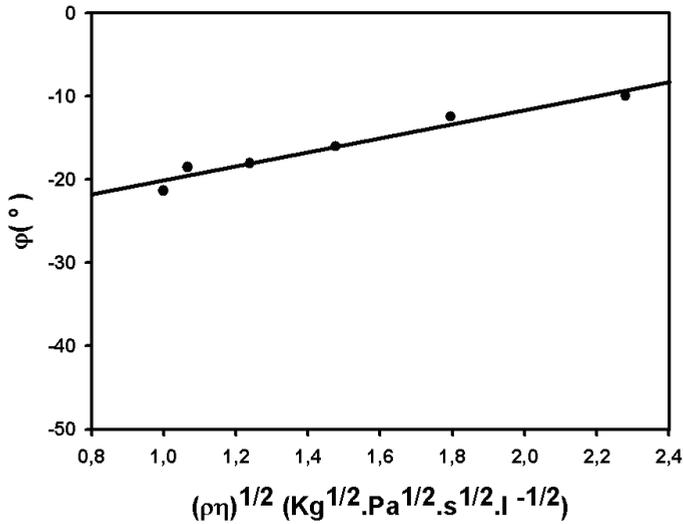


Figura 5.6: Concentración vs. Fase de oscilación del cristal (sin rama de compensación)

Los datos de la Tabla 5.6 son graficados en la Figura 5.6. Para esta configuración del oscilador la pendiente de la línea que une los puntos tiene signo positivo. Se presenta un menor desfase a medida que aumenta la densidad y la viscosidad del medio.

5.2.2 Efecto del Condensador C_V

Al realizar el montaje de la Figura 4.29, se obtienen los resultados presentados en las tablas que se relacionan a continuación:

La Tabla 5.8 presenta los valores de la diferencia de la frecuencia medidos con el analizador y con el oscilador.

La Tabla 5.9 muestra los valores de la resistencia dinámica del cristal y la tensión AGC.

La Tabla 5.10 muestra los valores de la fase de oscilación del cristal. La Tabla 5.11 contiene los valores de los elementos que forman el circuito equivalente del cristal.

Tabla 5.8: Variación de la frecuencia de oscilación (sin condensador C_V)

Muestra	$\Delta f_{ANA}(\text{Hz})$	$\Delta f_{osc}(\text{Hz})$
Agua	-2231	-2850
Glicerol 5%	-2647	-3178
Glicerol 15%	-3012	-3616
Glicerol 25%	-3766	-4096
Glicerol 35%	-5649	-5659
Glicerol 45%	-7423	-5921

Tabla 5.9: Resistencia dinámica y tensión AGC (sin condensador C_V)

Muestra	R_m (Ω)	V_{AGC} (V)
Agua	224,86	0,296
Glicerol 5%	249,81	0,322
Glicerol 15%	303,64	0,384
Glicerol 25%	375,1	0,447
Glicerol 35%	571,11	0,676
Glicerol 45%	765,53	0,943

Tabla 5.10: Fase de oscilación del cristal (sin condensador C_V)

Muestra	Fase (φ °)
Agua	-23,94
Glicerol 5%	-23,02
Glicerol 15%	-21,33
Glicerol 25%	-17,33
Glicerol 35%	-16,45
Glicerol 45%	-10,6

Tabla 5.11: Valor de los elementos del circuito equivalente del cristal (sin condensador C_V)

Muestra	R_m (Ω)	L_m (mH)	C_m (fF)	C_0 (pF)
Agua	224,86	8,1315	31,309	7,45
Glicerol 5%	249,81	8,0735	31,53	7,56
Glicerol 15%	303,64	8,1166	31,372	7,38
Glicerol 25%	375,1	8,0453	31,655	7,39
Glicerol 35%	571,11	8,0409	31,685	7,35
Glicerol 45%	765,53	8,0433	31,691	7,3

Las figuras a continuación realizan una representación grafica de los datos contenidos en las tablas anteriores:

5.2.2.1 Efecto Sobre la Medida de la Frecuencia

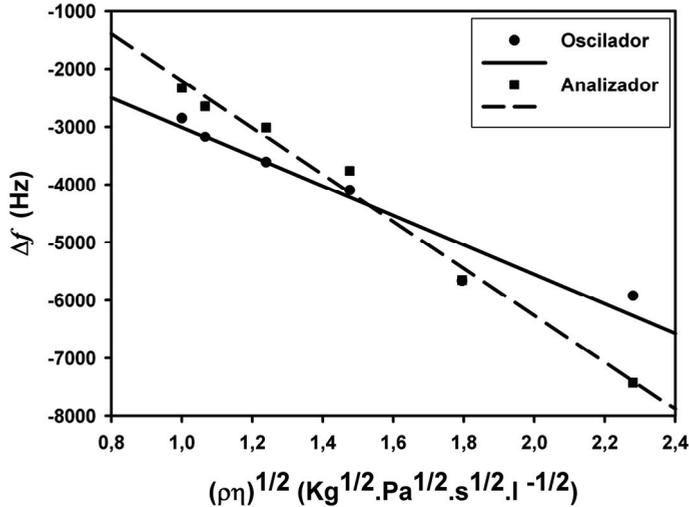


Figura 5.7: Concentración vs. Variación de la frecuencia de oscilación (sin condensador C_V)

La Figura 5.7 representa los datos de la Tabla 5.8. Aunque el oscilador intenta seguir los cambios de frecuencia de la misma manera que lo hace el analizador, para concentraciones mayores la diferencia de frecuencia medida con el oscilador es menor que la medida con el analizador de impedancias.

5.2.2.2 Efecto Sobre la Medida de la Resistencia Dinámica

La Figura 5.8 representa los datos de la Tabla 5.9. Para esta nueva configuración del oscilador, la relación entre la tensión AGC y la resistencia dinámica del cristal es lineal y se puede representar con la siguiente ecuación:

$$R_{m-o} = 841,7V_{AGC} - 15,37 \quad (3.19)$$

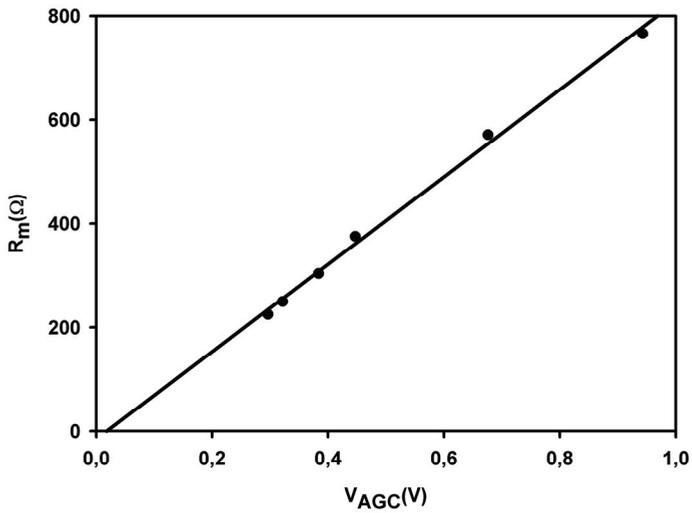


Figura 5.8: Tensión V_{AGC} vs. Resistencia dinámica del cristal (sin condensador C_V)

5.2.2.3 Efecto sobre la Fase de Oscilación

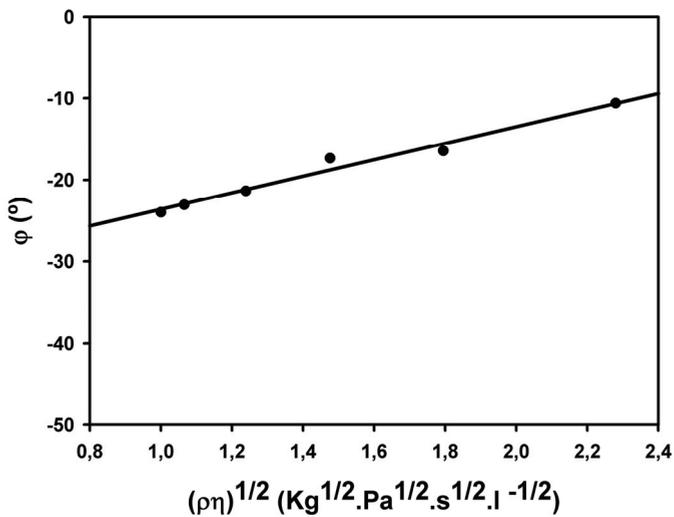


Figura 5.9: Concentración vs. Fase de oscilación (sin C_V)

La Figura 5.9 representa el comportamiento de la fase para la configuración establecida del oscilador. La recta que une los puntos de fase tiene una

pendiente positiva, para este caso la fase toma valores comprendidos entre -23° y -10° , siendo una fase menor para la mayor concentración.

5.2.3 Efectos de la Capacidad de Compensación $C_V=6,8\text{pF}$

Las tablas a continuación presentan los datos obtenidos al configurar el circuito de la Figura 4.1 con un condensador de $C_V = 6,8\text{pF}$.

La Tabla 5.12 contiene los valores medidos con el oscilador y el analizador de la diferencia de frecuencia para cada una de las muestras.

Los datos de la tensión del control del AGC y la resistencia dinámica del cristal se encuentran tabulados en la Tabla 5.13. La Tabla 5.14 muestra los valores de la fase de oscilación del cristal para las diferentes concentraciones.

Los valores de los elementos del modelo eléctrico del cristal de cuarzo, se pueden consultar en la Tabla 5.15.

Tabla 5.12: Variación de la frecuencia de oscilación ($C_V = 6,8\text{pF}$)

Muestra	$\Delta f_{ANA}(\text{Hz})$	$\Delta f_{osc}(\text{Hz})$
Agua	-2679	-3470
Glicerol 5%	-3029	-3881
Glicerol 15%	-3406	-4408
Glicerol 25%	-4255	-5331
Glicerol 35%	-6216	-7437
Glicerol 45%	-7323	-8563

Tabla 5.13: Resistencia dinámica y tensión AGC ($C_V = 6,8\text{pF}$)

Muestra	$R_m (\Omega)$	$V_{AGC}(V)$
Agua	263,18	0,358
Glicerol 5%	292,98	0,394
Glicerol 15%	351,75	0,462
Glicerol 25%	426,73	0,549
Glicerol 35%	647,63	0,793
Glicerol 45%	743,61	0,913

Tabla 5.14: Fase de oscilación ($C_V = 6,8\text{p}$)

Muestra	Fase ($\varphi(^{\circ})$)
Agua	-27,76
Glicerol 5%	-27,77
Glicerol 15%	-27,59
Glicerol 25%	-28,04
Glicerol 35%	-28,2
Glicerol 45%	-28,88

Tabla 5.15: Valor de los elementos del modelo eléctrico del cristal ($C_V = 6,8\text{pF}$)

Muestra	$R_m (\Omega)$	$L_m (\text{mH})$	$C_m (\text{fF})$	$C_0 (\text{pF})$
Agua	263,18	8,1254	31,338	7,49
Glicerol 5%	292,98	8,1197	31,362	7,4
Glicerol 15%	351,75	8,0836	31,505	7,36
Glicerol 25%	426,73	7,988	31,88	7,41
Glicerol 35%	647,63	8,0377	31,7	7,35
Glicerol 45%	743,61	8,1471	31,285	7,14

5.2.3.1 Efecto Sobre la Medida de la Frecuencia

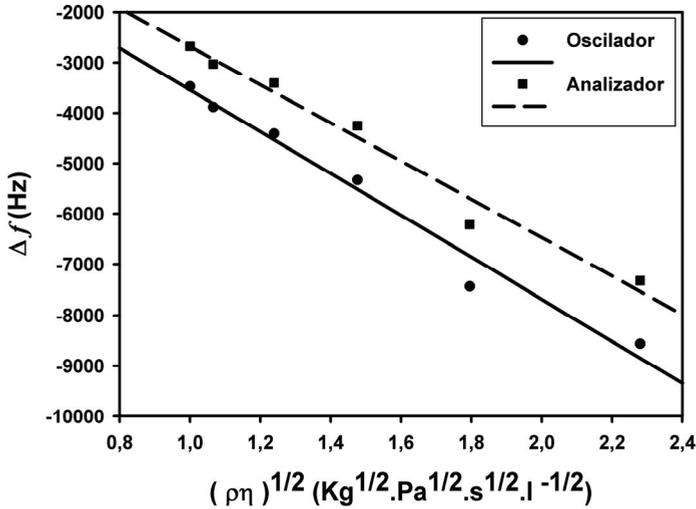


Figura 5.10: Concentración vs. Variación de la frecuencia de oscilación ($C_V=6,8\text{pF}$)

La Figura 5.10 representa los datos de la Tabla 5.12. Cuando la capacidad de compensación tiene un valor de $C_V = 6,8\text{pF}$ la diferencia de frecuencia medida con el oscilador tiene un comportamiento casi paralelo con respecto a la diferencia de frecuencia medida con el analizador. Ese comportamiento paralelo se mantiene a través de las concentraciones estudiadas.

5.2.3.2 Efecto Sobre la Medida de la Resistencia.

La Figura 5.11 representa los valores de la Tabla 5.13. La tensión de salida del control automático de la ganancia tiene un comportamiento lineal con respecto a la resistencia dinámica del cristal. La tensión V_{AGC} puede servir como medida de la R_m , si las relacionamos con la siguiente ecuación.

$$R_{m-68} = 874,14V_{AGC} - 51,09 \quad (3.20)$$

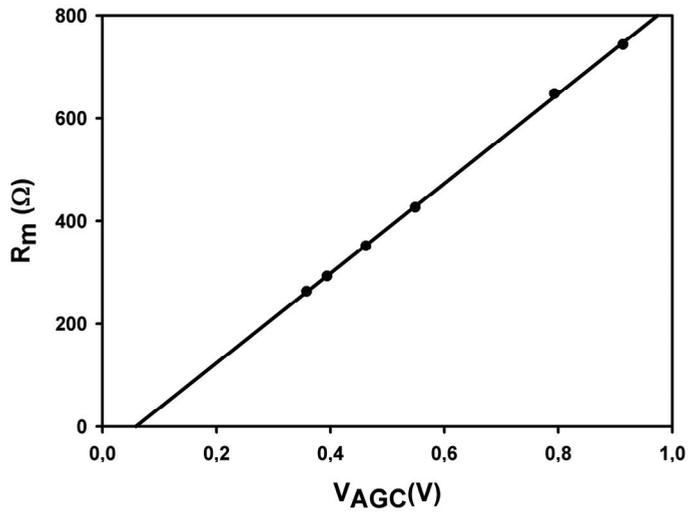


Figura 5.11: Tensión V_{AGC} vs. Resistencia dinámica ($C_V = 6,8\text{pF}$)

5.2.3.3 Efecto Sobre la Fase de Oscilación

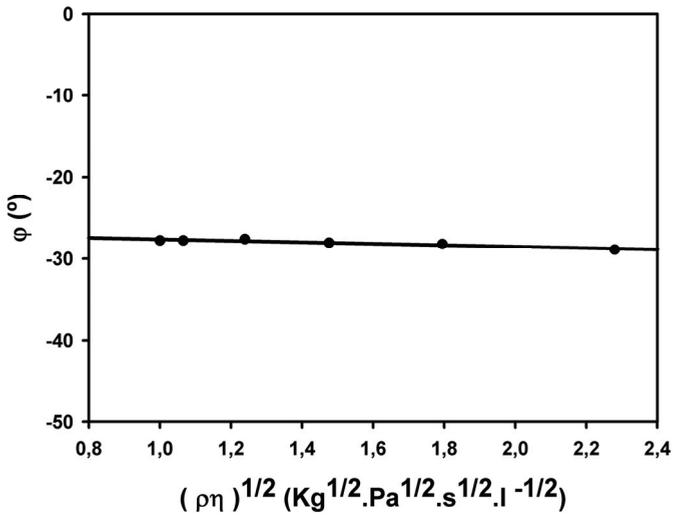


Figura 5.12: Concentración vs. Fase de oscilación ($C_V = 6,8\text{pF}$)

La Figura 5.12 es una representación grafica de los datos de la Tabla 5.14. Para un valor de capacidad $C_V=6,8\text{pF}$ la fase de oscilación del cristal se mantiene prácticamente constante. Para esta configuración del circuito, el cristal oscila a una fase estable aproximada de -28° para todo rango de densidad y viscosidad donde el cristal pueda mantener la oscilación.

5.2.4 Efecto de la Capacidad de Compensación $C_V = 10\text{pF}$

Las tablas a continuación registran los resultados obtenidos al hacer $C_V=10\text{pF}$.

La Tabla 5.16 contiene los datos de la variación de la frecuencia medidos con el analizador y el oscilador frente a los cambios de densidad y viscosidad del medio en contacto. La Tabla 5.17 registra los datos de la resistencia dinámica y la tensión AGC.

La variación de fase es registrada en la Tabla 5.18.

La Tabla 5.19 muestra los valores de los elementos del modelo eléctrico del cristal.

Tabla 5.16: Variación de la frecuencia de oscilación ($C_V = 10\text{pF}$)

Muestra	$\Delta f_{ANA}(\text{Hz})$	$\Delta f_{osc}(\text{Hz})$
Agua	-2480	-3490
Glicerol 5%	-2892	-3973
Glicerol 15%	-3464	-4715
Glicerol 25%	-4141	-5614
Glicerol 35%	-6490	-8448
Glicerol 45%	-7490	-9691

Tabla 5.17: Resistencia dinámica y tensión AGC ($C_V=10\text{pF}$)

Muestra	R_m (Ω)	V_{AGC} (V)
Agua	256,46	0,360
Glicerol 5%	290,15	0,405
Glicerol 15%	351,27	0,483
Glicerol 25%	424,53	0,575
Glicerol 35%	652,41	0,859
Glicerol 45%	765,15	0,999

Tabla 5.18: Fase de Oscilación ($C_V = 10\text{pF}$)

Muestra	Fase (φ ($^\circ$))
Agua	-31,55
Glicerol 5%	-30,67
Glicerol 15%	-31,14
Glicerol 25%	-31,78
Glicerol 35%	-35,04
Glicerol 45%	-36,27

Tabla 5.19: Valores de los elementos del modelo eléctrico del cristal ($C_V = 10\text{pF}$)

Muestra	R_m (Ω)	L_m (mH)	C_m (fF)	C_0 (pF)
Agua	256,46	8,1533	31,229	7,4
Glicerol 5%	290,15	8,1248	31,342	7,41
Glicerol 15%	351,27	8,0678	31,566	7,44
Glicerol 25%	424,53	8,0282	31,727	7,38
Glicerol 35%	652,41	7,9986	31,86	7,77
Glicerol 45%	765,15	8,0264	31,756	7,38

5.2.4.1 Efecto Sobre la Frecuencia de Oscilación

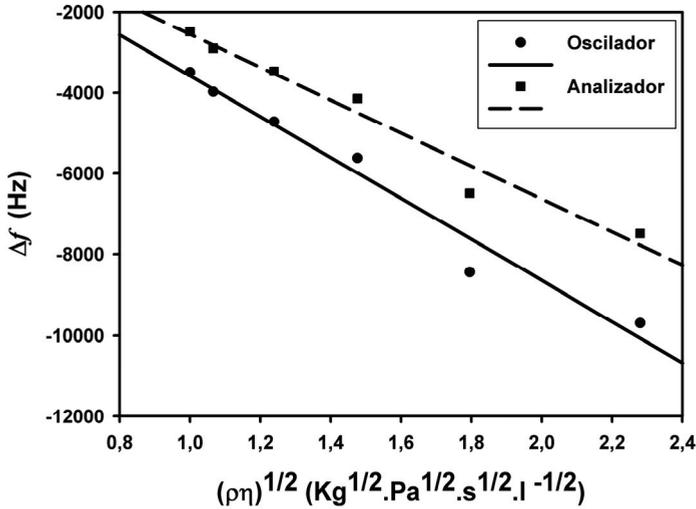


Figura 5.13: Concentración vs. Variación de la frecuencia de oscilación ($C_V=10\text{pF}$)

La Figura 5.13 grafica los datos de la Tabla 5.16. La medida de la variación de frecuencia realizada con el circuito oscilador tiene el mismo comportamiento que la diferencia de frecuencia medida con el analizador. Pero al aumentar la densidad y la viscosidad, es mayor la diferencia de frecuencia registrada con el oscilador que la registrada con el analizador, haciendo que las rectas que muestran la tendencia de la diferencia de la frecuencia pierdan el paralelismo y diverjan en su extremo.

5.2.4.2 Efecto Sobre la medida de la Resistencia Dinámica

El comportamiento lineal de la tensión AGC con respecto a la resistencia dinámica del cristal se muestra en la Figura 5.14 y permite que la señal V_{AGC} pueda ser usada como medida de la R_m mediante la siguiente relación:

$$R_{m-10} = 798V_{AGC} - 32,92 \quad (3.21)$$

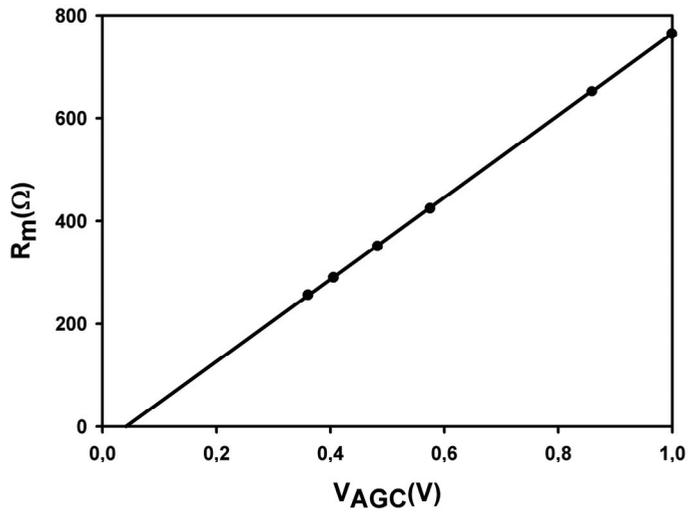


Figura 5.14: Tensión AGC vs. Resistencia dinámica ($C_V = 10\text{pF}$)

5.2.4.3 Efecto Sobre la Fase de Oscilación

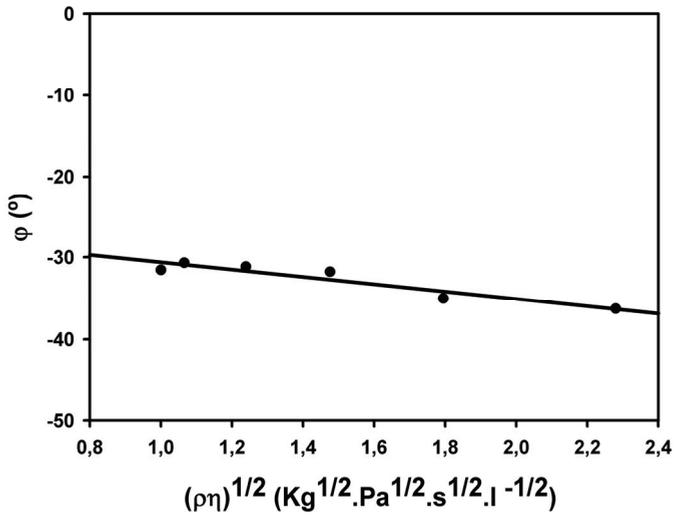


Figura 5.15: Concentración vs. Fase de oscilación ($C_V = 10\text{pF}$)

La Figura 5.15 representa los datos de la Tabla 5.18. Para un condensador $C_V = 10\text{pF}$, el comportamiento del circuito tiende a aumentar el desfase a medida

que se aumenta la concentración de glicerol en contacto con el sensor. La gráfica muestra que la fase presenta una pendiente ligeramente negativa.

5.2.5 Efecto de la Capacidad de Compensación $C_V=15\text{pF}$

Los efectos de la capacidad $C_V=15\text{pF}$, se pueden consultar en las tablas que aparecen a continuación:

Tabla 5.20: Variación de la frecuencia de oscilación ($C_V = 15\text{pF}$)

Muestra	$\Delta f_{ANA}(\text{Hz})$	$\Delta f_{osc}(\text{Hz})$
Agua	-2532	-3510
Glicerol 5%	-2848	-4159
Glicerol 15%	-3373	-5005
Glicerol 25%	-3953	-5987
Glicerol 35%	-5891	-9251
Glicerol 45%	-7093	-11071

Tabla 5.21: Resistencia dinámica del cristal y tensión AGC ($C_V = 15\text{pF}$)

Muestra	$R_m (\Omega)$	$V_{AGC}(\text{V})$
Agua	245,96	0,375
Glicerol 5%	275,71	0,426
Glicerol 15%	330,5	0,506
Glicerol 25%	401,27	0,615
Glicerol 35%	608,52	0,959
Glicerol 45%	731,46	1,121

Tabla 5.22: Fase de oscilación ($C_v = 15p$)

Muestra	Fase ($\varphi(^{\circ})$)
Agua	-33,37
Glicerol 5%	-36,41
Glicerol 15%	-36,98
Glicerol 25%	-38,77
Glicerol 35%	-44,05
Glicerol 45%	-45,55

Tabla 5.23: Valores de los elementos del modelo eléctrico del cristal ($C_v = 15pF$)

Muestra	R_m (Ω)	L_m (mH)	C_m (fF)	C_0 (pF)
Agua	245,96	8,2014	31,045	7,4
Glicerol 5%	275,71	8,195	31,068	7,34
Glicerol 15%	330,5	8,0698	31,557	7,37
Glicerol 25%	401,27	8,0806	31,518	7,35
Glicerol 35%	608,52	8,0341	31,714	7,32
Glicerol 45%	731,46	7,9879	31,904	7,46

5.2.5.1 Efecto Sobre la Frecuencia de Oscilación

La Figura 5.16 muestra el comportamiento de la frecuencia; se puede observar que, aunque el oscilador sigue la misma tendencia que el analizador, a valores mayores de concentración la diferencia de frecuencia medida con el oscilador tiende a divergir de la diferencia de frecuencia medida con el analizador.

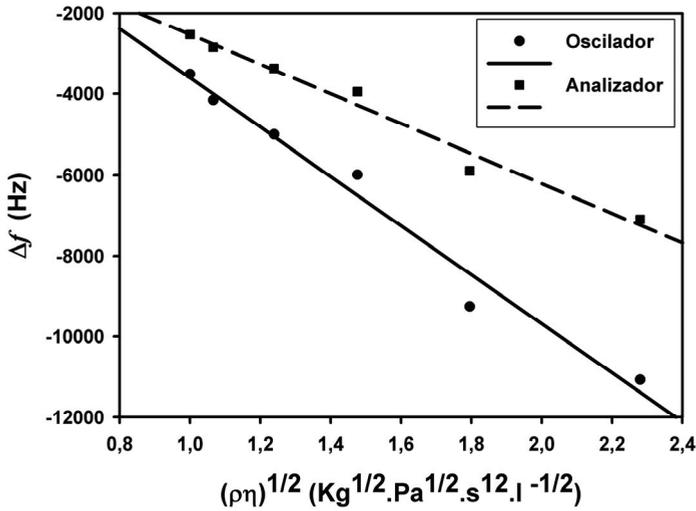


Figura 5.16: Concentración vs. Variación de la frecuencia de oscilación ($C_V = 15\text{pF}$)

5.2.5.2 Efecto Sobre la Medida de la Resistencia Dinámica

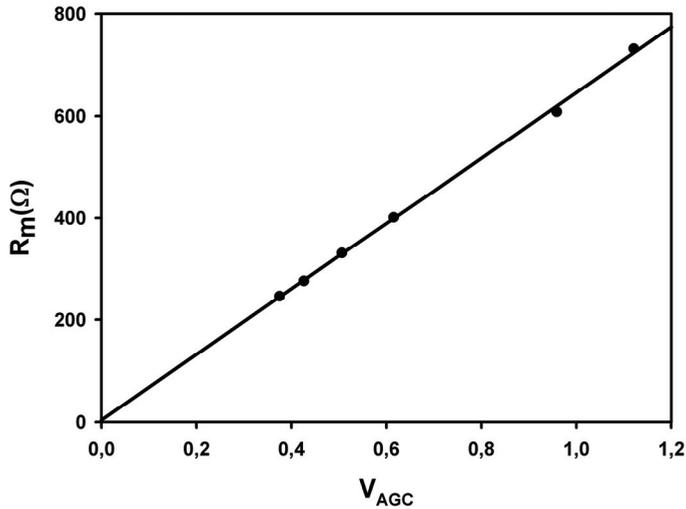


Figura 5.17: Tensión AGC vs. Resistencia dinámica del cristal ($C_V = 15\text{pF}$)

La Figura 5.17 representa la linealidad de la tensión de salida del control automático de ganancia con respecto a la resistencia dinámica del cristal. A

través del valor de la tensión AGC se puede medir la R_m , mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$R_{m-15} = 641,9V_{AGC} + 4,085 \quad (3.22)$$

5.2.5.3 Efecto Sobre la Fase de Oscilación

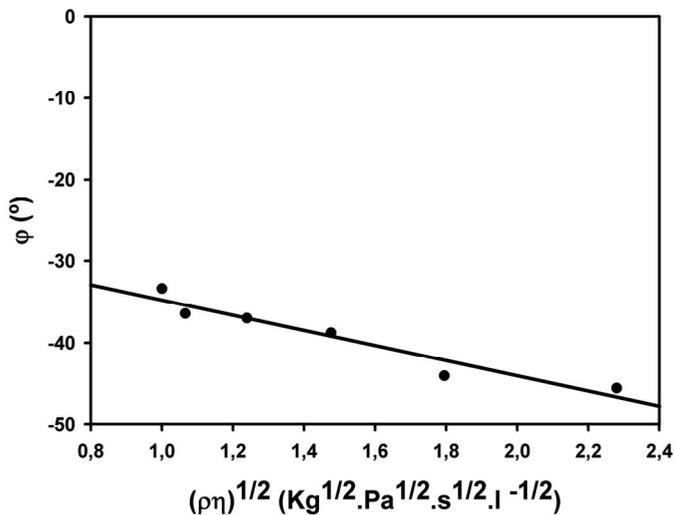


Figura 5.18: Concentración vs. Fase de oscilación ($C_V = 15\text{pF}$)

La Figura 5.18 representa la fase de oscilación, como se puede observar la fase aumenta negativamente al aumentar la densidad y la viscosidad del líquido en contacto con el cristal. La recta que representa el comportamiento del cristal tiene una pendiente negativa.

A continuación se establecerá una comparación gráfica de los datos obtenidos, donde se observará el efecto que produce la rama de compensación y la capacidad de compensación C_V sobre la fase y la frecuencia de oscilación del cristal, así como la relación que existe entre la fase y la frecuencia de oscilación; finalmente se seleccionará una configuración de trabajo, de acuerdo a los resultados obtenidos.

Los efectos de la rama y la capacidad de compensación C_V sobre la resistencia dinámica del cristal no es necesario analizarlos, pues los cambios no son significativos. Además, para cada configuración de trabajo se determinó la

ecuación que relaciona V_{AGC} con R_m ; por tanto, a cada configuración le corresponde una ecuación determinada para hallar el valor de R_m .

5.2.6 Frecuencia de Oscilación

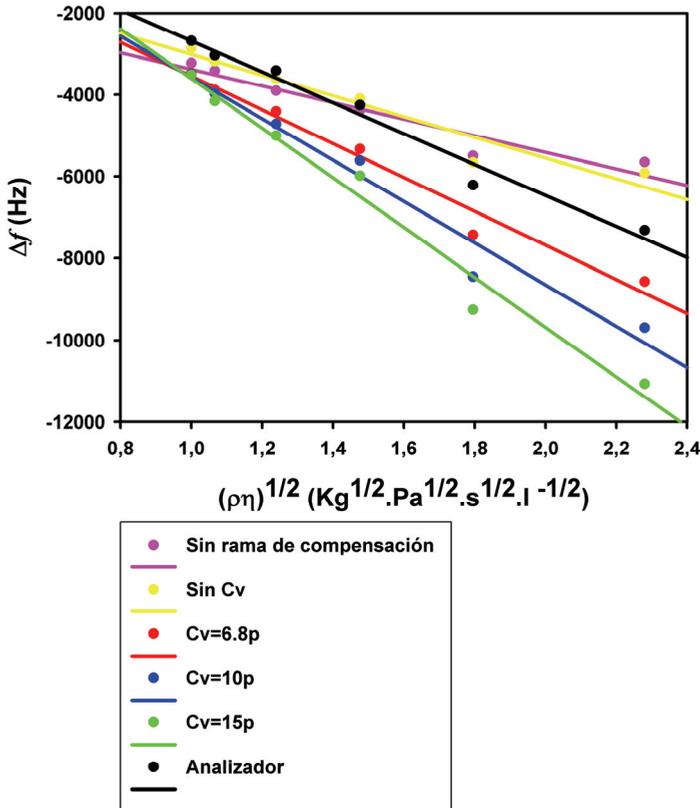


Figura 5.19: Δf vs $(\rho\eta)^{1/2}$ (comparación de resultados)

La Figura 5.19 muestra los resultados generales y la comparación de los mismos. Los efectos de la rama y la capacidad de compensación C_v se observan en la tendencia que toma la medida de la frecuencia de oscilación. Lo ideal sería que el comportamiento del sistema diseñado fuese lo más parecido al comportamiento del sistema de referencia (analizador de impedancias). En todas las configuraciones del circuito las variaciones de la frecuencia aumentan negativamente a medida que aumenta la densidad y la viscosidad de las soluciones patrón; por lo tanto, cualquiera de las configuraciones del oscilador estudiadas, puede ser usada como interfaz para la caracterización de sensores

piezoeléctricos; pero existe una configuración que es la más adecuada, por cuanto la respuesta del oscilador es casi paralela a la respuesta del analizador de impedancias. Gráficamente se puede observar el efecto que produce el valor de la capacidad C_V sobre la medida de la frecuencia, demostrando que existe un valor de capacidad para el cual la medida de la variación de la frecuencia realizada con el oscilador es más parecida (en cuanto a tendencia y comportamiento) a la medida realizada con el analizador de impedancia, ese valor de capacidad es $C_V=6,8\text{pF}$.

Si nos remitimos a las tablas del valor de los elementos del modelo eléctrico del cristal (Tabla 5.7, Tabla 5.11, Tabla 5.15, Tabla 5.19 y Tabla 5.23) y consultamos el valor de C_0 , observamos que el valor aproximado de la capacidad paralela del cristal en todos los casos es $C_0=7\text{pF}$ y que además, la capacidad $C_V=6,8\text{pF}$, es, casualmente, el valor más próximo a C_0 , de los condensadores estudiados. Por lo tanto, se puede llegar a pensar que el comportamiento de la frecuencia de oscilación es debido al efecto de compensar la capacidad paralela del cristal.

5.2.7 Fase de Oscilación

La Figura 5.20 muestra en una misma gráfica los valores de la fase de oscilación obtenidos en cada caso. Se pueden observar dos grupos de rectas de regresión de fase, los que corresponden a la configuración del circuito sin rama y sin capacidad de compensación y las rectas que corresponden al sistema con capacidad compensada. La pendiente de las rectas de regresión caracteriza cada uno de estos grupos, donde la pendiente de las rectas de fase sin compensación capacitiva es positiva y la pendiente de las rectas con capacidad compensadas es negativa, pasando por una pendiente cero. En el caso de compensar la capacidad paralela, el comportamiento de la fase de oscilación depende del valor del condensador C_V . Para un condensador $C_V=6,8\text{ pF}$, la pendiente de la recta de regresión de fase es muy cercana a cero, mientras que para un condensador $C_V=15\text{ pF}$, la pendiente de la recta de regresión de fase es mayor y de signo negativo. La fase de oscilación modifica la respuesta del sistema oscilador y por ende la medida de la frecuencia, para un condensador $C_V=6,8\text{ pF}$ la fase de oscilación es casi constante y la respuesta en frecuencia es casi paralela a la registrada con el analizador, para el caso de $C_V=10\text{ pF}$ o $C_V=15\text{ pF}$, la pendiente de la recta de regresión de la fase en estos casos es menor que cero y la frecuencia de oscilación se dispersan de la referencia a medida que se aumenta la densidad y la viscosidad.

El valor de la capacidad C_0 se encuentra registrado en las tablas de los valores de los elementos del modelo eléctrico del cristal (Tabla 5.7, Tabla 5.11, Tabla 5.15, Tabla 5.19 y Tabla 5.23), el valor más común de capacidad paralela

es $C_0 = 7$ pF, para este caso. La fase de oscilación se mantiene constante cuando, la capacidad C_V es más parecida a la capacidad C_0 ($C_V = 6,8$ pF y $C_0 = 7$ pF).

Por tanto, de los resultados anteriores se puede decir que existe un valor de capacidad C_V , para el cual la fase de oscilación del cristal es constante a la variación de la densidad y la viscosidad del líquido en contacto con el sensor; además, cuando la fase es constante, las variaciones de la frecuencia de oscilación medida con el circuito oscilador, es paralela a la diferencia de frecuencia de resonancia medida con el analizador de impedancias y además, ocurre cuando el valor de C_V es más cercano a C_0 (compensación de la capacidad), que no es lógico.

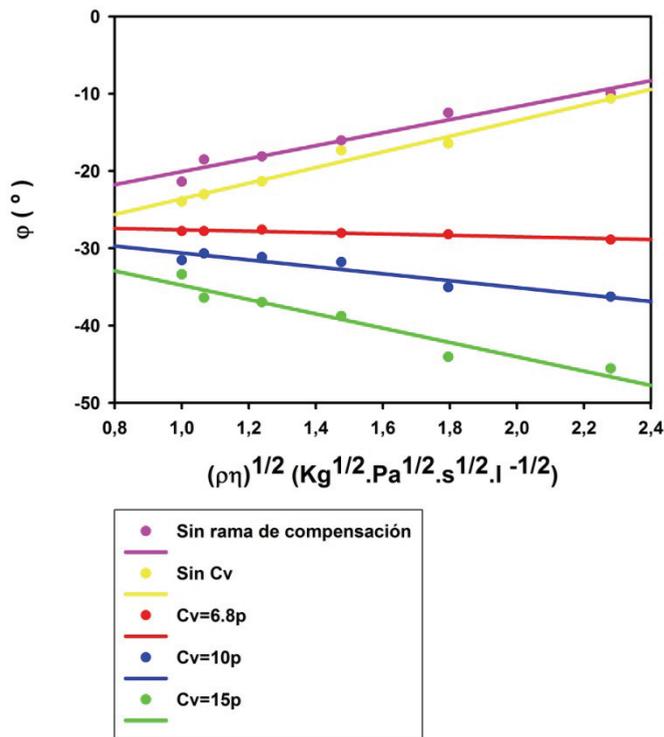


Figura 5.20: Concentración vs. Fase de oscilación (comparación de resultados)

Este resultado lleva a plantearnos las siguientes cuestiones:

- Si la capacidad de compensación C_V estuviese realmente compensando la capacidad paralela del cristal, la frecuencia de oscilación no solo

debería ser paralela, sino que además, debería estar más próxima a la MSRF medida con el analizador.

- Si la capacidad estuviese compensada, la fase de oscilación no debería ser constante, sino que debería ir cambiando, para ajustarse a la fase de máxima conductancia para cada una de las concentraciones.

De acuerdo con los resultados, se ha elegido la configuración del sistema propuesto en la Figura 4.1 con una capacidad de compensación $C_v=6.8\text{pF}$ como sistema de caracterización basado en osciladores para los inmunoensayos desarrollados, ya que es la configuración que mejores características ofrece.

5.3 Inmunosensor Piezoeléctrico

El sistema oscilador ha sido usado como interfaz para la detección del insecticida Carbaryl, mediante un inmunoensayos competitivo.

Los ensayos se realizaron conforme al protocolo de trabajo (definido en el apartado 4.5 Inmunoensayos.).

En cada una de las graficas de resultados del inmunosensor, f_0 corresponde a la frecuencia inicial y f_s a la frecuencia final.

5.3.1 Optimización del Ensayo

Se determinaron experimentalmente los siguientes parámetros: forma y valor de la señal, velocidades de flujo, tiempo máximo de interacción bioquímica y tiempo máximo del ciclo de medida.

5.3.1.1 Velocidad de Flujo

La velocidad de flujo es un factor importante a determinar, ya que el nivel de la señal está relacionado con el tiempo que interactúa la muestra con el cristal; de esta manera la velocidad de flujo es inversamente proporcional al nivel de la señal. Al mismo tiempo la velocidad de flujo condiciona la duración del ensayo; una velocidad de flujo muy pequeña proporciona una mayor señal, pero el ensayo tardará demasiado tiempo y por lo tanto, no será operativo. La velocidad de flujo seleccionada debe ser aquella que permita la máxima señal en un tiempo razonablemente corto de interacción bioquímica.

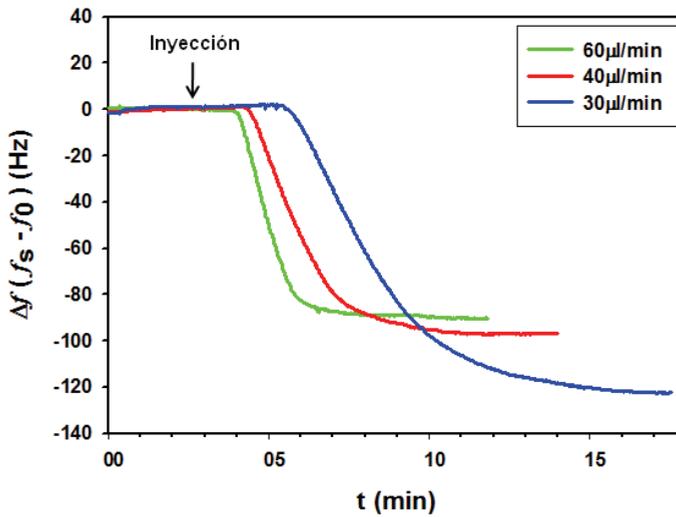


Figura 5.21: Respuesta del sistema en función de la velocidad de flujo.

En la Figura 5.21, se muestra la respuesta del inmunosensor respecto a la velocidad de flujo. Se seleccionó la velocidad de 30 μl/min como velocidad de trabajo, debido a que es la velocidad de flujo que mayor respuesta ofrece en un tiempo razonable corto de ensayo. El tiempo de respuesta se sitúa en 12 minutos desde la inyección, aunque la señal a este tiempo no ha terminado de estabilizarse del todo, está muy cerca de hacerlo; la diferencia de frecuencia entre el valor tomado a los 12 minutos y la señal estable totalmente es muy poco significativa. De acuerdo con lo anterior, conviene más en términos de amplitud de la señal, trabajar a 30 μl/min durante 12 minutos y perder una parte muy pequeña de la señal, que trabajar a 40 μl/min y medir cuando la señal es estable.

5.3.1.2 Señal Máxima

La señal máxima, o respuesta máxima, es el mayor decremento de frecuencia que se obtiene al inyectar únicamente anticuerpo (en ausencia de carbaryl), por tanto éste sólo se unirá con el conjugado de hapteno inmoviliado previamente sobre la superficie del cristal.

La Figura 5.22, muestra la variación de frecuencia (135 Hz) del inmunosensor al inyectar 250 μl de anticuerpo a una concentración de 15,625 μg/ml y con una velocidad de flujo de 30 μl/min.

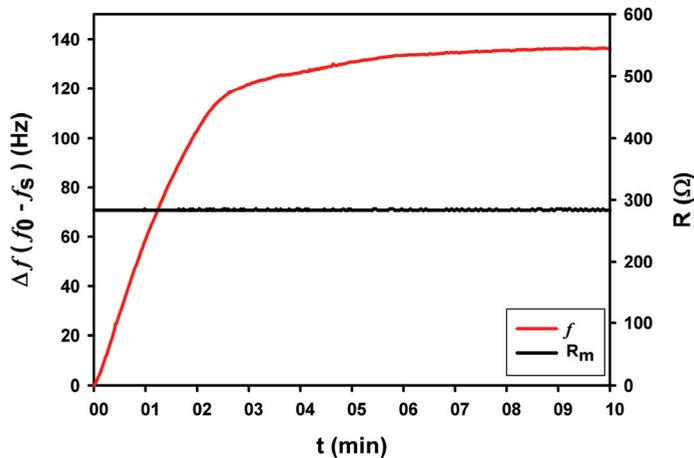


Figura 5.22: Señal máxima, medida con el oscilador, que registra la interacción conjugado de hapteno – anticuerpo.

Para garantizar que los cambios en la frecuencia se deben únicamente a la acumulación de masa sobre la superficie del electrodo y no a cambios de viscosidad y densidad del medio líquido en contacto con el cristal, la variación de la resistencia dinámica del cristal debe ser nula ($\Delta R_m \approx 0$) [Martin et al. 1991b]. Por lo anterior es necesario monitorizar el comportamiento de la resistencia dinámica del cristal para comprobar el cumplimiento de $\Delta R_m \approx 0$ durante el ensayo. La Figura 5.22 (registro en negro), muestra el comportamiento de la resistencia dinámica del cristal; como se puede observar su valor es prácticamente constante ($\Delta R_m=0$), durante la interacción conjugado de hapteno – anticuerpo.

5.3.1.3 Ciclo de Medida

La Figura 5.23 muestra un ciclo de ensayo del inmunosensor piezoeléctrico. Las fases que corresponden al ciclo de ensayo son:

1. **Línea base:** señal inicial, estable, que sirve de referencia. Duración aproximada de 1,5 min. Durante este tiempo, está fluyendo sobre el cristal PBST a una velocidad de 30 μ l/min.
2. **Inyección:** se inyecta la muestra a una velocidad de 30 μ l/min. Durante los 2 primeros minutos aproximadamente, llega la muestra al cristal y

luego, durante 10 minutos se registra la inmunoreacción, lo que se traduce en una disminución de la frecuencia.

3. **Regeneración:** dividida en dos etapas: la primera mientras se hace circular solución de HCl al 0,1M, a una velocidad de 280 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 4 minutos, para romper los enlaces conjugado de hapteno – anticuerpo y la segunda al hacer fluir PBST a una velocidad de 280 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 2,5 minutos.

Los tiempos de regeneración y línea base son los tiempos necesarios para que se establezca la señal. Lo cual garantiza que se ha cambiado completamente el líquido anterior. Estos tiempos han sido medidos de manera experimental.

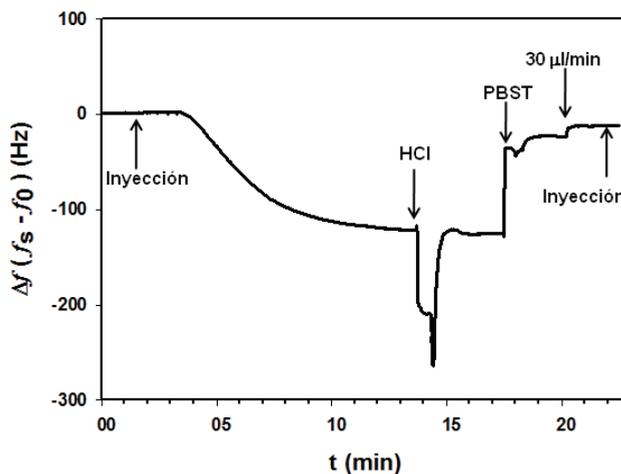


Figura 5.23: Ciclo de ensayo del inmunosensor piezoeléctrico, basado en oscilador.

5.3.2 Caracterización del Inmunosensor

La Figura 5.24 muestra las señales que se obtuvieron en los ensayos competitivos para la detección de Carbaryl a distintas concentraciones. La variación de la frecuencia es inversamente proporcional a la concentración del plaguicida. La Figura 5.24 es solo una parte de los ensayos realizados para generar la curva de calibración; en este caso se grafican las señales obtenidas al inyectar anticuerpo y las mezclas anticuerpo/analito a 10 $\mu\text{g}/\text{l}$, 20 $\mu\text{g}/\text{l}$, 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{l}$, respectivamente.

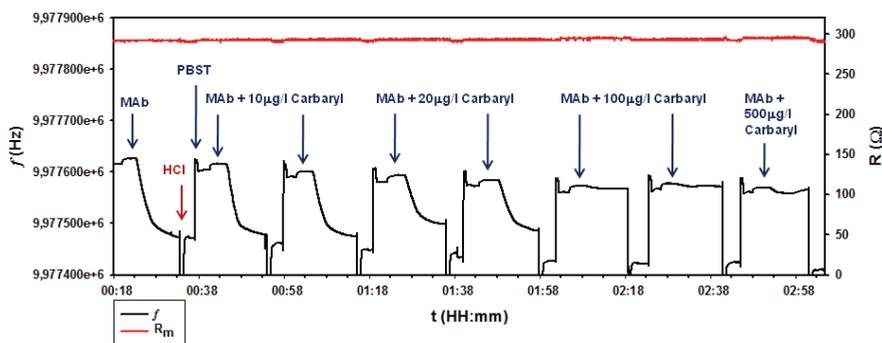


Figura 5.24: Respuesta del inmunosensor piezoeléctrico a la variación de la concentración de analito. En negro, registro de la frecuencia en tiempo real de inmunoensayos consecutivos de carbaryl a diferentes concentraciones. En rojo, registro de la resistencia dinámica del cristal en tiempo real para el mismo experimento.

Como se observa en la Figura 5.24 (registro en rojo), el comportamiento constante de la resistencia dinámica del cristal (R_m), indica que el resonador está trabajando en modo microgravimétrico; por tanto, los cambios de frecuencia se deben a cambios de la masa depositada sobre la superficie del cristal, como efecto de la unión conjugado de hapteno – anticuerpo.

A partir de las señales obtenidas, se ha realizado una curva patrón de calibración, de ella se extraen los parámetros de sensibilidad expresado como I_{50} , límite de detección (I_{90}) y rango lineal de trabajo (I_{80} - I_{20}).

La Figura 5.25 representa la curva estándar obtenida al promediar tres curvas individuales con dos ensayos por punto. Es decir, cada punto de la curva promedio es la medida de seis ensayos. Los datos obtenidos han sido analizados usando la ecuación (3.16). Las variación de la frecuencia en cada uno de los casos han sido normalizadas y representadas como un porcentaje de la señal máxima ($100 \times \Delta f / \Delta f_0$), donde Δf es la variación de frecuencia producida por la muestra a analizar y Δf_0 es la variación máxima de frecuencia.

La curva de caracterización presenta una forma sigmoidea y decreciente; es decir, la señal del inmunosensor piezoeléctrico es inversamente proporcional a la concentración del plaguicida.

El valor de la I_{50} es generalmente aceptado como un indicador de la sensibilidad del inmunosensor, en este caso es de $24 \mu\text{g/l}$.

El límite de detección (LOD), calculado como la concentración de plaguicida que proporciona un 90% de la señal máxima (I_{90}), es de $6,5 \mu\text{g/l}$.

Finalmente, el rango lineal de trabajo que se define como el intervalo de concentración que produce una variación de la señal, entre el 80% y el 20% de la señal máxima, se establece entre 11 $\mu\text{g/l}$ y 42 $\mu\text{g/l}$.

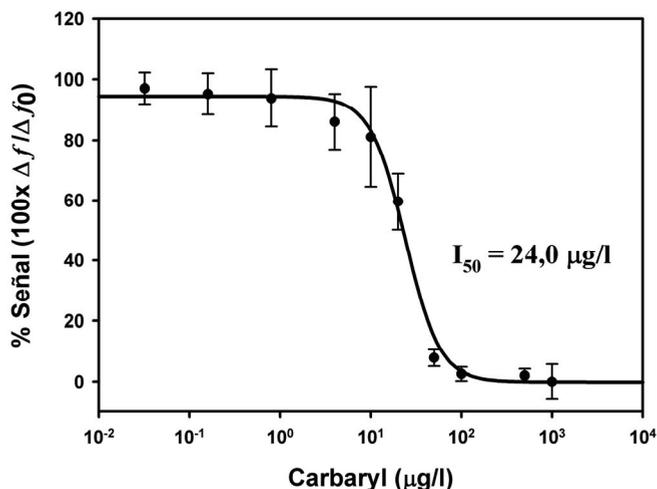


Figura 5.25: Curva estándar promedio para la detección de Carbaryl usando el oscilador

6 DISCUSIÓN (OSCILADOR)

En el apartado anterior se presentaron los resultados obtenidos con el sistema de caracterización basado en el oscilador diseñado, que se dividieron en: funcionamiento del sistema frente a los cambios de la densidad y la viscosidad del medio en contacto, efecto de la capacidad de compensación C_V , y finalmente el estudio de la respuesta en una aplicación real como inmunosensor piezoeléctrico. En esta parte del documento, se intentará dar una explicación a la diferencia que existe entre la frecuencia medida con el oscilador y la referencia, que en este caso es el analizador de impedancias; de igual manera se intentará explicar el efecto que produce la capacidad paralela de compensación en la respuesta del oscilador, se analizarán los resultados del inmunoensayo y se compararán con otros resultados experimentales previos que se encuentran publicados; finalmente se analizará el uso de este sistema como interfaz para microbalanza de cristal de cuarzo de alta frecuencia.

6.1 Respuesta del Oscilador

La respuesta en frecuencia del circuito oscilador diseñado fue comparada con la frecuencia medida con un analizador de impedancia. El analizador de impedancias proporciona la MSRF medida al valor máximo de la conductancia [Arnau et al. 2000a]; por tanto la diferencia de frecuencia medida con el analizador ($\Delta f_{ANA} = f_{ANA}(carga) - f_{ANA}(aire)$), corresponde a la diferencia entre la MSRF medida al aire y la MSRF medida con carga; en otras palabras el analizador de impedancias establece una relación entre las frecuencias de resonancia serie dinámica.

En el caso del oscilador, la señal que se registra es la frecuencia de oscilación, la cual está sujeta al cumplimiento de las condiciones de oscilación; sobre todo la condición de fase. En el circuito oscilador los desfases producidos por la electrónica asociada (OTA's, filtros y multiplicador), son compensados por el cristal; de esta manera, la frecuencia de oscilación será aquella en la cual se compensen todos los desfases del sistema; así, la variación de frecuencia medida con el oscilador ($\Delta f_{osc} = f_{osc}(carga) - f_{osc}(aire)$), corresponde a la diferencia de la frecuencia de oscilación en vacío y la frecuencia de oscilación en carga. La respuesta de un circuito oscilador está gobernada por la fase de oscilación del sistema. Una descripción gráfica de este problema, es mostrada en la Figura 6.1.

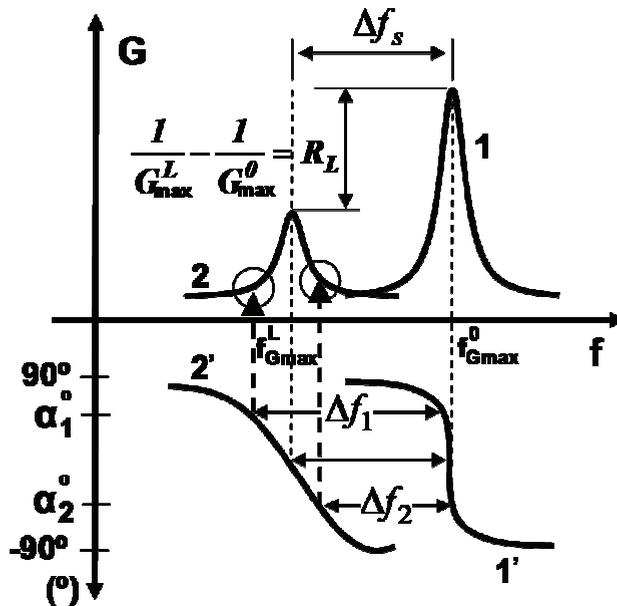


Figura 6.1: Problemática de la medida de frecuencia con un oscilador [Arnau et al. 2007].

La Figura 6.1, representa gráficamente el caso en el cual se deposita un líquido sobre la superficie del cristal. Las propiedades del líquido en contacto con el sensor, trasladan y disminuyen la amplitud de la curva de conductancia, debido al aumento de la resistencia dinámica del cristal y trasladan y cambian la pendiente de la curva de la fase. Donde, f_s^0 y f_s^L son las frecuencias a la máxima conductancia del cristal sin carga y con carga, respectivamente, Δf_s es la diferencia de frecuencia al máximo de la conductancia, que es la variación que se mide con el analizador de impedancias. Si la variación de la frecuencia es medida a una fase de oscilación α_1^0 ó α_2^0 , esta variación será diferente a la medida al máximo de la conductancia, como se puede observar gráficamente. Por tanto, la medida de la diferencia de frecuencia está condicionada por la fase a la cual se mide (fase de oscilación), cuando se trabaja en régimen no gravimétrico.

En este caso, la diferencia en la medida de la frecuencia que se aprecia en la Figura 5.1, obedece a que la curva del analizador representa la variación de la MSRF para cada una de las muestras, mientras que la curva del oscilador representa el cambio de la frecuencia de oscilación a una fase determinada por la carga en contacto con el sensor, como se puede ver en la Figura 5.3.

Además se puede observar que la fase de oscilación para este sistema no es constante, sino que varía conforme cambian las propiedades (viscosidad y densidad) del medio en contacto con el cristal.

Como se mencionó en el Capítulo I, una de las problemáticas de usar los osciladores como método de caracterización de sensores de cuarzo es la determinación de la MSRF.

La dependencia de la frecuencia con la fase de oscilación es una de las grandes desventajas de los sistemas de caracterización basados en osciladores; ya no solo por el hecho del error inherente que existe en la medida de la frecuencia, sino que además hay que sumarle que cualquier perturbación o cualquier cambio en las propiedades de la carga que modifique la fase, modificará también la frecuencia de oscilación, pues el sistema intentará buscar la frecuencia a la cual se compense nuevamente la fase. Esta constante búsqueda de la compensación de la fase será evidente en la estabilidad de la frecuencia. Cambios producidos en la fase darán origen a variaciones de frecuencia. Por ejemplo, al estar en contacto con un medio líquido, pequeñas variaciones de la fase producida por factores físicos externos, como la temperatura, las interferencias electromagnéticas, vibraciones, etc., serán compensados con un cambio de frecuencia que se manifestará como ruido.

La estabilidad es uno de los requerimientos del sistema de caracterización, la dependencia de la condición de fase de los sistemas basados en osciladores, hace que la estabilidad del sistema sea otra de las desventajas de este tipo de técnica

de caracterización; sobre todo para el uso de osciladores como interfaz de HFF-QCM.

A pesar de que los sistemas osciladores no miden exactamente la MSRF, eso no impide que puedan ser usados como interfaz para biosensores [Briand et al. 2006; Chou et al. 2004; Kurosawa et al. 2000; Kurosawa et al. 2005; Kurosawa et al. 2006; Lazerges et al. 2005; Lazerges et al. 2006; Michalzik et al. 2005; Park et al. 2006; Park et al. 2003; Sakti et al. 2001; Towery et al. 2001]; ya que, en una aplicación de detección no importa tanto el valor puntual de la frecuencia para cada muestra, sino la relación entre la variación de la frecuencia y la concentración de la muestra a analizar; en algunos casos esta variación de la frecuencia se establece en términos de porcentajes con respecto a la señal máxima de medida. Una curva de calibración permite caracterizar la respuesta y establecer los parámetros de detección del biosensor.

Además, en aplicaciones de biosensores el cristal trabaja en régimen gravimétrico. Al no existir un cambio en la resistencia dinámica del cristal, la curva de conductancia únicamente se traslada en frecuencia sin sufrir ningún cambio en su forma y la curva de fase sólo se traslada manteniendo la misma pendiente inicial; este efecto hace que los cambios de frecuencia (Δf_s) medidos al máximo de la conductancia, sean los mismos que los medidos a cualquier otra fase, por tanto, bajo régimen gravimétrico, la fase de oscilación no influye en la medida de la variación de la frecuencia; como se puede observar en la Figura 6.2.

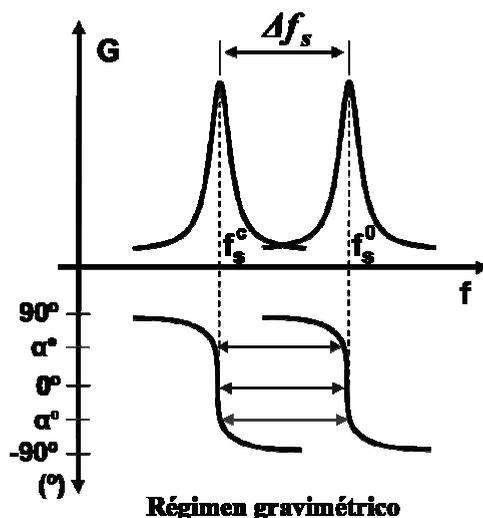


Figura 6.2: Efecto de la fase de oscilación sobre la medida de la variación de la frecuencia bajo régimen gravimétrico

Por esta razón, un oscilador es un método válido y ampliamente difundido para la caracterización de sistemas de biosensores basados en cristales piezoeléctricos. Además, los osciladores como método de caracterización de biosensores ofrecen la capacidad de ser sistemas de reducido tamaño, de amplio nivel de integración y de bajo coste, lo cual permite situarlos como una alternativa de caracterización para sistemas de biosensores que trabajen directamente en entornos diferentes al laboratorio.

6.2 Explicación: Efecto de la Rama de Compensación Capacitiva y el Condensador C_V en la Respuesta del Oscilador

Para explicar los efectos que produce la rama y el condensador de compensación sobre la respuesta del sistema se procederá de dos maneras: inicialmente se intentará explicar el efecto que produce la fase de oscilación sobre la respuesta en frecuencia del sistema oscilador comparado con el analizador, y a continuación se explicará el efecto de la capacidad y de la rama de compensación sobre la fase de oscilación del circuito.

De las Figura 5.19 y Figura 5.20, se puede llegar a pensar erróneamente que de cierta manera se está llegando a compensar la capacidad paralela del cristal, ya que la frecuencia de oscilación del cristal es casi paralela a la MSRF medida con el analizador. Sin embargo, si así fuera la fase de oscilación no debería ser constante, ya que la fase correspondiente a la frecuencia de máxima conductancia cambia para diferentes valores de resistencia dinámica, es decir, cuando cambia el líquido. No obstante, este efecto habrá que explicarlo ya que el hecho de la frecuencia de oscilación sea paralela a la de máxima conductancia establece una regencia interesante. De la observación de estas graficas se pueden establecer dos relaciones: la primera, es la relación entre la fase constante del resonador y el posible paralelismo de la frecuencia de oscilación comparada con la referencia; y la segunda es la relación entre la capacidad de compensación y la fase de oscilación del cristal. La explicación de estas relaciones permitirá comprender el efecto de la rama y la capacidad de compensación sobre la respuesta del circuito.

6.2.1 Variación de la Frecuencia de Oscilación a una Fase Constante

Una explicación de la relación entre la frecuencia y la fase constante de oscilación del cristal, se presenta a continuación:

Las ecuaciones de ganancia y fase del circuito oscilador sin la rama de compensación capacitiva, que cumplen con la condición de oscilación, se pueden escribir como:

$$Z_{RLC} * Y_{QCM} * K_m = 1 \quad (3.23)$$

$$\varphi_{RLC} + \varphi_{QCM} + \varphi_M = 0 \quad (3.24)$$

Donde:

Z_{RLC} : Impedancia de la red RLC, en el colector de la OTA.

Y_{QCM} : Admitancia del cristal.

K_m : Ganancia del multiplicador AD835.

φ_{RLC} : Fase de la red RLC.

φ_{QCM} : Fase del cristal.

φ_m : Fase del multiplicador AD835.

Si la fase de oscilación del cristal es constante, entonces la ecuación (3.24), se puede escribir de la siguiente manera:

$$\varphi_{QCM} = \varphi_{RLC} + \varphi_M = K_\varphi \quad (3.25)$$

Donde:

K_φ : Valor de fase constante.

La ecuación (3.25), es la ecuación de fase del circuito oscilador, sin la rama de compensación capacitiva, donde el cristal esta compensando los desfases producidos por los componentes del circuito, manteniendo la fase del cristal constante al cambiar la densidad y la viscosidad del medio en contacto con el resonador.

La fase de oscilación del cristal también se puede definir a partir del modelo eléctrico del sensor, para el cual, la admitancia del cristal se expresa como:

$$Y_{QCM} = j\omega C_0 + \frac{1}{R_m + jX_m} = \frac{R_m}{R_m^2 + X_m^2} + j \frac{\omega C_0 (R_m^2 + X_m^2) - X_m}{R_m^2 + X_m^2} \quad (3.26)$$

Y la fase de oscilación:

$$\tan \varphi_{QCM} = \frac{\omega C_0 (R_m^2 + X_m^2) - X_m}{R_m} \quad (3.27)$$

Donde:

$$X_m = L_m \omega - \frac{1}{C_m \omega} = (L_q + \Delta L) \omega - \frac{1}{C_q \omega} = \Delta L \omega + \frac{1}{\omega C_q} \left(\frac{\omega^2}{\omega_0^2} - 1 \right) \quad (3.28)$$

Si $\Delta L \omega \approx R_m$, entonces la ecuación (3.28), se puede escribir como:

$$X_m \approx R_m + \frac{1}{\omega C_q} \left(\frac{\omega^2}{\omega_0^2} - 1 \right) \quad (3.29)$$

A partir de la ecuación (3.29) se puede obtener una expresión para la frecuencia angular y por tanto:

$$X_m \approx R_m + \frac{2}{C_q \omega_0^2} \Delta \omega_\varphi \quad (3.30)$$

La ecuación (3.30) relaciona la variación de la frecuencia angular a una fase determinada y la frecuencia angular de resonancia serie dinámica en vacío.

Reemplazando la ecuación (3.30) en la ecuación (3.27), se puede determinar la función que relaciona la fase de oscilación del QCM con la variación de la frecuencia a una fase determinada respecto a la frecuencia de resonancia serie dinámica en vacío (ω_θ).

$$\tan \varphi_{QCM} = \frac{4C_0}{C_q^2 \omega_0^3 R_m} \Delta \omega_\varphi^2 + \frac{4C_0 \omega_0 R_m - 2}{C_q R_m \omega_0^2} \Delta \omega_\varphi + 2\omega_0 C_0 R_m - 1 = K_\varphi \quad (3.31)$$

En el caso del cristal al aire, ($\Delta \omega_\varphi^{aire}$), $R_m = R_q$ y la ecuación (3.30) se puede escribir como:

$$X_m = \frac{2\Delta \omega_\varphi^{aire}}{C_q \omega_0^2} = \frac{2\Delta \omega_A}{C_q \omega_0^2} \quad (3.32)$$

Reemplazando la ecuación (3.32) en la ecuación (3.27), se obtiene la relación entre la frecuencia angular de oscilación en aire a una fase determinada y la frecuencia angular de resonancia serie dinámica en vacío.

$$\frac{4C_0}{C_q^2 \omega_0^3 R_q} \Delta \omega_A^2 - \frac{2}{C_q \omega_0^2 R_q} \Delta \omega_A + \omega_0 C_0 R_q - K_\varphi = 0 \quad (3.33)$$

En el caso del analizador de impedancias, la medida de la frecuencia al máximo de la conductancia cuando el sensor esta en aire, es considerada como la frecuencia de resonancia serie dinámica en vacío. Para el cristal con carga el analizador mide la frecuencia al máximo de la conductancia que corresponde a

una fase cero de la impedancia de la rama dinámica (R_m , L_m y C_q). Entonces la ecuación que relaciona la variación de frecuencia angular, por efectos de la carga medida con el analizador, se puede escribir como:

$$\tan \varphi_{QCM} = \frac{X_m}{R_m} = 1 + \frac{2}{C_q \omega_0^2 R_m} \Delta \omega_s = 0 \quad (3.34)$$

$$\Delta \omega_s = -\frac{C_q \omega_0^2 R_m}{2} \quad (3.35)$$

De esta manera se obtuvieron las expresiones que permiten calcular el comportamiento del oscilador, donde:

$\Delta \omega_\varphi$: Variación de la frecuencia del sensor para un líquido medida a una fase determinada.

$\Delta \omega_s$: Variación de la frecuencia del sensor para un líquido medida al valor máximo de la conductancia. ($\Delta \omega_s = \omega_s - \omega_0$).

$\Delta \omega_{\varphi s}$: Diferencia entre la frecuencia medida a una fase determinada y la medida al valor máximo de la conductancia. ($\Delta \omega_{\varphi s} = \Delta \omega_{\varphi c} - \Delta \omega_s = \omega_\varphi - \omega_s$).
 $\Delta f_{\varphi s} = \Delta \omega_{\varphi s} / 2\pi$.

Las ecuaciones anteriores han sido usadas para calcular el efecto que produce una fase de oscilación constante sobre la respuesta del cristal. Para cada uno de los casos, se usó el valor de la resistencia dinámica del cristal medida experimentalmente con el analizador y la fase de oscilación del circuito. Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas:

Tabla 6.1: Valores calculados para el oscilador sin lazo de compensación capacitiva

R_m (Ω)	$\Delta\omega_\phi$ (rad/s)	$\Delta\omega_s$ (rad/s)	$\Delta f_{\phi s}$ (Hz)
277	-18354	-15952	-382,29
308	-20085	-17673	-383,88
369	-23459	-21173	-363,83
443	-27286	-25419	-297,14
550	-32291	-31559	-116,5
617	-35093	-35403	49,34
722	-38931	-41428	397,41

Tabla 6.2: Valores calculados para el oscilador con rama de compensación y $C_V=6.8\text{pF}$

R_m (Ω)	$\Delta\omega_\phi$ (rad/s)	$\Delta\omega_s$ (rad/s)	$\Delta f_{\phi s}$ (Hz)
263	-21087	-15079	-956,2
292	-23188	-16742	-1025,91
351	-27338	-20125	-1147,98
426	-32377	-24425	-1265,6
550	-40148	-31535	-1370,8
647	-45748	-37096	-1377,01
743	-50880	-42601	-1317,64
850	-56109	-48736	-1173,45
1000	-62530	-57336	-826,65
1200	-69261	-68803	-72,89
1400	-73424	-80271	1089,73

Tabla 6.3: Valores calculados para el oscilador con rama de compensación y $C_V=10\text{pF}$

$R_m (\Omega)$	$\Delta\omega_\phi (\text{rad/s})$	$\Delta\omega_s (\text{rad/s})$	$\Delta f_{\phi s} (\text{Hz})$
256	-22039	-14663	-1173,93
290	-24724	-16611	-1291,22
351	-29413	-20105	-1481,41
424	-34815	-24286	-1675,74
550	-43631	-31503	-1930,23
652	-50317	-37346	-2064,4
765	-57266	-43818	-2140,32
850	-62182	-48687	-2147,8
1000	-70204	-57279	-2057,08
1200	-79573	-68735	-1724,92
1400	-87316	-80191	-1133,98
1500	-90510	-85918	-730,84
1600	-93195	-91646	-246,53
1800	-96763	-103102	1088,88

Tabla 6.4: Valores calculados para el oscilador con rama de compensación y $C_v=15\text{pF}$

R_m (Ω)	$\Delta\omega_\phi$ (rad/s)	$\Delta\omega_s$ (rad/s)	$\Delta f_{\phi s}$ (Hz)
245	-23752	-14055	-1543,33
275	-26411	-15776	-1692,61
330	-31164	-18931	-1946,94
401	-37078	-23004	-2239,95
550	-48745	-31552	-2736,35
608	-53031	-34880	-2888,82
731	-61677	-41936	-3141,88
850	-69493	-48763	-3299,28
1000	-78601	-57368	-3379,34
1200	-89471	-68841	-3283,37
1400	-98856	-80315	-2950,89
1500	-102960	-86052	-2690,99
1600	-106644	-91788	-2364,41
1800	-112613	-103262	-1488,26

Para la realización de los cálculos, se necesitan tres valores: la resistencia dinámica del cristal, la frecuencia de oscilación al vacío (f_0), que han sido medidas con el analizador para cada uno de los casos estudiados, y la fase de oscilación del cristal. Una representación gráfica de los cálculos obtenidos, se puede observar en las figuras siguientes:

La Figura 6.3, representa los datos calculados, donde cada uno de los casos estudiados se representó con la fase de oscilación, así:

- Oscilador sin rama de compensación capacitiva: En este caso se representó con los valores de la resistencia dinámicas medidas (Tabla 5.5) y la fase que representa esta configuración tomada de la Tabla 5.6, que para este cálculo se escoge $\phi = -18^\circ$.
- Oscilador con rama de compensación capacitiva y $C_v = 6,8\text{pF}$: Este caso se representó con los valores de la resistencia dinámica medidas (Tabla 5.13) mas unos valores mayores de resistencia para observar el comportamiento

- en un rango de R_m mucho mayor al medido. En este caso la fase es prácticamente constante y su valor aproximado es de $\varphi = -28^\circ$.
- c. Oscilador con rama de compensación capacitiva y $C_v = 10$ pF: Se tomaron los valores de la resistencia dinámica de la Tabla 5.17 y se seleccionó una fase $\varphi = -32^\circ$ a partir de los datos de la Tabla 5.18.
 - d. Oscilador con rama de compensación capacitiva y $C_v = 15$ pF: Se usaron los valores de la resistencia dinámica del cristal de la Tabla 5.21. La fase de oscilación $\varphi = -40^\circ$ fue tomada de los valores de la Tabla 5.22.

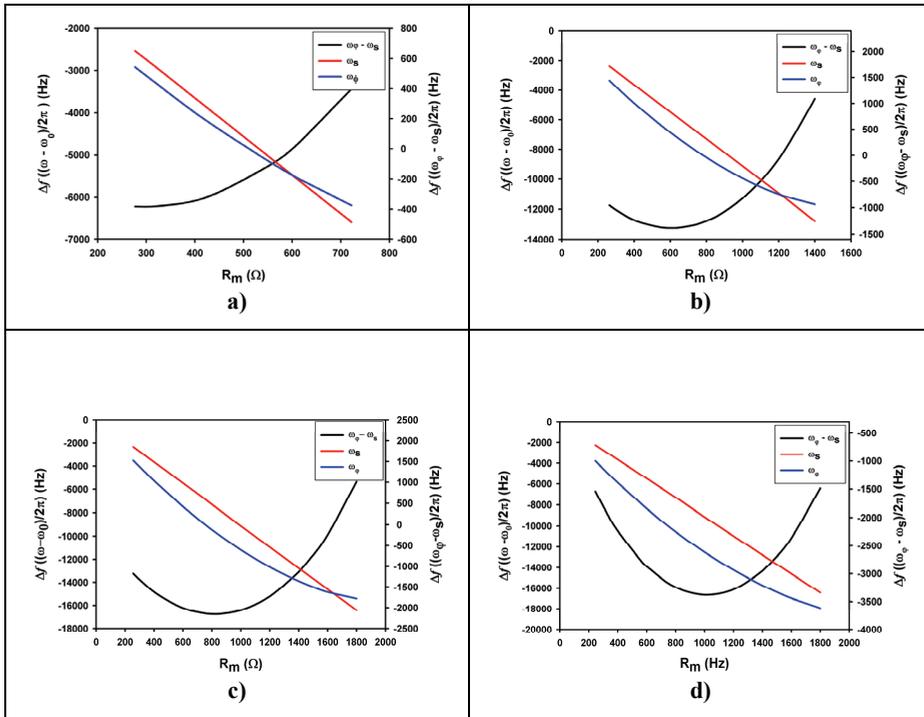


Figura 6.3: Variaciones de frecuencia calculadas. a) Oscilador sin rama de compensación. b) Oscilador con rama de compensación y $C_v = 6,8$ pF. c) Oscilador con rama de compensación y $C_v = 10$ pF. d) Oscilador con rama de compensación y $C_v = 15$ pF.

La Figura 6.4 muestra el efecto de la fase sobre la medida de la frecuencia de oscilación. Como se puede observar, la medida de la frecuencia está condicionada por la fase de oscilación del sistema, aunque el comportamiento del circuito es parecido, para cada uno de los casos, la fase de oscilación permite ampliar el rango de R_m de medida. La adecuada selección de la fase de oscilación de acuerdo a las necesidades de la aplicación, permitirá una medida más acertada de la variación de frecuencia. Por ejemplo, para la caracterización

de líquidos de baja viscosidad y densidad, conviene establecer una fase de oscilación $\varphi < -30^\circ$, mientras que en el caso de medir líquidos de resistencia dinámica mayor sería mejor escoger una fase en el rango de -30° a -40° .

De igual manera, se puede observar que para una fase de oscilación $\varphi = -28^\circ$ existe un rango de R_m entre 300Ω y 600Ω , donde la respuesta del oscilador comparada con la referencia es casi paralela; por tanto, el casi paralelismo observado experimentalmente para una $C_v = 6,8 \text{ pF}$, es debido al valor que toma la fase de oscilación del sensor para ese rango de R_m , que casualmente es el rango de valores para los que se realizaron las pruebas experimentales.

La Figura 6.5 muestra la diferencia entre la frecuencia medida a una fase determinada y la medida al máximo de la conductancia ($\omega_\varphi - \omega_s$), para las fases calculadas. La tendencia de las curvas se mantiene, aunque a desfases mayores la diferencia aumenta.

La Figura 6.4 y la Figura 6.5, explican el comportamiento registrado experimentalmente y el comportamiento de la variación de la frecuencia medida con el oscilador comparado con el registrado por el analizador de impedancia, además explican la dependencia de la fase con la medida de la frecuencia que se detectó experimentalmente. Esta dependencia de la fase de oscilación con la medida de la variación de la frecuencia ha sido observada con anterioridad por Martin [Martin et al. 1997] y por Borngräber [Borngräber et al. 2002]

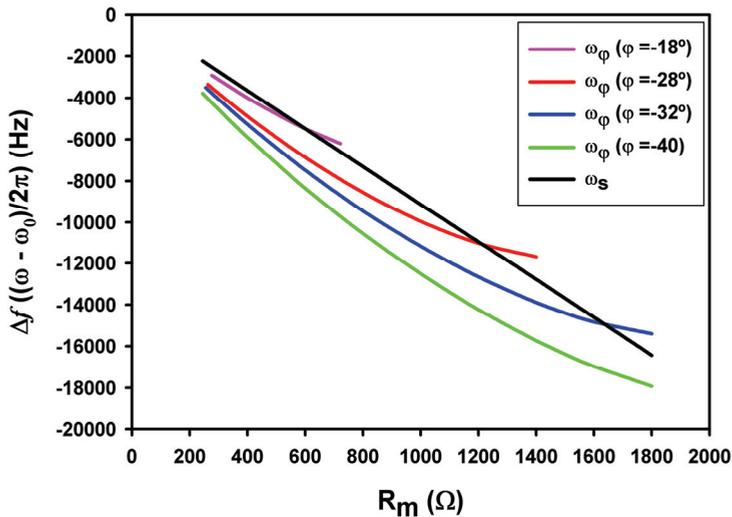


Figura 6.4: Efecto de la fase sobre la variación de la frecuencia.

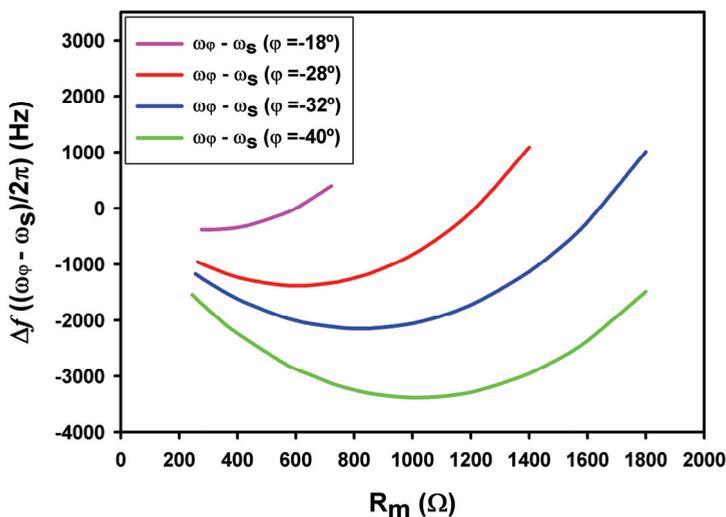


Figura 6.5: Diferencia entre las frecuencias a una fase φ y la MSRF ($\Delta f = \omega_\varphi - \omega_s$), con respecto a la resistencia dinámica del cristal R_m .

6.2.2 Efecto de la Rama y la Capacidad de Compensación Sobre la Fase de Oscilación

El efecto que produce la rama y la capacidad de compensación C_v sobre la fase de oscilación del sistema, se explica de la siguiente manera:

Del circuito oscilador de la Figura 4.1, los valores de u_0 y u_{cv} , se pueden representar como:

$$u_0 = u_i \left| Y_{QCM} \right| \left| Z_{RLC} \right| \frac{\varphi_{OTA1} + \varphi_{RLC} + \varphi_{QCM}}{\varphi_{OTA1} + \varphi_{RLC} + \varphi_{QCM}} \quad (3.36)$$

$$u_{cv} = u_i \left| j\omega C_v \right| \left| Z_{RLC} \right| \frac{\varphi_{OTA2} + \varphi_{RLC} + \frac{\pi}{2}}{\varphi_{OTA2} + \varphi_{RLC} + \frac{\pi}{2}} \quad (3.37)$$

Donde:

φ_{OTA1} : Desfase producido por el OTA1.

φ_{OTA2} : Desfase producido por el OTA2.

φ_{RLC} : Desfase producido por el circuito R-L-C.

φ_{QCM} : Fase de la oscilación del cristal.

Y_{XTAL} : Admitancia del cristal.

Z_{RLC} : Impedancia del circuito R-L-C.

$j\omega C_v$: Admitancia del condensador C_v .

En ausencia de la rama de compensación (configuración del circuito de acuerdo a la Figura 4.28), la tensión a la salida del amplificador diferencial interno (A_D) del AD835 es u_0 con un desfase que es prácticamente el mismo para toda R_m , ya que la amplitud de u_0 se mantiene constante por el AGC. El desfase en el amplificador A_D se mantiene constante, porque no se modifica su ganancia; por tanto, puede escribirse:

$$u_0 k \big| \varphi_m = u_i \quad (3.38)$$

$$u_0 k = u_0 \big| Y_{QCM} \big| \big| Z_{RLC} \big| k \big| \varphi_{OTA1} + \varphi_{RLC} + \varphi_{QCM} + \varphi_m \quad (3.39)$$

Donde:

φ_m : Desfase producido por el multiplicador.

De la Figura 5.6, se comprueba que la fase del circuito para esta configuración cambia con respecto a R_m , en un rango que va desde los 24° para una $R_m \approx 220\Omega$, hasta los 10° para una $R_m \approx 750\Omega$; es decir, el desfase es directamente proporcional a la ganancia del OTA, lo que es lógico. Si el resto de componentes del circuito tienen un desfase constante, la variación de la fase entre 10° y 24° , se deberá al OTA1, al cambiar de ganancia. Si asumimos que a una ganancia 1 ($A_{OTA1}=1$), el desfase en el OTA1 es pequeño, entonces el resto del circuito produce un desfase de $\approx 10^\circ$ a los que el OTA1 agrega un desfase hasta 10° y 24° , dependiendo de la ganancia, que para este caso toma valores comprendidos entre 1 y 5, aproximadamente. Por lo anterior, se puede decir que: cuando $A_{OTA1} = 1$, entonces $\varphi_{OTA1} = 0^\circ$, y cuando $A_{OTA} = 5$, entonces $\varphi_{OTA1} = 14^\circ$

Suponiendo entonces, que para distintos valores de R_m , u_0 sufre un desfase, dependiendo de la ganancia del OTA1 que está entre 1 y 5. Para este caso la tensión u_0 se puede expresar como:

$$u_0 = u_i \big| Y_{QCM} \big| \big| Z_{RLC} \big| \big| \varphi_c + \varphi_{QCM} \quad (3.40)$$

Donde:

φ_c : Desfase cambiante producido por el circuito.

De la Figura 5.6 y asumiendo que el cristal compensa los desfases producidos por el circuito, se puede suponer que el valor de φ_c para las distintas ganancias (diferentes valores de R_m), toma los valores indicados en la Tabla 6.5.

Por otro lado, al agregar al circuito la rama de compensación (configuración de acuerdo a la Figura 4.1), el desfase en el OTA2 varía con respecto a C_v , ya que la ganancia del OTA2 cambia de 0,5 a 1 para valores de C_v entre 6,8pF y 15pF, respectivamente. Sin embargo, este cambio de fase es mucho más suave ya que el cambio en la ganancia es pequeño.

Tabla 6.5: Desfases producido por el circuito para las diferentes R_m

R_m (Ω)	φ_c ($^\circ$)
250	-22
300	-19
340	-18
440	-16
640	-13
750	-10

Si asumimos que el desfase asociado al resto del circuito es el mismo, tenemos que:

$$u_{cv} = |u_i| |j\omega C_v| |Z_{RLC}| \left| \varphi_c' + \frac{\pi}{2} \right| \quad (3.41)$$

Donde:

φ_c' : Desfase cambiante producido por la rama de compensación.

Se puede asumir que la variación de φ_c' es poca, puesto que, la ganancia del OTA2 varía entre 0.5 y 1.

Si tomamos como referencia el desfase que produce una ganancia igual a 1 en el OTA1, se puede decir entonces, que $\varphi_c = 10^\circ$ cuando $C_v = 15\text{pF}$, ya que $A_{OTA1} = A_{OTA2} = 1$, suponiendo que las OTA's presentan el mismo desfase para una misma ganancia.

En este caso, la señal a la salida del amplificador (A_D) interno del AD835, se puede escribir como:

$$u_1 = u_0 - u_{cv} \quad (3.42)$$

$$u_1 = |u_i| |Y_{QCM}| |Z_{RLC}| \left| \varphi_c + \varphi_{QCM} \right| - |u_i| |j\omega C_v| |Z_{RLC}| \left| \varphi_c' + \frac{\pi}{2} \right| \quad (3.43)$$

Donde:

u_I : Señal a la salida del amplificador diferenciador (A_D) interno del AD835.

En la ecuación (3.43), llamaremos:

$$A = |u_i| |Y_{QCM}| |Z_{RLC}| \quad (3.44)$$

$$B = |u_i| |j\omega C_v| |Z_{RLC}| \quad (3.45)$$

$$\alpha = \varphi_c + \varphi_{QCM} \quad (3.46)$$

$$\beta = \varphi_c + \pi/2 \quad (3.47)$$

Reemplazando las ecuaciones (3.44) y (3.46) en la ecuación (3.40)

$$u_0 = A \underline{\alpha} \quad (3.48)$$

Y las ecuaciones (3.45) y (3.47) en la ecuación (3.41)

$$u_{cv} = B \underline{\beta} \quad (3.49)$$

Entonces, la ecuación (3.43), se puede escribir como:

$$u_1 = A \underline{\alpha} - B \underline{\beta} \quad (3.50)$$

La Figura 6.6 representa gráficamente la ecuación (3.50).

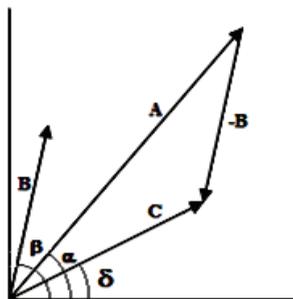


Figura 6.6: Representación gráfica de la ecuación (3.50).

De la Figura 6.6, se deduce que:

$$\begin{aligned} A \cos \alpha &= C \cos \delta + B \cos \beta \\ A \operatorname{sen} \alpha &= C \operatorname{sen} \delta + B \operatorname{sen} \beta \end{aligned} \quad (3.51)$$

Donde:

$$\begin{aligned} C &= |u_1| \\ \delta &= \angle u_1 \end{aligned} \quad (3.52)$$

Por tanto:

$$\tan \delta = \frac{A \operatorname{sen} \alpha - B \operatorname{sen} \beta}{A \cos \alpha - B \cos \beta} \quad (3.53)$$

El valor de δ es un parámetro muy relevante en este caso, ya que u_1 es la señal que después de ser multiplicada se realimenta; si asumimos que el desfase del multiplicador es cero o constante, δ debe ser prácticamente cero para que se cumpla la condición de fase de oscilación. Por lo anterior se puede suponer que el circuito oscila a un valor de fase donde se cumpla que $\delta = 0$.

Se puede ver si existe algún valor de C_v que hace que $\tan \delta = 0$, para el mismo desfase del cristal.

Mediante una simulación numérica se puede comprobar el comportamiento de δ para los diferentes líquidos y configuraciones, resolviendo la ecuación (3.53), y usando los parámetros de la Tabla 6.6.

Los valores de B , X_m y Y_x se calculan de la siguiente manera:

De la ecuación (3.27)

$$\omega C_0 (R_m^2 + X_m^2) - X_m = R_m \tan \varphi_{QCM} \quad (3.54)$$

$$X_m = \frac{\frac{1}{\omega C_0} \pm \sqrt{\left(\frac{1}{\omega C_0}\right)^2 + 4\left(\frac{R_m \tan \varphi_{QCM}}{\omega C_0} - R_m^2\right)}}{2} \quad (3.55)$$

De las ecuaciones (3.26) y (3.55), se puede calcular el valor de $|Y_{QCM}|$

$$|Y_{QCM}| = \frac{R_m \sqrt{1 + \tan^2 \varphi_{QCM}}}{R_m^2 + X_m^2} \quad (3.56)$$

A partir de la ecuación (3.56) y haciendo que:

$$\frac{|u_0|}{|u_{cv}|} = \frac{A}{B} = \frac{|Y_{QCM}|}{|j\omega C_v|} = \frac{|Y_{QCM}|}{\omega C_v} \quad (3.57)$$

$$B = \frac{\omega C_v}{|Y_{QCM}|} A \quad (3.58)$$

Tabla 6.6: Parámetros de simulación

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
$f_0=10\text{MHz}$	Frecuencia de resonancia aproximada del cristal usado.
$C_q=28,87\text{fF}$	Capacidad de la rama dinámica del cristal medida con el analizador.
$C_0=10\text{pF}$	Capacidad paralela del cristal (valor común).
$A=0,8$	Amplitud de la señal en el colector de la OTA1, este valor permanece constante por acción del AGC.
φ_x	Fase de oscilación.
C_v	Valor de C_v .
R_m	Resistencia dinámica del cristal, valores aproximados para cada uno de los casos, de acuerdo a los valores medidos con el analizador.
φ_c	Valor de φ_c .
α	De acuerdo a la ecuación (3.46).
β	De acuerdo a la ecuación (3.47)
X_m	De acuerdo a la ecuación
$ Y_{QCM} $	De acuerdo a la ecuación

Al simular el efecto que produce la fase de oscilación y el condensador C_v sobre δ . Se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 6.7: Resultados simulación oscilador con rama de compensación y $C_v=6,8 \text{ pF}$

$\varphi_{qcm} (\text{°})$	$R_m (\Omega)$	$\varphi_c (\text{°})$	A (V)	B (V)	$\alpha (\text{°})$	$\beta (\text{°})$	$\delta (\text{°})$
26,8	250	-22	0,8	0,075	4,8	80	-0,53
26,8	300	-19	0,8	0,099	7,8	80	0,76
26,8	340	-18	0,8	0,112	8,8	80	0,92
26,8	440	-16	0,8	0,140	10,8	80	0,86
26,8	640	-13	0,8	0,197	13,8	80	-0,25
26,8	750	-10	0,8	0,229	16,8	80	0,44

Tabla 6.8: Resultados simulación oscilador con rama de compensación y $C_v=10\text{pF}$

$\varphi_{qcm} (\text{°})$	$R_m (\Omega)$	$\varphi_c (\text{°})$	A (V)	B (V)	$\alpha (\text{°})$	$\beta (\text{°})$	$\delta (\text{°})$
30	220	-22	0,8	0,112	8	80	0,05
30	300	-19	0,8	0,148	11	80	0,52
30	340	-18	0,8	0,165	12	80	0,28
30	440	-16	0,8	0,206	14	80	-0,75
33	640	-13	0,8	0,284	20	80	-0,46
33	750	-10	0,8	0,325	23	80	-0,61

Tabla 6.9: Resultados simulación oscilador con rama de compensación y $C_v=15\text{pF}$

$\varphi_{qcm} (\text{°})$	$R_m (\Omega)$	$\varphi_c (\text{°})$	A (V)	B (V)	$\alpha (\text{°})$	$\beta (\text{°})$	$\delta (\text{°})$
35	220	-22	0,8	0,173	13	80	0,71
36	300	-19	0,8	0,227	17	80	0,78
37	340	-18	0,8	0,254	19	80	0,85
39	440	-16	0,8	0,315	23	80	0,18
45	640	-13	0,8	0,426	32	80	0,42
46	750	-10	0,8	0,477	36	80	0,04

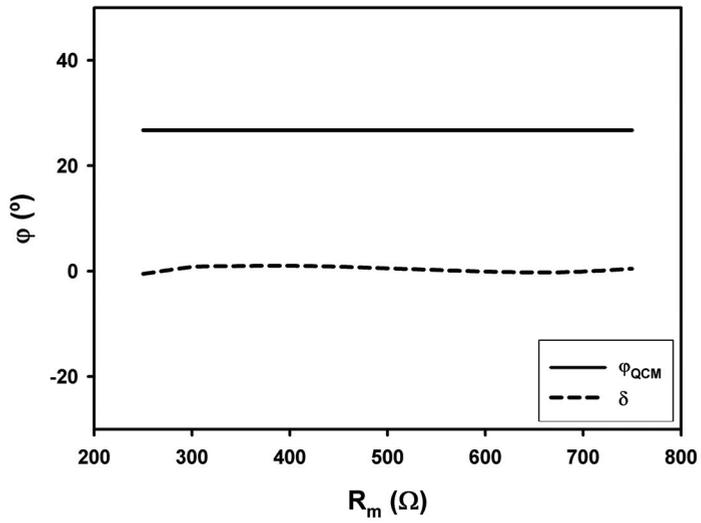


Figura 6.7: Representación gráfica de los resultados de simulación de la Tabla 6.7

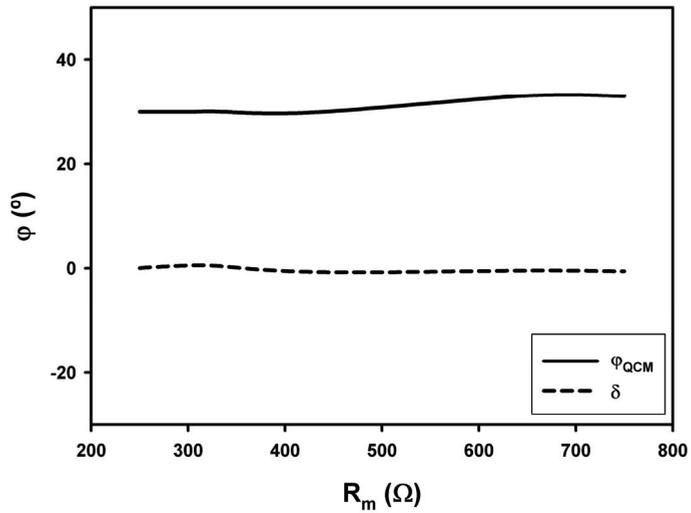


Figura 6.8: Representación gráfica de los resultados de simulación de la Tabla 6.8

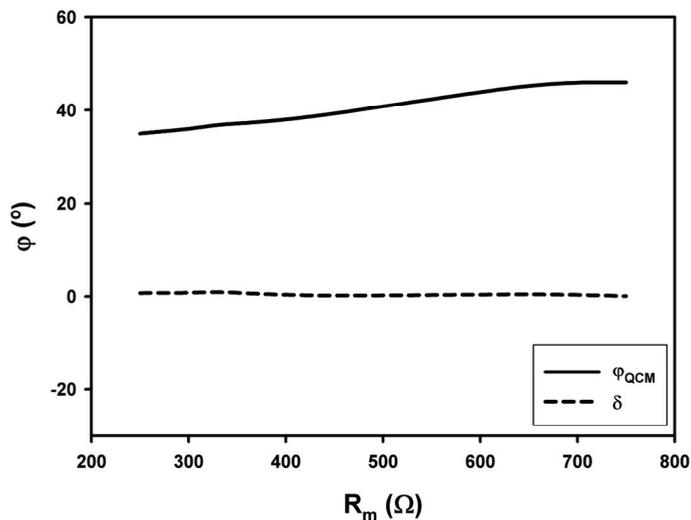


Figura 6.9: Representación gráfica de los resultados de simulación de la Tabla 6.9

De las tablas (Tabla 6.7, Tabla 6.8 y Tabla 6.9) y figuras (Figura 6.7, Figura 6.8 y Figura 6.9) anteriores se puede concluir que existe un valor de fase del cristal (φ_{QCM}), para el cual $\delta \approx 0$, cumpliendo así, la condición de fase del oscilador; además, en el caso de $C_v = 6,8\text{pF}$, el valor de la fase del cristal se mantiene constante para todo el rango de R_m ; mientras que para $C_v = 10\text{pF}$ o 15pF , el valor de φ_{QCM} varía, correspondiendo el comportamiento simulado de la fase, con el comportamiento del circuito observado en la práctica. Esta simulación explica el comportamiento del sistema y sobre todo una de las funciones del cristal dentro del circuito. El QCR constantemente está cambiando su fase para compensar los desfases producidos en el circuito, buscando cumplir con la condición de fase cero (para este caso $\delta = 0$), que permite mantener la oscilación. Por los resultados anteriores es fácil pensar, que la función de C_v no es la de compensar la capacidad paralela del cristal, sino mas bien la de compensar los desfases asociados al resto del circuito para diferentes ganancias. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una prueba con el mismo circuito oscilador configurado con una capacidad de compensación $C_v=6,8\text{pF}$, usando el mismo cristal que en las pruebas anteriores, pero esta vez se aumentó la capacidad paralela del cristal a 12pF ($C_0 = 12\text{pF}$). Todo esto con el fin de observar si la función de C_v es o no, la de compensar la capacidad paralela. Si la fase constante del cristal y el paralelismo entre los cambios de frecuencia medidos con el oscilador y con el analizador son debidos al efecto de la compensación de la capacidad, entonces C_0 tendrá que ser aproximadamente de 12pF . Los resultados de la comprobación práctica se muestran a continuación:

Tabla 6.10: Variación de la frecuencia de oscilación ($C_v=6,8\text{pF}$ y $C_\theta=12\text{pF}$)

Muestra	$\Delta f_{ANA}(\text{Hz})$	$\Delta f_{OSC}(\text{Hz})$
Agua	-2805	-3461
Glicerol 5%	-3103	-3713
Glicerol 15%	-3646	-4225
Glicerol 25%	-4210	-4679
Glicerol 35%	-6638	-6611
Glicerol 45%	-7274	-6885

Tabla 6.11: Resistencia dinámica y tensión AGC ($C_v=6,8\text{pF}$ y $C_\theta=12\text{pF}$)

Muestra	$R_m (\Omega)$	$V_{AGC}(\text{V})$
Agua	294,06	0,375
Glicerol 5%	319,4	0,403
Glicerol 15%	379,35	0,467
Glicerol 25%	446,79	0,532
Glicerol 35%	676,38	0,802
Glicerol 45%	749,1	0,874

Tabla 6.12: Fase de oscilación ($C_v=6,8\text{pF}$ y $C_\theta=12\text{pF}$)

Muestra	Fase ($\phi(^{\circ})$)
Agua	-27,86
Glicerol 5%	-27,36
Glicerol 15%	-27,39
Glicerol 25%	-27,15
Glicerol 35%	-28,13
Glicerol 45%	-28,45

Tabla 6.13: Valores de los elementos del modelo eléctrico del cristal ($C_v=6,8\text{pF}$ y $C_0=12\text{pF}$)

Muestra	R_m (Ω)	L_m (mH)	C_m (fF)	C_0 (pF)
Agua	294,06	8,0609	31,3595	12,479
Glicerol 5%	319,4	8,0111	31,791	12,64
Glicerol 15%	379,35	7,9862	31,893	12,194
Glicerol 25%	446,79	7,775	32,765	13,081
Glicerol 35%	676,38	7,9675	31,987	12,322
Glicerol 45%	749,01	7,8019	32,67	12,42

Las Figura 6.10 y Figura 6.11 representa los datos las Tabla 6.10 y Tabla 6.12, respectivamente.

La gráfica de fase (Figura 6.11), demuestra que la estabilidad en la fase no se debe a la compensación de la capacidad paralela, pues claramente se observa que en este caso la capacidad $C_0 = 12\text{pF}$, es diferente de la capacidad $C_v = 6,8\text{pF}$, en la rama de compensación capacitiva; por tanto, una capacidad $C_v = 6,8\text{pF}$, es capaz de mantener la fase de oscilación constante sin importar la capacidad C_0 del cristal. Más aun, los resultados obtenidos anteriormente llevaron a pensar que una fase estable influía en el paralelismo de la variación de la frecuencia medida con el oscilador y el analizador, pero como se puede observar en la Figura 6.10, mientras la fase es aproximadamente constante, las respuestas en frecuencia no se mantiene paralelas; por tanto, el paralelismo en las respuesta no es un efecto más de la compensación, sino que es producto de la fase de oscilación del cristal ($\varphi = -28^\circ$), para un determinado rango de R_m .

Estos resultados se pueden comprobar, al calcular la respuesta del cristal ($\Delta\omega_{\text{qs}}$ y Δf_{qs}) para este caso.

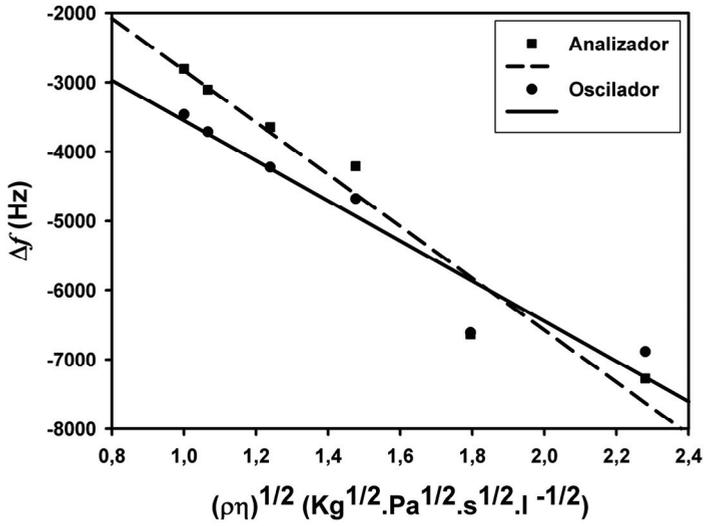


Figura 6.10: Concentración vs. Variación de frecuencia ($C_v=6,8\text{pF}$ y $C_\theta=12\text{pF}$)

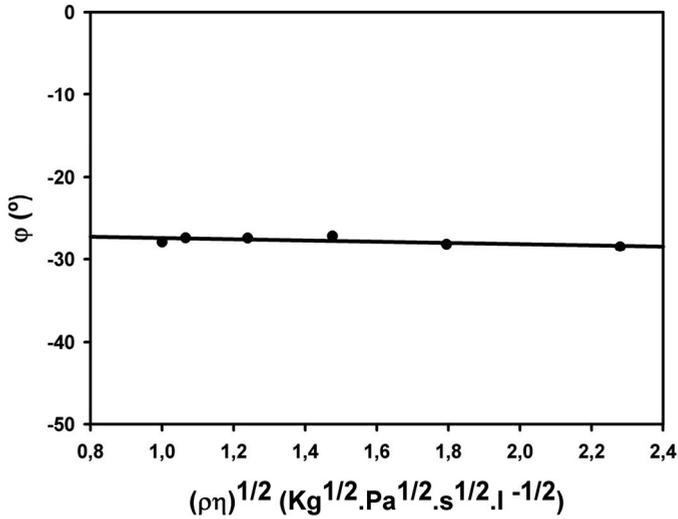


Figura 6.11: Concentración vs. Fase de oscilación ($C_v=6,8\text{pF}$ y $C_\theta=12\text{pF}$)

Tabla 6.14: Valores calculados para el caso en que cristal $C_v=6,8\text{pF}$ y $C_\theta=12\text{pF}$ ($\varphi=-27$)

$R_m (\Omega)$	$\Delta\omega_\varphi (\text{rad/s})$	$\Delta\omega_s (\text{rad/s})$	$\Delta f_{\varphi s} (\text{Hz})$
245	-18594	-14055	-722
275	-20549	-15776	-760
330	-23965	-18931	-801
401	-28058	-23004	-804
550	-35477	-31552	-625
608	-37918	-34880	-484
731	-42164	-41936	-36
850	-44843	-48763	624
1000	-45286	-57368	1923

La Figura 6.12 representa los datos de la Tabla 6.14

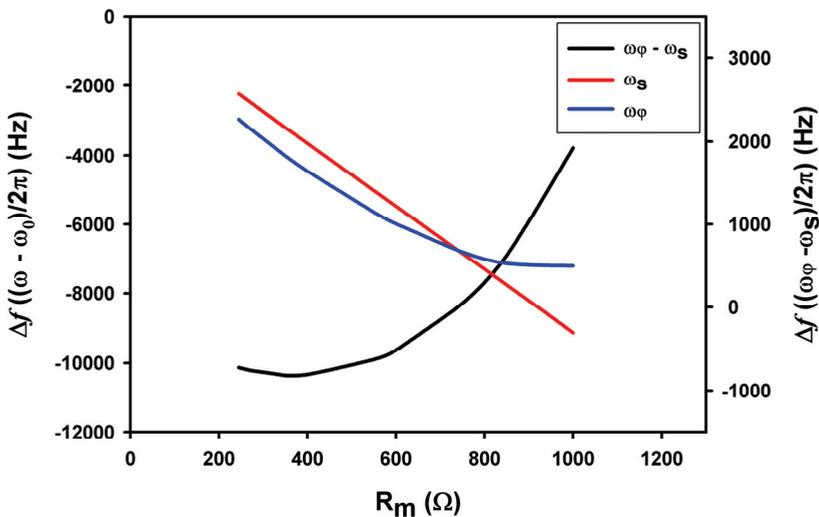


Figura 6.12: Resistencia dinámica vs. Frecuencia calculada para el caso en que $C_v=6,8\text{pF}$ y $C_\theta=12\text{pF}$.

La Figura 6.12 muestra la tendencia teórica de la diferencia de frecuencia a una determinada fase y la frecuencia al máximo de la conductancia para un cristal de 10MHz con una capacidad $C_0=12\text{pF}$, como el usado en el experimento. Los datos calculados corroboran los datos experimentales. El posible paralelismo entre las diferencias de frecuencias medidas con los dos sistemas de caracterización, no es un efecto de la compensación capacitiva. Los resultados de la simulación numérica del comportamiento de δ para una configuración del circuito oscilador con rama de compensación capacitiva y un condensador de compensación $C_v=6,8\text{pF}$, con un cristal de 10 MHz y un capacidad paralela del cristal $C_0=12\text{pF}$, se pueden observar en la Tabla 6.15.

Tabla 6.15: Resultados simulación de un oscilador con $C_v=6.8\text{pF}$ y $C_0=12\text{pF}$

$\varphi_{\text{qcm}} (^{\circ})$	$R_m (\Omega)$	$\varphi_c (^{\circ})$	A (V)	B (V)	$\alpha (^{\circ})$	$\beta (^{\circ})$	$\delta (^{\circ})$
26,5	220	-22	0,8	0,075	4,5	80	-0,78
26,5	300	-19	0,8	0,099	7,5	80	0,53
26,5	340	-18	0,8	0,110	8,5	80	0,70
26,5	440	-16	0,8	0,139	10,5	80	0,65
26,5	640	-13	0,8	0,196	13,5	80	-0,51
26,5	750	-10	0,8	0,230	16,5	80	0,09

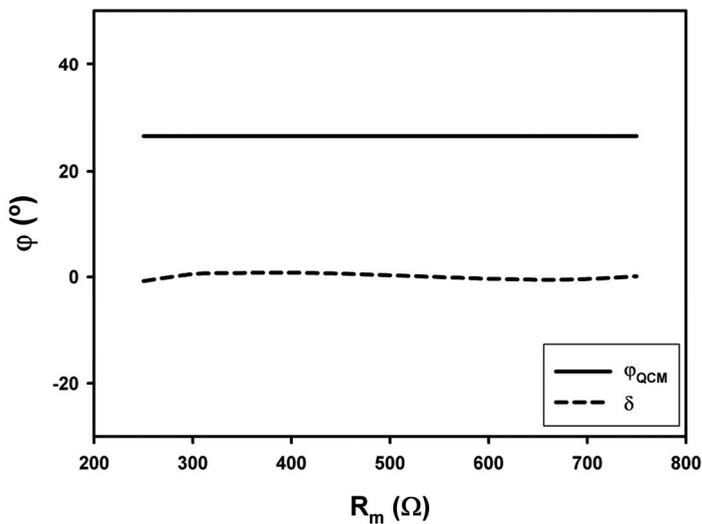


Figura 6.13: Representación gráfica de los resultados de simulación de la Tabla 6.15

Por los resultados anteriores (Tabla 6.15 y Figura 6.13), se puede concluir que la oscilación del cristal a una fase aproximadamente constante y el paralelismo entre los cambios de frecuencia medidos con el analizador y los medidos con el oscilador, no se deben a la compensación de la capacidad paralela, como se pudo haber llegado a pensar en algún momento; puesto que, queda claro con esta prueba, que la capacidad paralela del cristal no fue compensada, ya que en la rama de compensación C_v tiene un valor de 6,8pF, diferente al valor de la capacidad paralela del cristal para este caso ($C_0=12\text{pF}$). Si C_v estuviera compensando la capacidad paralela del cristal, se debería cumplir que $C_v \approx C_0$. Condición que no se está cumpliendo. Aun más, si la capacidad paralela se estuviese compensando, se debería cumplir la ecuación (3.7), que como hemos observado a través de las ecuaciones (3.19), (3.21) y (3.22), no se ha cumplido.

Aunque la rama de compensación fue diseñada para compensar la capacidad paralela, lo que realmente está sucediendo es que la capacidad C_v compensa los desfases generales del circuito para diferentes ganancias y para este caso un condensador de 6,8pF aporta la fase suficiente para compensar los desfases del circuito, permitiendo que el cristal oscile a una fase aproximadamente constante para un rango determinado de cargas o de resistencias R_m . En algunos trabajos anteriores sobre osciladores se ha compensado la fase, como en el circuito de Martin, donde se usa una inductancia variable [Martin et al. 1997] y en el trabajo de D.M. Soares que usa una resistencia en paralelo con un condensador [Soares et al. 1994].

6.3 Inmunosensor

Se ha desarrollado un inmunosensor piezoeléctrico para la detección del insecticida Carbaryl, usando el oscilador diseñado como método de caracterización.

Los Resultados obtenidos se pueden comparar con trabajos previos del grupo [March et al. 2009d], que han usado el mismo tipo de ensayo, los mismos reactivos, pero, utilizando en ese caso el Maxtek-RQCM como instrumento de caracterización y haciendo todo los ensayos a temperatura ambiente.

En nuestro caso, la velocidad de flujo de trabajo ha disminuido en comparación con el trabajo anterior, se paso de trabajar a una velocidad de 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ a una velocidad de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$; este cambio en la velocidad sugiere aumentar en un 45% la caída de la señal máxima, sin influir en el tiempo total de ensayo que continua siendo de 20 minutos, igual que el reportado por March [March et al. 2009c]. La posibilidad de disminuir la velocidad de flujo no es sólo debida al método de caracterización sino, además, a una nueva celda de

flujo con menor volumen, al mejoramiento de los sistemas de fluidica, al control de temperatura, a la optimización de los procesos del ensayo y al diseño de un protocolo de ensayo acorde a las prestaciones del nuevo inmunosensor.

Los resultados del inmunosensor basado en oscilador obtenidos en esta tesis, se pueden comparar con los reportados por March [March et al. 2009b] en tres aspectos:

- Límite de detección (LOD): En nuestro caso el LOD es de $6,5\mu\text{g/l}$, mientras que en March el LOD es de $11\mu\text{g/l}$.
- Rango lineal de trabajo: En la presente tesis, rango lineal de trabajo se establece entre $11\mu\text{g/l}$ - $42\mu\text{g/l}$; en el trabajo de March el rango lineal de trabajo es $15\mu\text{g/l}$ a $53\mu\text{g/l}$.
- I_{50} : generalmente la I_{50} es aceptada como un indicador de la sensibilidad, en nuestro caso $I_{50}=24\mu\text{g/l}$, mientras que en March $I_{50}=30\mu\text{g/l}$.

Los niveles de concentración del límite de detección y la I_{50} , indican que se ha aumentado la sensibilidad del sistema, comparado con los trabajos realizados anteriormente por el grupo.

Se puede observar el aumento de la sensibilidad en la medida comparando el inmunosensor desarrollado con otros biosensores basados en QCM para la detección de Carbaryl, como por ejemplo: el desarrollado por J.M. Abad y colaboradores, que tiene un $\text{LOD}=20,1\mu\text{g/l}$ [J.M.Abad et al. 1998]; el trabajo de N.G Karousos y colaboradores, con una $\text{LOD}=3\text{mg/l}$ [Karousos et al. 2002] y el trabajo de W. Yao y colaboradores, con una $\text{LOD}=12,5\mu\text{g/l}$ [W.Yao et al. 2009].

El biosensor basado en QCM desarrollado por N. Kim y colaboradores [Namsoo Kim et al. 2007] para la detección de carbamatos ofrece un $\text{LOD}=0,26\mu\text{g/l}$. Esta mayor sensibilidad no se debe al método de caracterización sino a la bioquímica asociada al biosensor; este trabajo se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa y no en inmunoensayos como en nuestro caso.

A pesar de que el aumento en la sensibilidad es evidente, no es suficiente. Para una mayor sensibilidad es necesario trabajar con cristales de frecuencia fundamental superior a 10MHz. Este oscilador ha sido diseñado para que con muy pocos cambios (solo cambiando la red R-L-C), pueda funcionar como método de caracterización de cristales de alta frecuencia (50-150MHz), su funcionamiento ha sido probado con cristales de 50MHz, en aire.

La Figura 6.14, muestra la respuesta del oscilador, configurado para trabajar a 50MHz. En esta prueba solo se quería observar el funcionamiento del oscilador y la estabilidad de la respuesta del cristal en aire.

De las pruebas realizadas con el oscilador a 50 MHz se pudo observar que el punto crítico de usar este tipo de interfaz como método de caracterización es la estabilidad, que a medida que se aumenta la frecuencia se hace cada vez más inestable, como se puede observar en la Figura 6.14. Con el cristal en aire y con el circuito aparentemente estable, se lograban medir hasta 400Hz de fluctuación de la señal, que a nuestra manera de ver es una inestabilidad importante, sobre todo cuando el cristal está al aire, ya que se supone que las inestabilidades aumentarán al reducir el factor de calidad cuando el cristal entre en contacto con un líquido. La principal desventaja de usar este tipo de interfaz para implementar sistemas de HFF-QCM, es que además de aumentar la sensibilidad, también se aumenta la inestabilidad del sistema; en otras palabras, por un lado aumentamos sensibilidad pero por el otro disminuimos la resolución. Por tanto, la sensibilidad en la medida no solo depende de la frecuencia a la que estamos midiendo, sino que además depende de los instrumentos con los que estamos midiendo. Un oscilador permite aumentar la frecuencia de trabajo pero afecta la resolución de la medida. En conclusión a pesar de que los osciladores se pueden configurar para ser usados con cristales de alta frecuencia, a pesar de su bajo coste, de su simplicidad de diseño, y de su capacidad de integración, no son la mejor alternativa para la implementación de sistemas de caracterización de cristales piezoeléctricos de alta frecuencia debido a sus inestabilidades de frecuencia, que reducen la resolución en la medida.

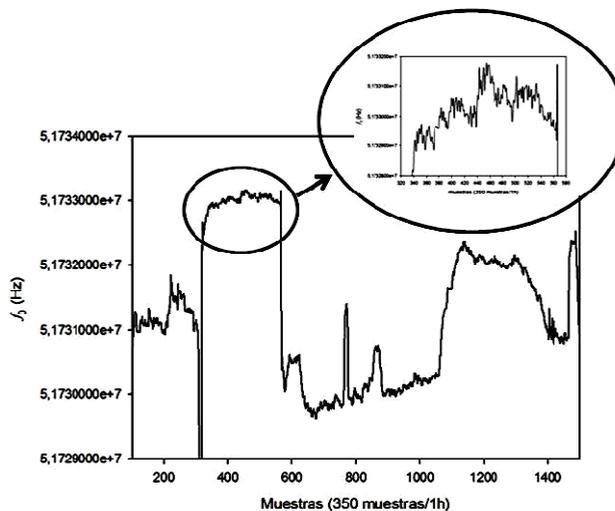


Figura 6.14: Respuesta del oscilador, con un cristal de cuarzo de 50 MHz.

A partir de los resultados que se han presentado en esta tesis del comportamiento del circuito oscilador (a 10MHz), y de las pruebas realizadas al

crystal de 50MHz, queda manifiesta la dependencia de la frecuencia con la fase de oscilación. Esta dependencia está representada por la pendiente de la respuesta fase-frecuencia del resonador y que supone que a un pequeño cambio de fase corresponde un pequeño cambio de frecuencia, cuando el cristal esta en aire; pero, cuando el cristal esta en líquido, la pendiente de la respuesta fase-frecuencia disminuye debido a la disminución del factor de calidad, entonces un pequeño cambio en la fase de oscilación produce un gran cambio en la frecuencia. Estos cambios en la fase se pueden deber a cambios en las propiedades del medio o del cristal de acuerdo al experimento que se esté realizando o también a perturbaciones ambientales. Las variaciones de la fase dan lugar a inestabilidades en la frecuencia de oscilación, que luego aparecen como ruido en la medida, produciendo pérdida de resolución.

Como hemos observado, el hecho de que los sistemas osciladores dependan tanto de la fase de oscilación es una clara desventaja con respecto a otros sistemas de caracterización; pero en la actualidad (como lo indica el estado del arte) solo existen dos métodos de caracterización para cristales de alta frecuencia: el analizador de impedancias y los osciladores. Por tanto, es necesario buscar otra alternativa de caracterización, que permita el uso de cristales de alta frecuencia.

Se puede pensar que la solución a los problemas de estabilidad se limita controlando la fase de oscilación, pero controlar la fase no es tan sencillo, además la electrónica asociada para realizar esta tarea generalmente es compleja, lo cual limita las aplicaciones.

En conclusión para subir en frecuencia es necesario disponer de un nuevo método de caracterización que no esté gobernado por la fase o que limite la dependencia de la frecuencia con la fase. Controlar la fase de oscilación a alta frecuencia no es fácil, pero, ¿qué pasa si en lugar de controlar la fase, más bien se controla la frecuencia y se observan las variaciones de la fase?

CAPÍTULO IV:
APORTACIÓN II:
DETECCIÓN DE FASE

CAPÍTULO IV: DETECCIÓN DE FASE

Los métodos de caracterización de cristales piezoeléctricos usados hasta el momento, utilizan el seguimiento de la variación de la frecuencia de resonancia como uno de sus parámetros de medida; esto es debido a la existencia de una relación directa entre la variación de la frecuencia del resonador y alguno de los parámetros físicos de interés a determinar: cambio de masa o variaciones de las propiedades del fluido en contacto con el cristal. Esta relación es conocida como la ecuación de Martin (ecuación (4.1)) [Martin et al. 1991b]:

$$\Delta f = -\frac{2f_s^2}{Z_{cq}} \left(\rho_c h_c + \frac{1}{2} \rho_L \delta_L \right) \quad (4.1)$$

En la ecuación (4.1) el primer término dentro del paréntesis corresponde al efecto de Sauerbrey [Sauerbrey 1959] y el segundo término al efecto de Kanazawa [Kanazawa et al. 1985], donde:

f_s : Frecuencia de resonancia del cristal.

Z_{cq} : Impedancia acústica característica del cuarzo.

ρ_c : Densidad del recubrimiento.

h_c : Grosor del recubrimiento.

ρ_L : Densidad del líquido en contacto con el cristal.

δ_L : Profundidad de penetración de la onda acústica en el líquido.

La ecuación (4.1) indica que la sensibilidad de la QCM aumenta con el cuadrado de la frecuencia de resonancia, esta afirmación es cierta en el caso ideal donde el resonador se ajusta a un modelo unidimensional y los efectos de contorno sobre los electrodos depositados sobre el resonador son despreciables; esto es más aproximado conforme aumenta la superficie de los electrodos. Además, dicha ecuación no incluye los efectos del medio en el que opera el

resonador, es decir, el factor de calidad del mismo; por tanto, aunque es cierto que la sensibilidad, definida como la variación en la frecuencia por unidad de masa depositada uniformemente sobre el sensor, aumenta en el cuadrado de la frecuencia, ello no implica necesariamente un aumento correspondiente de la resolución, que es en definitiva el parámetro de interés. Para ello sería necesario tener un nivel de ruido idealmente nulo, y una resolución infinita del sistema de medida o caracterización utilizado. En efecto, como se ha observado en el trabajo de Stehrer [Stehrer et al. 2009] y en el capítulo III (Aportación I: Oscilador), de esta tesis, la frecuencia de oscilación no es estable; además, la inestabilidad aumenta conforme aumenta la frecuencia. La estabilidad de la frecuencia depende de dos aspectos fundamentales: “la puesta a punto del experimento”, entendiéndose ésta como la capacidad que se tiene para disminuir los efectos de las posibles perturbaciones físicas ajenas al sensor resonante, como la temperatura, las vibraciones, los cambios de presión de la bomba peristáltica, etc., que afectan directamente a la frecuencia de resonancia; y “el sistema de caracterización” donde la estabilidad depende de la técnica de medida de los parámetros de interés. Si asumimos que la puesta a punto del experimento es controlada al máximo, la estabilidad de la frecuencia dependerá únicamente del sistema y el método de caracterización.

Durante este trabajo se han analizado los diferentes sistemas de medida que permiten caracterizar resonadores sensores de alta frecuencia, como el analizador de impedancias, que destaca por su precisión en la medida de la MSRF, pero que por su elevado coste y gran volumen, así como por su dificultad para utilizarse en sistemas multianálisis, queda relegado a un uso en entornos de laboratorio como instrumento de referencia. La otra técnica que permite, de forma simple, ser adaptada a sensores de de alta frecuencia es la basada en sistemas osciladores, donde destaca por su alta capacidad de integración, reducido tamaño, bajo coste y facilidad de monitorización continua de la frecuencia de oscilación. Como se observó en el Capítulo III (Aportación I: Oscilador), un oscilador pueden ser usado como interfaz en una aplicación real como por ejemplo un inmunosensor piezoeléctrico, pero en aplicaciones donde el propósito es aumentar la sensibilidad, a través del empleo de resonadores de alta frecuencia, el aumento de la inestabilidad en la frecuencia de oscilación que ocurre con esta técnica, hace aumentar el ruido en la señal y disminuir la resolución en la medida; en definitiva el aumento de la sensibilidad no se ve reflejado en un aumento correspondiente de la resolución, tal y como teóricamente era de esperar.

En general, la inestabilidad de la frecuencia en un oscilador es debida a la dependencia que tiene la frecuencia con la fase de oscilación (condición de fase de los osciladores). Por esta razón se utilizan cristales de cuarzo para estabilizar la frecuencia en osciladores convencionales. En efecto, la gran pendiente de la curva fase-frecuencia de los cristales resonantes en vacío o en aire, hace que las

variaciones de fase producidas por el resto del circuito oscilador, debidas a efectos externos al sensor, sean compensadas con variaciones muy pequeñas de la frecuencia, aumentando la estabilidad en frecuencia del oscilador. Sin embargo, la pendiente de la curva fase-frecuencia, o lo que es lo mismo el factor de calidad del sensor, depende del medio en que opera el resonador, y va disminuyendo a medida que se aumenta la densidad y la viscosidad del fluido en contacto. Este es el caso de los biosensores, donde el sensor está en contacto con un medio líquido; en estas circunstancias el factor de calidad del resonador se ha reducido enormemente y su capacidad para compensar las perturbaciones de fase debidas a efectos externos tales como: temperatura, presión, cambios en las magnitudes de corriente en el circuito, etc., se ve enormemente reducida. Más aún, en estas circunstancias el objeto del sensor no es compensar efectos externos sino que debería ser el objeto del circuito seguir las variaciones del sensor debidas a los efectos físicos de interés, es decir, se debería contar con un oscilador ideal para que las variaciones en la frecuencia de oscilación fueran debidas exclusivamente a variaciones en la respuesta fase-frecuencia del sensor y no al revés. La Figura 3.10, representa gráficamente esta problemática. Las variaciones en la fase debidas a las perturbaciones ocurren continuamente y cambian la frecuencia de oscilación generando un ruido que se conoce como inestabilidad de la frecuencia. Este análisis pone de manifiesto que las variaciones de la fase de oscilación debidas a la inestabilidad de fase inherente a las distintas partes que forman el circuito oscilador, son el origen de las inestabilidades de la frecuencia; este ruido de fase aumenta con la frecuencia en los circuitos electrónicos y, por la propia filosofía de funcionamiento de un oscilador, el cristal resonante tenderá a compensar dicho ruido de fase modificando su condición de fase a través de un cambio en la frecuencia de oscilación, que será tanto mayor cuanto menor sea el factor de calidad del sensor, y éste se reduce con el aumento de frecuencia. En consecuencia, tanto los resultados obtenidos, como la propia filosofía de operación de los osciladores parecen demostrar que no son la mejor técnica para la caracterización de HFF-QCM. No obstante, es el único método que se utiliza en la actualidad [Bustabad et al. 2009; Stehrer et al. 2009b; Uttenthaler et al. 2001b].

Disponer de un nuevo método de caracterización que sirva de interfaz en sistemas basados en HFF-QCM y que disminuya las desventajas de los utilizados en la actualidad, es una necesidad. La nueva técnica de caracterización debe incluir como estrategia principal:

- que permita interrogar al resonador de forma pasiva mediante una fuente de gran estabilidad de frecuencia. Esto facilitará la separación de los cambios en la respuesta del sensor de los ruidos asociados al sistema de medida;

- que permita una fácil adaptación de cristales de diferente frecuencia de fundamental con pequeños cambios en el sistema;
- que tenga alta capacidad de integración;
- que sea de bajo coste; y
- que sea fácilmente adaptable a sistemas multiarray de sensores.

Este capítulo presenta la primera contribución al desarrollo de un nuevo método y concepto de sistema de caracterización de QCM, especialmente para aplicaciones de biosensores.

7 MÉTODOS

7.1 *Método de Caracterización: Detección de Fase*

7.1.1 *Principio de Funcionamiento*

Como se ha visto a lo largo de este trabajo, las variaciones de la fase de oscilación constituyen la principal causa de las inestabilidades de la frecuencia de oscilación; una forma de disminuir las fluctuaciones de la frecuencia sería controlando la fase, pero controlar la fase no es tan fácil y, además, el sistema solo funcionaría a la frecuencia para la cual fue diseñado. Si se desea trabajar con cristales a diferentes frecuencias fundamentales de resonancia, el circuito controlador de fase cambiaría completamente, aumentando su complejidad en la misma medida en que aumenta la frecuencia; esto obliga a cambiar de sistema de caracterización cada vez que se quiera cambiar la frecuencia fundamental de resonancia. La dificultad de estabilizar la fase de oscilación obliga a pensar el problema desde otro punto de vista y a plantearnos una nueva metodología, donde en lugar de controlar la fase, más bien se controla la frecuencia.

Esta nueva técnica consiste en interrogar al cristal a una frecuencia fija muy estable y medir los cambios de la fase del sensor; se supone que la variación de la fase está relacionada con los procesos que están ocurriendo en la superficie del cristal, como por ejemplo la variación de la densidad superficial de masa.

La ventaja de este enfoque es que el sensor es considerado un elemento pasivo y puede ser interrogado con una fuente externa de señal muy estable (tanto como sea posible).

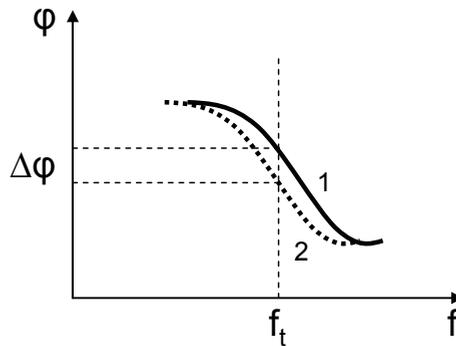


Figura 7.1: Representación grafica del cambio de fase ($\Delta\phi$), cuando el cristal es interrogado a una frecuencia fija (f_t).

La Figura 7.1 muestra el enfoque descrito anteriormente, donde la respuesta en fase del sensor en el estado inicial o referencia es representada por la curva 1 y la respuesta en fase del sensor en el segundo estado, se representa por la curva 2. Si el sensor es continuamente interrogado con una apropiada frecuencia de test (f_t), los cambios en la respuesta en fase del resonador podrán ser seguidos por el cambio en la fase ($\Delta\phi$) de la señal de frecuencia f_t . Estos cambios de fase pueden ser fácilmente monitorizados con un circuito simple como el mostrado en la Figura 7.2; donde el multiplicador es usado como un detector de fase.

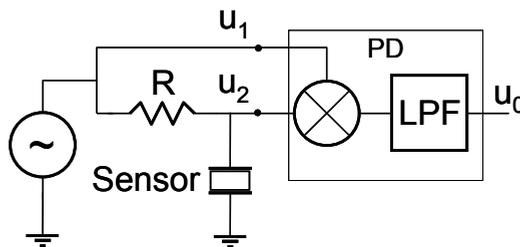


Figura 7.2: Sistema de medida de la variación de fase ($\Delta\phi$).

Un esquema más especializado que aplique este concepto para caracterizar los cristales de cuarzo será mostrado más adelante.

Además del sistema electrónico de medida que aplique este nuevo concepto de caracterización, es necesario establecer una relación matemática que defina el aumento de la densidad superficial de masa, a partir de la variación de la fase.

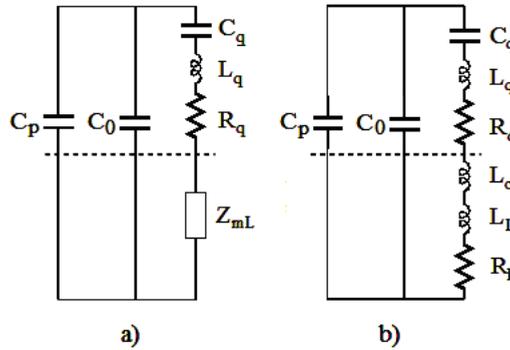


Figura 7.3: a) Modelo del sensor QCM. b) Modelo del sensor recubierto por una fina y rígida capa, en contacto con un líquido newtoniano semi-infinito

7.1.2 Relación Matemática de la Variación de Fase vs el Cambio de la Densidad Superficial de Masa del Recubrimiento del Cristal

Antes de realizar una deducción de la ecuación de fase en relación al cambio de masa, y para no perder el hilo de la demostración, es aconsejable volver a reescribir y recordar algunas ecuaciones que fueron introducidas al comienzo de esta tesis, en relación a las bases teóricas del QCM.

7.1.2.1 Bases Teóricas

El modelo eléctrico del resonador de cuarzo, retomado de la Figura 1.2, se muestra de nuevo en la Figura 7.3a, donde, L_q , R_q y C_q representan al sensor sin carga, C_0 es la capacidad estática del cristal, C_p es la capacidad parásita externa al resonador y Z_{mL} representa la contribución de la carga en la impedancia del sensor. La admitancia del cristal de cuarzo se puede escribir como:

$$Y = \frac{1}{Z} = j\omega C_0^* + \frac{1}{Z_m} \quad (4.2)$$

Donde:

$C_0^* = C_0 + C_p$: capacidad paralela del cristal.

ω : Frecuencia angular de la señal.

$Z_m = Z_{mq} + Z_{mL}$: Impedancia de la rama dinámica del cristal.

Z_{mq} : Impedancia del circuito serie formado por L_q , R_q y C_q .

El valor aproximado de Z_{mL} se puede definir de acuerdo a la siguiente expresión [Lucklum et al. 2008].

$$Z_{mL} \approx \frac{1}{\omega C_0} \frac{\alpha}{4K_0^2} \frac{Z_L}{Z_{cq}} = K_t Z_L \quad (4.3)$$

Donde:

K_0 : Factor de acoplo electromecánico.

α : Fase de la onda acústica a través del cuarzo.

Z_L : Impedancia acústica de la carga.

Z_{cq} : Impedancia característica del cuarzo.

Los parámetros L_q , R_q , C_q , C_0 , K_0 y Z_{cq} dependen de las propiedades intrínsecas del cuarzo (ver Tabla 1.1) y algunos de ellos se definen de acuerdo a las ecuaciones (1.7), (1.8) y (1.9). Mientras que otros se definen de acuerdo a las siguientes ecuaciones [Arnaú et al. 2008; Lucklum et al. 2008]:

$$L_q = \frac{\rho_q h_q^3}{8A_s e_{26}^2} \quad (4.4)$$

$$K_0^2 = \frac{e_{26}^2}{\epsilon_{22} \bar{c}_{66}} \quad (4.5)$$

$$Z_{cq} = \sqrt{\rho_q \bar{c}_{66}} = \rho_q \sqrt{\frac{\bar{c}_{66}}{\rho_q}} = \rho_q v_q \quad (4.6)$$

$$\alpha = h_q \omega \sqrt{\frac{\rho_q}{\bar{c}_{66}}} \quad (4.7)$$

$$K_t = \frac{\alpha}{4K_0^2 \omega C_0 Z_{cq}} = \frac{h_q^2}{4e_{26}^2 A_s} \quad (4.8)$$

$$R'_L = \sqrt{\frac{\omega \rho_L \eta_L}{2}} = \frac{\omega}{2} \rho_L \sqrt{\frac{2\eta_L}{\omega \rho_L}} = \frac{\omega}{2} \rho_L \delta_L \quad (4.9)$$

$$\delta_L = \sqrt{\frac{2\eta_L}{\omega\rho_L}} \quad (4.10)$$

$$\omega = \frac{\pi v_q}{h_q} \quad (4.11)$$

$$v_q = \sqrt{\frac{\bar{c}_{66}}{\rho_q}} \quad (4.12)$$

$$h_q = \frac{v_q}{2f_0} \quad (4.13)$$

Donde:

h_q : Grosor del cristal.

A_s : Área del electrodo.

η_q : Viscosidad efectiva del cuarzo.

v_q : Velocidad de propagación de la onda.

ρ_q : Densidad del cuarzo.

e_{26} : Constante piezoeléctrica.

ϵ_{22} : Permitividad del cuarzo.

ρ_L : Densidad del líquido en contacto con el cristal.

η_L : Viscosidad del líquido en contacto con el cristal.

δ_L : Profundidad de penetración de la onda acústica en el líquido.

Las propiedades físicas y geométricas de la carga depositada sobre el cristal, son incluidas en la impedancia acústica de la carga Z_L . Cuando una de las caras del cristal está recubierta por una capa delgada y rígida, en contacto con un líquido newtoniano, la expresión de Z_L puede aproximarse a [Lucklum et al. 2008]:

$$Z_L = j\omega\rho_c h_c + (1+j)\sqrt{\frac{\omega\rho_L\eta_L}{2}} \quad (4.14)$$

Si definimos,

$$m_c = \rho_c h_c \quad (4.15)$$

$$m_L = \frac{\rho_L \delta_L}{2} \quad (4.16)$$

Donde:

m_c : densidad superficial de masa del recubrimiento; y

m_L : densidad superficial de masa equivalente del líquido en contacto con el cristal, asociada al movimiento oscilatorio de la superficie del sensor;

La ecuación (4.14) se puede escribir como:

$$Z_L = m_L \omega + j \omega (m_c + m_L) \quad (4.17)$$

A partir de las ecuaciones (4.14) y (4.17) el modelo equivalente de cristal de cuarzo de la Figura 7.3a, se convierte en el modelo de la Figura 7.3b; donde la contribución de la carga en la rama dinámica, es representada por la inductancia L_c que representa los efectos inerciales del recubrimiento y por el circuito serie $L_L - R_L$ que representan, respectivamente, los efectos inerciales de la masa equivalente del líquido al ser desplazada por el movimiento oscilatorio de la superficie del sensor y el correspondiente efecto de las pérdidas.

Por consiguiente, en algunas aplicaciones, como por ejemplo los biosensores piezoeléctricos, donde los efectos de la capa de recubrimiento y el líquido sobre la impedancia acústica pueden ser considerados aditivos; y de acuerdo a las ecuaciones (4.14) y (4.17), la impedancia dinámica del cristal cargado Z_m se puede escribir como:

$$Z_m = R_m + jX_m = R_q + R_L + j \left(\omega (L_q + L_c + L_L) - \frac{1}{\omega C_q} \right) \quad (4.18)$$

Donde:

$$L_c = K_t m_c \quad (4.19)$$

$$R_L = \omega K_t m_L \quad (4.20)$$

$$L_L = K_t m_L \quad (4.21)$$

A partir de la ecuación (4.18), se puede deducir una expresión que relacione las variaciones de la frecuencia de resonancia serie dinámica (MSRF) con los cambios de la carga. La frecuencia angular de resonancia serie dinámica, se puede obtener de la siguiente expresión (para un resonador sin carga):

$$\omega_s^2 = \frac{1}{C_q L_q} \quad (4.22)$$

Por consiguiente una variación de la frecuencia angular puede ser obtenida al derivar ambos miembros de la ecuación (4.22), como sigue:

$$\Delta\omega_s = -\frac{\omega_s}{2L_q} \Delta L \quad (4.23)$$

Donde:

$$\Delta L = K_t (m_c + m_L) \quad (4.24)$$

Reemplazando las ecuaciones (4.4), (4.8) y (4.24) en la ecuación (4.23) y resolviendo para f_s , se obtiene la siguiente expresión:

$$\Delta f_s = -\frac{2f_s^2}{Z_{cq}} (m_c + m_L) \quad (4.25)$$

La expresión (4.25) relaciona la variación de la frecuencia de resonancia serie dinámica y la variación de la masa sobre la superficie del cristal, y es correspondiente a la ecuación (4.1).

A partir de las ecuaciones anteriores se podrá establecer una relación que represente la respuesta en fase del cristal debida a los cambios que experimenta la carga; como se observará a continuación.

7.1.2.2 Ecuación de Fase

En la siguiente deducción se asume que las propiedades del líquido en contacto con el cristal cambian muy poco, esto quiere decir que la resistencia dinámica del cristal no cambia y que la pendiente de la respuesta fase-frecuencia se mantiene constante. Estas restricciones son validas para una gran cantidad de aplicaciones, como por ejemplo los biosensores piezoeléctricos.

De acuerdo al modelo equivalente de la Figura 7.3b y a la ecuación (4.18), los cambios en la respuesta fase-frecuencia del sensor, debidos a los pequeños cambios de la masa en el recubrimiento, son una consecuencia del cambio en la respuesta fase-frecuencia de la impedancia dinámica del cristal Z_m . Una expresión aproximada para el cambio de fase que sufre una señal de frecuencia constante (f_i) cercana a la MSRF (f_s), debida a los cambios de la impedancia dinámica, como producto de las variaciones de masa ocurridas en el recubrimiento del cristal, es obtenida a continuación.

En el momento inicial, la fase de la rama dinámica del cristal, de acuerdo a la ecuación (4.18), se puede escribir como:

$$\varphi_1 = \arctan \frac{X_{m1}}{R_{m1}} \quad (4.26)$$

En las proximidades de la frecuencia de resonancia serie dinámica (MSRF), la X_m es muy pequeña y la tangente se puede aproximar a la fase, por lo tanto:

$$\varphi_1 \approx \frac{X_{m1}}{R_{m1}} \quad (4.27)$$

Tras un cambio de masa en el recubrimiento, la nueva fase de acuerdo a la ecuación (4.27),

$$\varphi_2 \approx \frac{X_{m2}}{R_{m1}} \quad (4.28)$$

Como R_{m1} no cambia, la variación de fase vendrá dada por:

$$\Delta\varphi = \varphi_1 - \varphi_2 = \frac{X_{m1} - X_{m2}}{R_{m1}} \quad (4.29)$$

Por otro lado, a la frecuencia de test (f_t), X_m , se puede definir como:

$$X_m = L_m \omega_t - \frac{1}{C_m \omega_t} \quad (4.30)$$

Donde (de acuerdo a la ecuación (4.18)):

$$\begin{aligned} L_m &= L_q + L_c + L_L \\ C_m &= C_q \end{aligned} \quad (4.31)$$

Una aproximación para X_m , se puede escribir de la siguiente manera:

$$X_m = \frac{1}{C_m \omega_t} \left(\frac{\omega_t^2}{\omega_s^2} - 1 \right) \approx \frac{2\Delta\omega}{C_m \omega_s^2} \quad (4.32)$$

Donde, $\Delta\omega = \omega_t - \omega_s$.

Reemplazando la ecuación (4.32) en (4.29), la variación de fase estaría dada por:

$$\Delta\varphi = \frac{2(\Delta\omega_1 - \Delta\omega_2)}{R_{m1}C_m\omega_s^2} = \frac{2(\omega_{s2} - \omega_{s1})}{(R_q + R_L)C_m\omega_s^2} \quad (4.33)$$

Si, $\Delta\omega_s = \omega_{s2} - \omega_{s1}$, entonces la ecuación (4.33), se puede escribir como:

$$\Delta\varphi = \frac{2\Delta\omega_s}{(R_q + R_L)C_q\omega_s^2} \quad (4.34)$$

Ahora bien, los cambios en la frecuencia angular de resonancia serie dinámica, debido a los cambios de masa, se pueden escribir de acuerdo a la ecuación (4.25), como:

$$\Delta\omega_s = -\frac{\omega_s^2}{\pi Z_{cq}} \Delta m_c \quad (4.35)$$

Y reemplazando la ecuación (4.35) en la ecuación (4.34), tenemos una ecuación previa que relaciona los cambios de la fase con la variación de la masa del recubrimiento.

$$\Delta\varphi = -\frac{2}{(R_q + R_L)C_q\pi Z_{cq}} \Delta m_c \quad (4.36)$$

Se puede determinar una relación para R_L , que este en función del medio en contacto con el cristal.

$$R_L = K_t R'_L = \frac{\alpha \rho_L \delta_L}{8K_0^2 C_0 Z_{cq}} \quad (4.37)$$

$$R_L = \frac{\pi v_q h_q \rho_L \delta_L}{8e_{26}^2 A}$$

Reemplazando las ecuaciones (4.37), (4.6), (1.9) y (1.8) en la ecuación (4.36), tenemos:

$$\Delta\varphi = -\frac{2\Delta m_c}{\frac{\pi \eta_q}{v_q} + \rho_L \delta_L} \quad (4.38)$$

Si, definimos:

$$m_q = \frac{\eta_q \pi}{2\nu_q} \quad (4.39)$$

Y reemplazando las ecuaciones (4.39) y (4.16) en la ecuación (4.38), queda definitivamente:

$$\Delta\varphi(\text{rad}) = -\frac{\Delta m_c}{m_q + m_L} \quad (4.40)\text{a}$$

Para cristales sensores en medio líquido $m_q \ll m_L$ y la ecuación anterior queda:

$$\frac{\Delta\varphi}{\Delta m_c} \approx -\frac{1}{m_L} \quad (4.40)\text{b}$$

Es decir, la sensibilidad de fase-masa es inversamente proporcional a la masa equivalente de líquido que mueve el sensor en su movimiento oscilante. Esta masa se reduce con la raíz cuadrada de la frecuencia. En consecuencia, la sensibilidad de fase-masa aumenta con la raíz cuadrada de la frecuencia; por tanto la resolución vendrá dada por el límite de detección de fase del sistema de medida.

Se ha obtenido una expresión matemática sencilla que relaciona las variaciones de la densidad superficial de masa en el recubrimiento con los cambios de fase de la señal a una frecuencia fija, que al mismo tiempo tiene en cuenta las propiedades del cristal y las características del medio en contacto con el sensor.

7.2 Sistema de Caracterización: Detector de Fase

7.2.1 Principio de Funcionamiento

El sistema de caracterización propuesto permite aplicar la metodología expuesta hasta el momento, donde su principio de funcionamiento se basa en interrogar al cristal con una apropiada señal externa de frecuencia fija muy estable, cercana a la frecuencia de resonancia y detectar las variaciones de la fase debidas al desplazamiento de la respuesta fase-frecuencia del sensor. Los cambios de la fase están relacionados con las variaciones de la densidad superficial de masa del recubrimiento, como indica la ecuación (4.40).

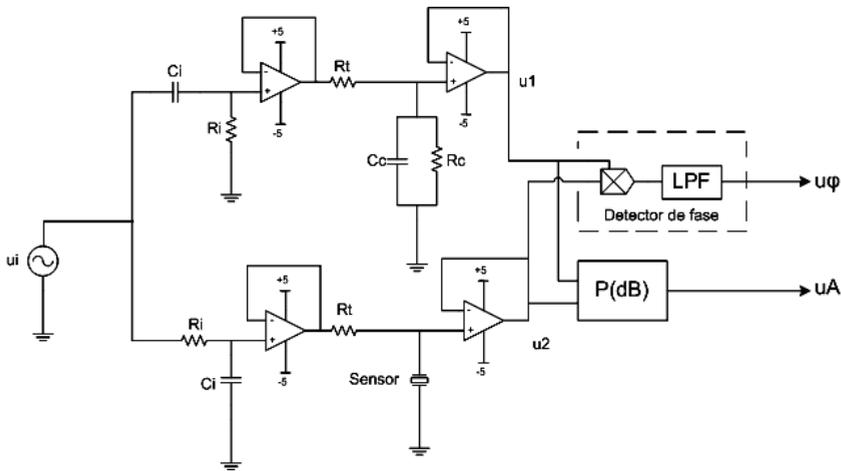


Figura 7.4: Diagrama de bloques del sistema propuesto para la caracterización de cristales de cuarzo de acuerdo al método del seguimiento de fase.

El diagrama de bloques de la Figura 7.4 muestra el esquema propuesto para el sistema de caracterización de QCM basado en el método de seguimiento de la fase; donde u_i representa a un generador de funciones externo. El circuito está formado por dos ramas paralelas idealmente iguales, pero desfasadas 90° . En una de las ramas está el sensor de cuarzo y en la otra rama un circuito equivalente formado por el paralelo entre la capacidad C_c y la resistencia R_c , que simula el sensor de cuarzo a la frecuencia de resonancia, los valores de C_c y R_c deben ser aproximadamente iguales a los valores de C_0 y R_m del cristal, respectivamente.

Los filtros paso bajos y paso altos formados por la resistencia R_i y el condensador C_i cumplen la función de desfasar la señal 90° , para un mejor funcionamiento del detector de fase, como se explicará más adelante.

Idealmente, si $C_c=C_0$ y $R_c=R_m$, las propiedades de los componentes electrónicos del circuito permanecen constantes y la frecuencia de la señal u_i es la frecuencia de resonancia del cristal, entonces las señales u_1 y u_2 serán iguales en forma y en amplitud pero desfasadas 90° , en este caso tanto la salida del detector de fase como la del detector de amplitud ($P(\text{dB})$) deberán ser cero. En el caso en que se produzca una variación de la densidad superficial de masa en el recubrimiento del cristal, la amplitud y la fase de la señal u_2 cambiarán, de acuerdo a la respuesta fase-frecuencia del sensor y por tanto la tensión a la salida de los detectores de fase y amplitud, tendrá un valor proporcional al cambio

producido en la señal u_2 . La tensión de salida del detector de fase se puede relacionar con la ecuación (4.40).

El detector de fase puede realizarse con un multiplicador en serie con un filtro paso bajo (LPF); en efecto, si u_1 y u_2 son señales sinusoidales de amplitud U_1 y U_2 , respectivamente, de frecuencia angular ω , y un desfase en la rama del cristal $90^\circ - \varphi_D$; entonces las señales u_1 y u_2 , se pueden escribir como:

$$\begin{aligned} u_1 &= U_1 \text{sen} \omega t \\ u_2 &= U_2 \text{sen}(\omega t + 90 - \varphi_D) \end{aligned} \quad (4.41)$$

Y la señal a la salida del multiplicador será:

$$u_1 * u_2 = \frac{U_1 U_2}{2} [\text{sen}(\varphi_D) - \cos(2\omega t - \varphi_D + 90)] \quad (4.42)$$

De esta manera, la señal a la salida del filtro pasa bajos será:

$$u_\varphi = \frac{U_1 U_2}{2} \text{sen}(\varphi_D) \quad (4.43)$$

Para pequeñas variaciones de fase y $k_m = U_1 U_2 / 2$, entonces la ecuación (4.43), se podrá escribir como:

$$u_\varphi = k_m \varphi_D \quad (4.44)$$

Se puede observar que la tensión de salida del detector de fase es proporcional a la variación de fase del cristal, para pequeñas variaciones de fase alrededor de 90° . Por la forma de operación del detector de fase, es conveniente que las señales estén desfasadas 90° , de ahí la importancia de los filtros pasivos paso bajo y paso alto formados por R_i y C_i . Además, al ser un sistema diferencial, el ruido de fase de la fuente de señal, afectará por igual a ambas ramas y será cancelado en el detector de fase.

El detector de amplitud (P(dB)) establece una relación entre las amplitudes de las señales u_1 y u_2 . Igual que en el detector de fase, el ruido de la fuente afecta por igual cada una de las ramas y se cancela en el detector de amplitud.

La combinación de la medida de fase y potencia permite realizar una completa caracterización del sensor, al mismo tiempo que permite seleccionar apropiadamente la frecuencia de medida de la señal u_i , en cada aplicación.

El principal parámetro a medir es la variación de fase entre las señales u_1 y u_2 , al estar relacionado con los cambios de la fase de la rama dinámica del sensor.

Las ecuaciones que gobiernan la operación del circuito sensor se obtienen a continuación:

$$u_1 = \frac{R_c}{R_t + R_c + j\omega R_t R_c C_c} \frac{j\omega R_t C_i}{1 + j\omega R_t C_i} u_i \quad (4.45)$$

$$u_2 = \frac{R_m + jX_m}{R_m + R_t - \omega C_0 X_m R_t + j(X_m + \omega C_0 R_m R_t)} \frac{1}{1 + j\omega R_t C_i} u_i \quad (4.46)$$

Suponiendo que los amplificadores operacionales se comportan como seguidores ideales.

A partir de las ecuaciones (4.45) y (4.46), es posible obtener una expresión para la variación de fase entre las señales u_1 y u_2 .

Si:

$$\varphi_t = \arctan \frac{\omega_t R_t R_c C_c}{R_t + R_c} \quad (4.47)$$

$$\varphi_i = \arctan \omega_t R_t C_i \quad (4.48)$$

$$\varphi_{Z_m} = \arctan \frac{X_m}{R_m} \quad (4.49)$$

$$\varphi_{Z_{mt}} = \arctan \frac{X_m + \omega_t C_0 R_m R_t}{R_m + R_t - \omega_t C_0 X_m R_t} \quad (4.50)$$

La fase de la señal u_1 y u_2 , respectivamente, se define como:

$$\varphi_1 = 90^\circ - \varphi_t - \varphi_i \quad (4.51)$$

$$\varphi_2 = \varphi_{Z_m} - \varphi_{Z_{mt}} - \varphi_i \quad (4.52)$$

La diferencia de fase entre las señales u_1 y u_2 es:

$$\varphi_2 - \varphi_1 = \varphi_{Z_m} - \varphi_{Z_{mt}} - 90 - \varphi_i \quad (4.53)$$

El cambio exacto de fase, desde un estado de referencia (estado 1), a un estado 2, teniendo en cuenta que la frecuencia de test es constante, esta dado como:

$$\Delta(\varphi_2 - \varphi_1)|_1^2 = \Delta(\varphi_{Z_m} - \varphi_{Z_{m1}})|_1^2 = \Delta\varphi_{Z_m}|_1^2 - \Delta\varphi_{Z_{m1}}|_1^2 \quad (4.54)$$

Donde, los valores aproximados de $\Delta\varphi_{Z_m}$ y $\Delta\varphi_{Z_{m1}}$, se obtienen de la siguiente manera: de la ecuación (4.49), se puede aproximar un valor para $\Delta\varphi_{Z_m}$, a una frecuencia cercana a la MSRF.

$$\Delta\varphi_{Z_m}|_1^2 \approx \frac{X_{m1} - X_{m2}}{R_m} \quad (4.55)$$

La ecuación (4.50), se puede escribir de la siguiente manera:

$$\varphi_{Z_{m1}} = \arctan \frac{\frac{X_m}{R_t + R_m} + \frac{R_t R_m \omega_t C_0}{R_t + R_m}}{1 - \frac{R_t X_m \omega_t C_0}{R_t + R_m}} \quad (4.56)$$

Como la frecuencia de test es cercana a la MSRF, entonces

$$\frac{R_t X_m \omega_t C_0}{R_t + R_m} \ll 1 \quad (4.57)$$

Y el valor aproximado de $\varphi_{Z_{m1}}$, será:

$$\varphi_{Z_{m1}} \approx \arctan \left(\frac{X_m}{R_t + R_m} + \frac{R_t R_m \omega_t C_0}{R_t + R_m} \right) \quad (4.58)$$

En las cercanías de la MSRF, la tangente puede ser aproximada al ángulo y la ecuación (4.58), se aproxima a:

$$\varphi_{Z_{m1}} \approx \frac{X_m}{R_t + R_m} + \frac{R_t R_m \omega_t C_0}{R_t + R_m} \quad (4.59)$$

A una frecuencia de test constante, la variación de $\varphi_{Z_{m1}}$, desde la referencia (estado 1) a un nuevo estado, se define como:

$$\Delta\varphi_{Z_{m1}}|_1^2 \approx \frac{X_{m1} - X_{m2}}{R_t + R_m} \quad (4.60)$$

Y la ecuación (4.54), se escribe como:

$$\Delta(\varphi_2 - \varphi_1)|_1^2 = \Delta\varphi_{z_m}|_1^2 - \Delta\varphi_{z_{m'}}|_1^2 \approx \frac{X_{m1} - X_{m2}}{R_m} \left(\frac{R_t}{R_m + R_t} \right) \quad (4.61)$$

Reemplazando la ecuación (4.29) en la ecuación (4.61).

$$\Delta(\varphi_2 - \varphi_1)|_1^2 \approx \Delta\varphi \frac{R_t}{R_t + R_m} \quad (4.62)$$

Y la ecuación (4.40), en la ecuación (4.62), se obtiene:

$$\Delta(\varphi_1 - \varphi_2)|_1^2 \approx -\frac{\Delta m_c}{m_q + m_L} \frac{R_t}{R_t + R_m} \quad (4.63)$$

Esta expresión simple relaciona las diferencias de fase entre las señales u_1 y u_2 con la variación de la densidad superficial de masa del recubrimiento del cristal.

Al mantenerse constante la frecuencia de test, la red R_c - C_c no cambia de fase y por tanto no contribuye al desfase entre las señales u_1 y u_2 . Es conveniente que R_c - C_c sean similares a R_m y C_0 , respectivamente.

7.2.2 Descripción Detallada del Sistema de Caracterización Propuesto

El sistema de caracterización desarrollado se muestra en la Figura 7.5.

El conector J1 (SMB), permite la entrada de la señal de test, proveniente de un generador de señales de características especiales (descrito más adelante), en cuanto a estabilidad se refiere.

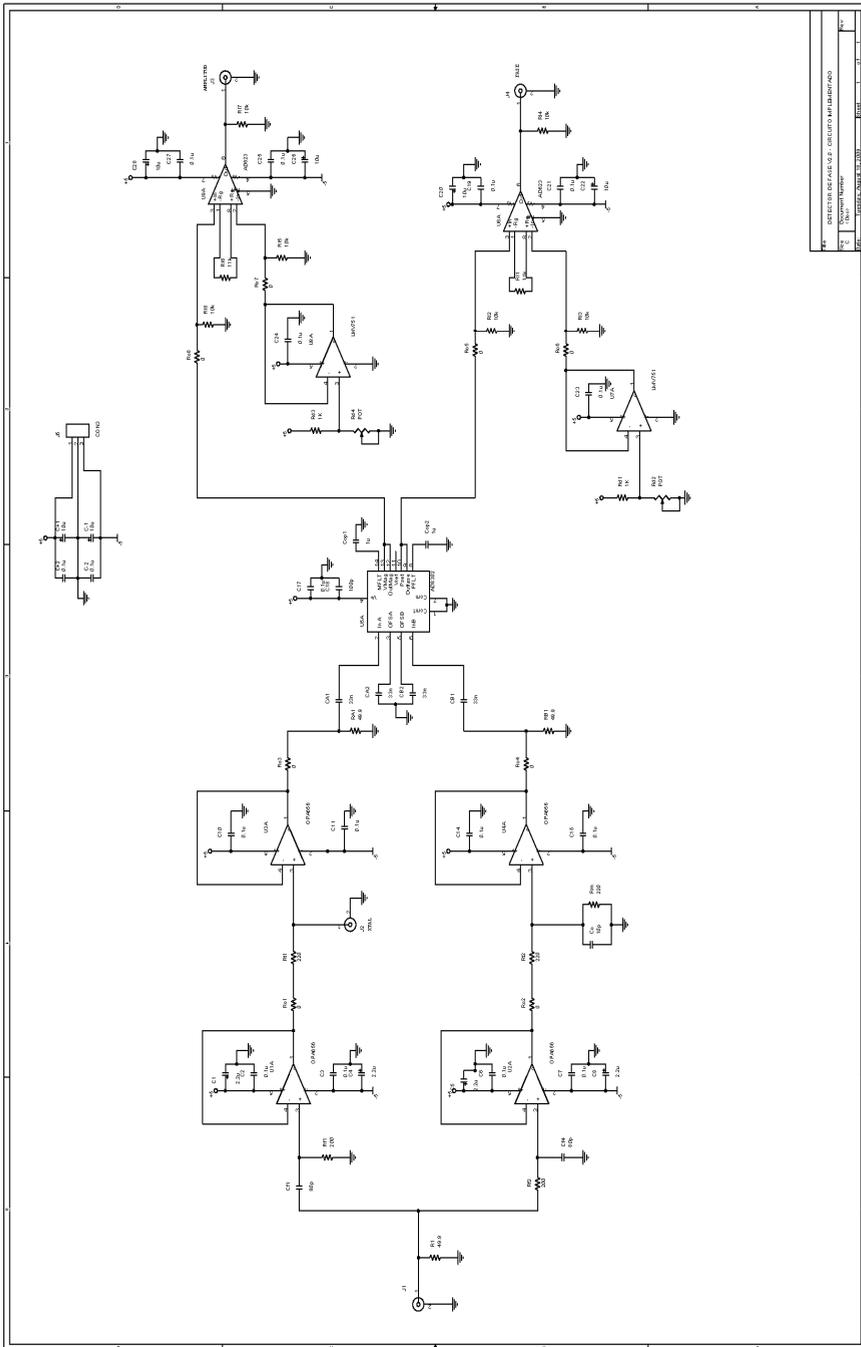


Figura 7.5: Esquema circuito detector de fase.

Los filtros pasivos formados por la resistencia y condensadores R_f - C_f , desfasan la señal 90° entre sí, para permitir un óptimo funcionamiento del circuito detector de fase. Los filtros han sido diseñados para que ambos tengan la misma ganancia a la frecuencia de resonancia del cristal, como lo muestra la Figura 7.6; de esta manera, la diferencia de amplitud entre las dos ramas a la frecuencia de resonancia, será igual a cero.

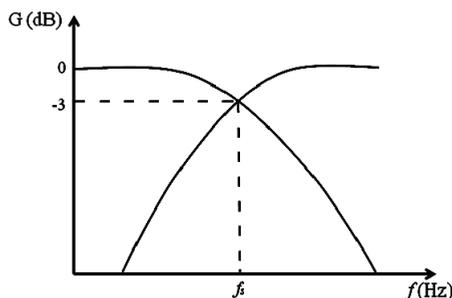


Figura 7.6: Respuesta de los filtros pasivos de paso bajo y paso alto, formado por R_f - C_f , a la frecuencia de resonancia del cristal.

La resistencia R_t (R_{t1} y R_{t2} en el circuito), es de un valor aproximado a R_m .

La resistencia y el condensador de la red $R_c - C_c$, se han elegido de un valor aproximadamente igual al valor de R_m y C_0 del cristal, medidos con el analizador de impedancia y estando el resonador en contacto con el líquido de trabajo (tampón de trabajo para los biosensores).

Como detector de fase fue utilizado el CI AD8302, de la empresa Analog Devices, que además incorpora un detector de amplitud. El pin de salida VPHS (pin 9) del AD8302, ofrece una tensión proporcional a la diferencia de fase entre dos señales conectadas a INPA (pin 2) e INPB (pin 6) del AD8302; como lo muestra la Figura 7.7, tomada de la hoja de características del fabricante [AD8302 2002]. Además, como se puede observar en el catálogo del AD8302, la respuesta del CI es lineal para fases cercanas a 90° , de ahí la importancia de los filtros pasivos a la entrada del circuito.

El pin VMAG (pin 13) aporta una tensión proporcional a la diferencia de amplitud entre las señales de entrada al AD8302; como lo muestra la Figura 7.8 tomada de la hoja de características del fabricante. En este caso, la respuesta lineal del CI se obtiene alrededor de 0 db, como se puede apreciar en las hojas de características suministrada por el fabricante; esta es una de las razones que hacen aconsejable que los filtros de la entrada tengan la misma atenuación a una misma frecuencia de entrada.

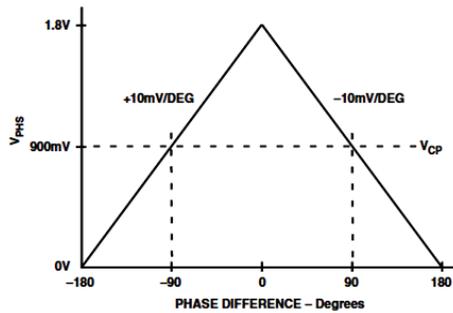


Figura 7.7: Respuesta del AD8302, a la diferencia de fase entre las dos señales de entrada

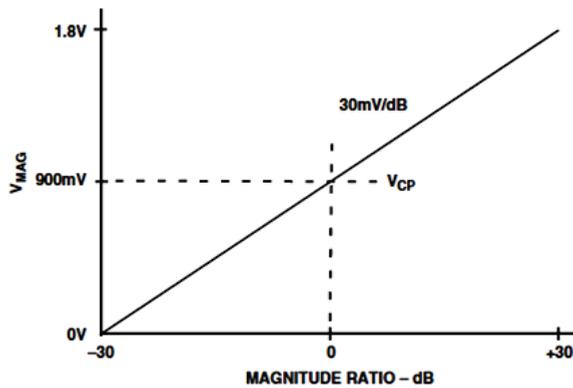


Figura 7.8: Respuesta del AD8302, a la diferencia de magnitud entre las dos señales de entrada

Los amplificadores de instrumentación AD623 cumplen doble función, por un lado eliminan el nivel de offset que presenta la respuesta del AD8302. Debido a que el circuito está configurado de tal manera que las señales a la entrada INPA e INPB sean de igual amplitud, pero desfasada 90° entre sí, las salidas VPHS y VMAG genera una tensión offset de acuerdo a la Figura 7.7 y Figura 7.8, que será eliminada al compararla con una tensión de referencia apropiada. La segunda función del AD623, es amplificar diferencialmente la respuesta fase y amplitud del AD8302; como las variaciones de fase y amplitud son muy pequeñas, es necesaria una amplificación adecuada, para aumentar la resolución del sistema, que en este caso es de 10 mV de tensión a la salida del AD623 por cada 0,1° de variación de la fase. La tensión de referencia debe ser muy estable, puesto que cualquier variación de esta tensión por pequeña que sea,

será amplificada por el AD623, generando ruido e inestabilidades en la respuesta del sistema de caracterización. Las resistencias variables Rd2 y Rd4, controlan las tensiones de referencia a través del amplificador operacional de bajo ruido LMV751 configurado como seguidor de tensión.

Los conectores BNC de salida J3 y J4 entregan una tensión directa, proporcional a la magnitud y la fase, de la impedancia del cristal piezoeléctrico a la frecuencia de test.

El cristal piezoeléctrico es conectado al circuito de caracterización a través del conector SMB J2.

7.2.3 Implementación

La placa de circuito impreso (PCB) ha sido diseñada en OrCAD Layout v.16.0. La PCB corresponde a un diseño en 4 capas (TOP, BOTTOM, GND y POWER +5 V), cada una de las capas se muestran a continuación:

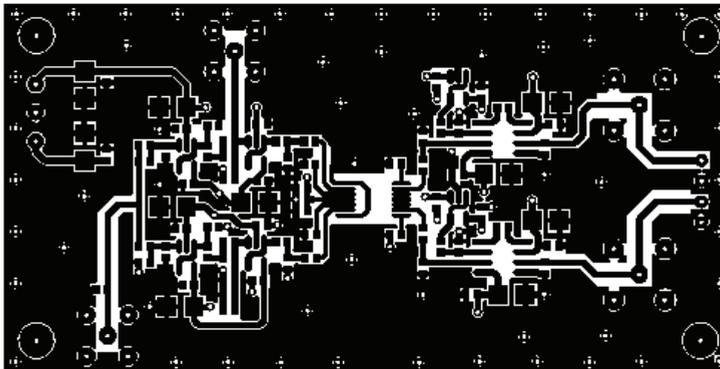


Figura 7.9: Capa Top del sistema de caracterización diseñado, basado en el método de detección de fase

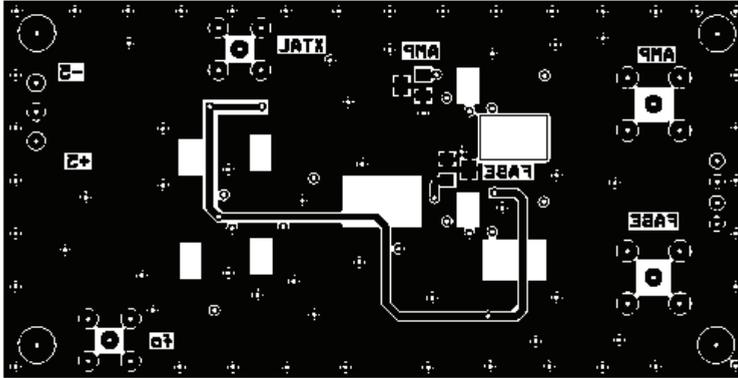


Figura 7.10: Capa Bottom del sistema de caracterización diseñado, basado en el método de detección de fase

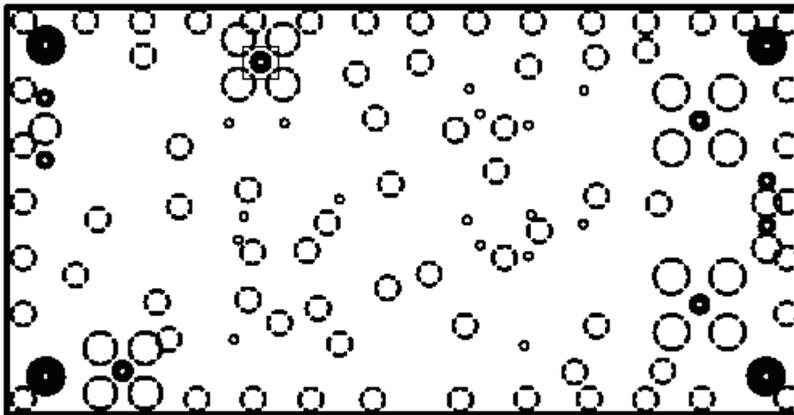


Figura 7.11: Capa GND del sistema de caracterización diseñado, basado en el método de detección de fase

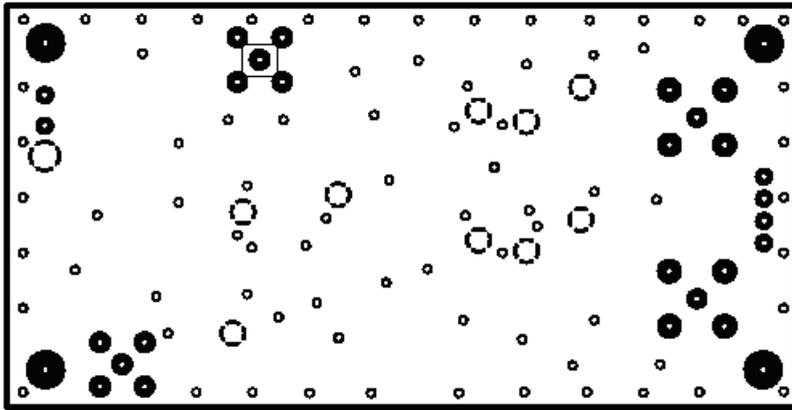


Figura 7.12: Capa PWR (+5 V) del sistema de caracterización diseñado, basado en el método de detección de fase

El circuito diseñado e implementado, es mostrado en la Figura 7.13 y Figura 7.14.

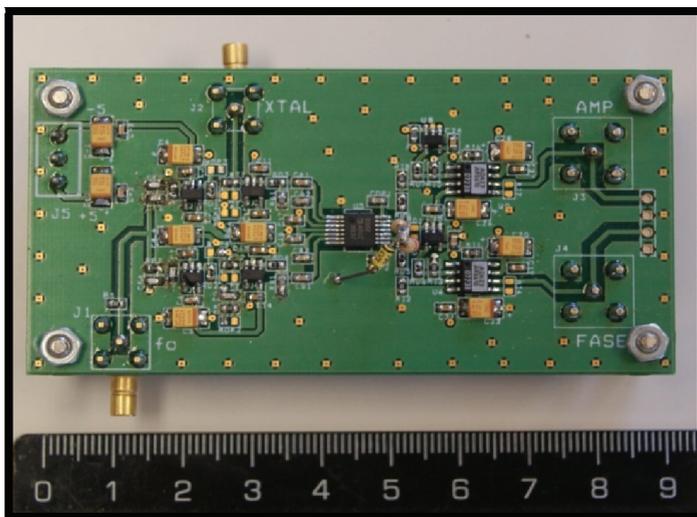


Figura 7.13: Circuito electrónico diseñado para la caracterización de cristales de cuarzo mediante el método de detección de fase

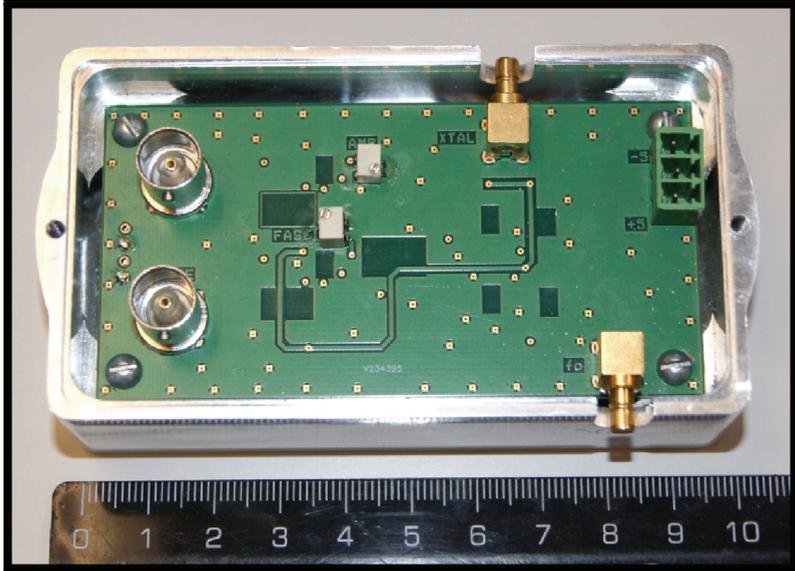


Figura 7.14: Sistema de caracterización de QCM implementado, basado en el método de detección de fase

7.2.4 Protocolo de Medida

Para la realización de medidas con el sistema de caracterización basado en el método de detección de fase propuesto, se siguieron los pasos descritos a continuación:

1. **Calibración:** La calibración del sistema de detección de fase, se realiza sustituyendo el cristal por un circuito $R-C$ paralelo, donde: $R=R_c$ y $C+C_j=C_c$. C_j es la capacidad parásita del conector. De esta manera se obtiene el circuito de la Figura 7.15. En el conector J1 se inyecta una señal de frecuencia cercana a la frecuencia de resonancia del cristal a utilizar (por ejemplo $u_f=10$ MHz), de esta manera las dos ramas del circuito son idealmente iguales pero desfasadas 90° , La diferencia de amplitud será muy cercana a cero y la diferencia de fase será de 90° . Por tanto, la tensión en los conectores J3 y J4 será de 900 mV, aproximadamente (según la respuesta del AD8302, ver Figura 7.7 y Figura 7.8) El ajuste de las resistencias variables Rd2 y Rd4, calibrará y pondrá a cero la respuesta del circuito (J3=0 y J4 = 0).

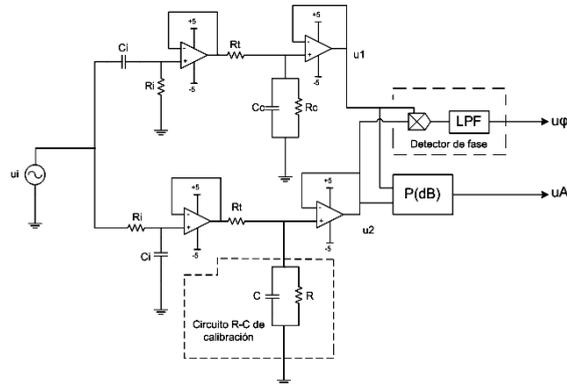


Figura 7.15: Diagrama de bloques del sistema en calibración

2. **Sintonización:** Cambiar el circuito de calibración por la celda con el cristal y comenzar a variar la frecuencia de la señal de entrada al circuito (u_i , conector J1) hasta que la tensión en el conector J4 sea lo más cercana a 0V. Esta frecuencia, es la frecuencia de fase cero del cristal, muy próxima a la MSRF y será la frecuencia de trabajo, que permanecerá estable durante toda la medida.
3. **Medición:** Una vez fijada la frecuencia de trabajo, se mantendrá estable y se comenzará a registrar las variaciones de la tensión del conector J4, que representa la fase de la impedancia del cristal y las variaciones de la tensión J2, que representa la magnitud de la impedancia del cristal. La tensión del conector J4 está relacionada con la variación de masa depositada sobre la superficie del cristal según la ecuación (4.63).

7.3 Validación Numérica de la Ecuación de Fase

Con el ánimo de realizar una validación numérica de las ecuaciones (4.40) y (4.63), se ha realizado una simulación numérica usando el modelo del cristal de la Figura 7.3b, que representa el comportamiento eléctrico del sensor. Este modelo es válido para aplicaciones donde el cristal está recubierto por una capa sensible fina y delgada, acústicamente rígida y a su vez en contacto con un líquido semi-infinito newtoniano, como es el caso de los biosensores piezoeléctricos.

Se simularon tres cristales de cuarzo, con frecuencias de resonancia de 10, 50 y 150 MHz, en contacto con una capa de recubrimiento de 100 nm de grosor y de la misma densidad del agua. Como líquido newtoniano se ha escogido al agua. Los parámetros del modelo equivalente han sido calculados de acuerdo a las expresiones deducidas por Lucklum [Lucklum et al. 2008] con las características del cuarzo registradas en la Tabla 1.1. Como diámetro del electrodo se han elegido valores comerciales; para el cristal de 10MHz se ha escogido un diámetro de 5,2 mm, que corresponde al típico cristal de cuarzo de 14 mm de diámetro; Para los sensores de 50 y 150 MHz, se ha seleccionado un diámetro del electrodo de 1,5 mm, que corresponde a los típicos valores del resonador de cuarzo inverted MESA. La viscosidad efectiva del cuarzo η_q ha sido calculada a partir del valor de R_q obtenido con el analizador de impedancias para el cristal en aire (aproximadamente 10Ω). El grosor del cuarzo ha sido obtenido a partir de la frecuencia de resonancia, a través de la ecuación (4.13). El resto de parámetros involucrados en la simulación, se muestran en la Tabla 7.1

La variación de masa del recubrimiento, ha sido simulada por el cambio del grosor del recubrimiento en pasos de 1 \AA , que representan pasos de 100 pg mm^{-2} comenzando desde -50 ng mm^{-2} hasta 50 ng mm^{-2} . Para cada paso se calculan los parámetros ϕ_{Zm} y ϕ_{Zmt} de la ecuación (4.53). Finalmente, se han simulado los cambios de la fase desde el estado de referencia del sensor $\Delta m_e=0$; estos cambios de fase han sido comparados con los cambios calculados con la ecuación (4.63).

Tabla 7.1: Propiedades del resonador y parámetros del modelo de la Figura 7.3b para tres sensores diferentes cargados con una fina capa de recubrimiento de 100 nm de grosor y de propiedades iguales a la del agua y a su vez en contacto con el agua como medio líquido.

Parámetro				Descripción
f_{s0} (Hz)	10 000 000	50 000 000	150 000 000	MSRF sin carga
h_q (m)	$1,667 \times 10^{-4}$	$3,334 \times 10^{-5}$	$1,111 \times 10^{-5}$	Grosor del cristal de cuarzo
d_e (m)	$5,20 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	Diámetro del electrodo
A_s (m ²)	$2,12 \times 10^{-5}$	$1,77 \times 10^{-6}$	$1,77 \times 10^{-6}$	Área del electrodo

C_0 (pF)	5,07	2,11	6,33	Capacidad estática
C_p (pF)	2,00	2,00	2,00	Capacidad parásita
C_0^* (pF)	7,07	4,11	8,33	Capacidad paralela total
C_q (fF)	32,7	13,6	40,8	Capacidad dinámica
L_q (μH)	7751,8	745,28	27,603	Inductancia dinámica sin carga
α	3,1416	3,1416	3,1416	Fase de la onda acústica del cuarzo
K_r ($\Omega\text{m}^2\text{sKg}^{-1}$)	$3,51 \times 10^{-2}$	$1,69 \times 10^{-2}$	$1,87 \times 10^{-3}$	Constante electroacústica
η_q^* (Pa s)	$9,27 \times 10^{-3}$	$9,27 \times 10^{-3}$	$9,27 \times 10^{-3}$	Viscosidad efectiva del cuarzo
R_q^* (Ω)	9,63	23,14	7,71	Resistencia dinámica sin carga
m_c (ng mm ⁻²)	100	100	100	Densidad superficial de masa del recubrimiento
L_c (μH)	3,51	1,69	0,187	Inductancia dinámica del recubrimiento
δ_L (nm)	178,4	79,79	46,07	Profundidad de penetración de la onda en el agua
m_L (ng mm ⁻²)	89,21	39,89	23,03	Densidad superficial de masa equivalente del agua
L_L (nH)	3129	672,8	43,16	Inductancia dinámica del agua

L_m (μH)	7758,5	747,64	27,833	Inductancia dinámica total
R_L (Ω)	196,63	211,36	40,68	Resistencia dinámica del agua
R_m (Ω)	206,25	234,49	48,39	Resistencia dinámica total
C_m (fF)	32,7	13,6	40,8	Capacidad dinámica total
f_{sL}^0 (Hz)	9 995 721,5	49 921 051,2	149 377 514,8	MSRF con carga

7.4 Cristales y Celdas

Para la realización práctica de los experimentos, se usaron los cristales y las celdas descritos en el parágrafo 4.2 de esta tesis

El sistema de caracterización de detección de fase, fue usado para desarrollar la celda de flujo de esta tesis. Se estudió el efecto de la temperatura y el efecto de la pantalla de aluminio de la celda. Para esto, se realizaron las siguientes pruebas:

1. Se calibra el sistema de caracterización y se registra la señal de salida cuando está conectado el circuito de calibración, durante 1 hora. A temperatura ambiente.
2. La celda in-batch, es conectada al circuito de caracterización detector de fase y se registra la señal durante 1 hora, a temperatura ambiente.
3. Se controla la temperatura, únicamente de la celda, mientras el circuito de caracterización permanece a temperatura ambiente y se registra la señal durante 1 hora.
4. Posteriormente se procede a recubrir completamente la celda con una fina película de aluminio que es conectada a la masa del circuito, para generar una pantalla, se registra la señal durante una hora, manteniéndose la celda a temperatura controlada y el circuito de caracterización a temperatura ambiente.
5. Se mantiene la celda recubierta por la fina capa de aluminio, pero esta vez la pantalla se mantiene sin conexión, se registra la señal durante una hora, manteniéndose la celda a temperatura controlada y el circuito de caracterización a temperatura ambiente.

7.5 Instrumental de Medida Asociado

Además de los instrumentos descritos y relacionados en el apartado 4.3 de esta tesis, se usó el generador de funciones HP 8664A.

7.6 Inmunoensayos

Se usó el mismo procedimiento de ensayo registrado en el apartado 4.5 de esta tesis, el mismo sistema de flujo, sistema de termostatación y el mismo montaje experimental que los usados con el oscilador y registrados en los apartados 4.6, 4.7 y 4.8.2, de esta tesis.

8 RESULTADOS (DETECTOR DE FASE)

8.1 Validación Numérica de la Ecuación de Fase

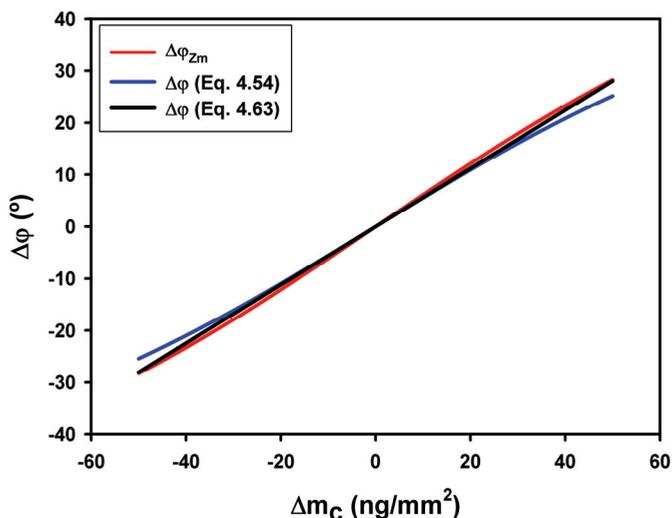


Figura 8.1: Representación gráfica del cambio de fase de la impedancia dinámica dado por la ecuación (4.26), el cambio de fase dado por la ecuación (4.54) y la aproximación dada por la ecuación (4.63), para un cristal de 10 MHz

La Figura 8.1 representa la simulación numérica de la ecuación de fase para un cristal de 10 MHz y se compara frente a la variación de la fase de la impedancia de la rama dinámica del cristal. Además incluye la aproximación a la ecuación de fase dada como respuesta del circuito de caracterización propuesto. Se observa que las ecuaciones (4.54) y (4.63), representan el comportamiento de la fase de la impedancia dinámica del cristal frente a la variación de la densidad superficial de masa del recubrimiento. La Tabla 8.1 muestra parte de los cálculos realizados para generar la Figura 8.1, donde $R_c=R_m$, $R_t=10R_m$ y la frecuencia de test, es la frecuencia cuando $\Delta m_c=0$.

Tabla 8.1: Parte de los datos calculados para generar la Figura 8.1

Δm_c (ng mm ⁻²)	Δf_s (Hz)	φ_{Zm} (°)	φ_{Zmt} (°)	$\Delta\varphi_{Eq}$ (4.54) (°)	$\Delta\varphi_{Eq}$ (4.63) (°)
-0,80	18,08	-0,49	4,68	-0,44	-0,45
-0,70	15,82	-0,43	4,68	-0,39	-0,39
-0,60	13,56	-0,37	4,69	-0,33	-0,34
-0,50	11,30	-0,31	4,69	-0,28	-0,28
-0,40	9,04	-0,25	4,70	-0,23	-0,22
-0,30	6,78	-0,19	4,71	-0,17	-0,17
-0,20	4,52	-0,12	4,71	-0,11	-0,11
-0,10	2,26	-0,06	4,72	-0,05	-0,06
0,00	0,00	0,00	4,72	0,00	0,00
0,10	-2,26	0,06	4,73	0,05	0,06
0,20	-4,52	0,12	4,74	0,11	0,11
0,30	-6,78	0,19	4,74	0,17	0,17
0,40	-9,04	0,25	4,75	0,23	0,22
0,50	-11,30	0,31	4,75	0,28	0,28
0,60	-13,56	0,37	4,76	0,33	0,34
0,70	-15,82	0,43	4,77	0,39	0,39
0,80	-18,08	0,49	4,77	0,44	0,45

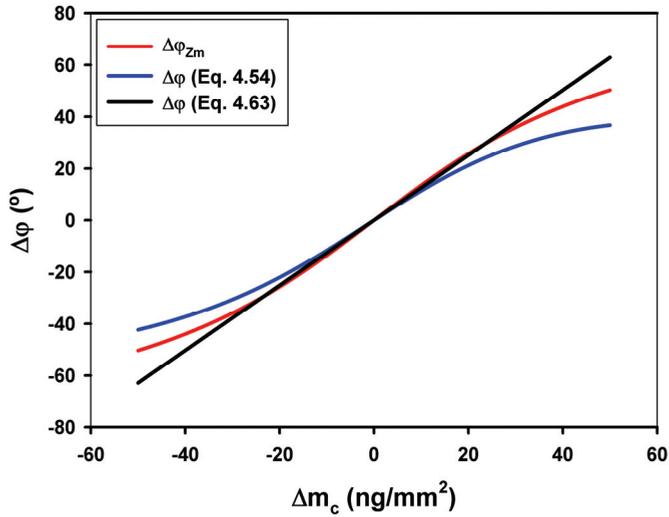


Figura 8.2: Representación gráfica del cambio de fase de la impedancia dinámica dado por la ecuación (4.26), el cambio de fase dado por la ecuación (4.54) y la aproximación dada por la ecuación (4.63), para un cristal de 50 MHz

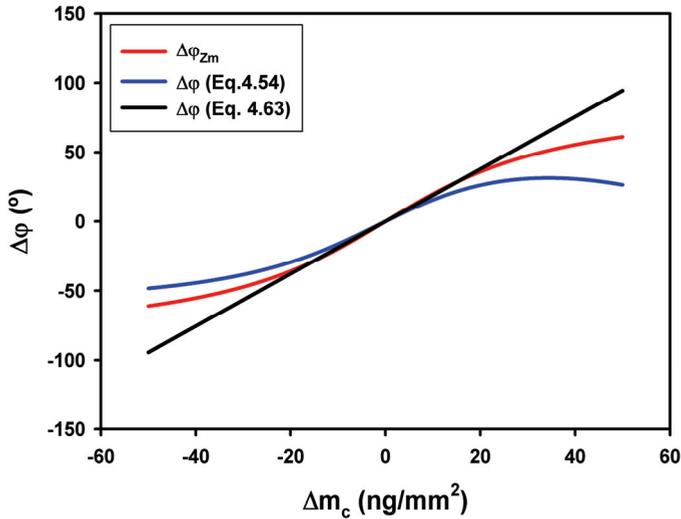


Figura 8.3: Representación gráfica del cambio de fase de la impedancia dinámica dado por la ecuación (4.26), el cambio de fase dado por la ecuación (4.54) y la aproximación dada por la ecuación (4.63), para un cristal de 150 MHz

La Figura 8.2 y Figura 8.3 muestra la simulación del comportamiento de la fase de la impedancia dinámica del cristal frente a la variación de la densidad superficial de masa del recubrimiento. Se observa que las ecuaciones (4.54) y (4.63), continúan siendo válidas para cristales de 50 y 150 MHz, lo que lleva a pensar que el sistema de caracterización sigue siendo idealmente válido para la implementación de esta técnica.

A partir de los resultados obtenidos de la simulación numérica, se puede decir que la ecuación (4.40), es válida para determinar las variaciones de la densidad superficial de masa del recubrimiento, a partir de las variaciones de fase, en régimen micro gravimétrico (aplicaciones de biosensores).

Esta simulación, permite al mismo tiempo, evaluar la sensibilidad de los QCM de diferente frecuencia de fundamental.

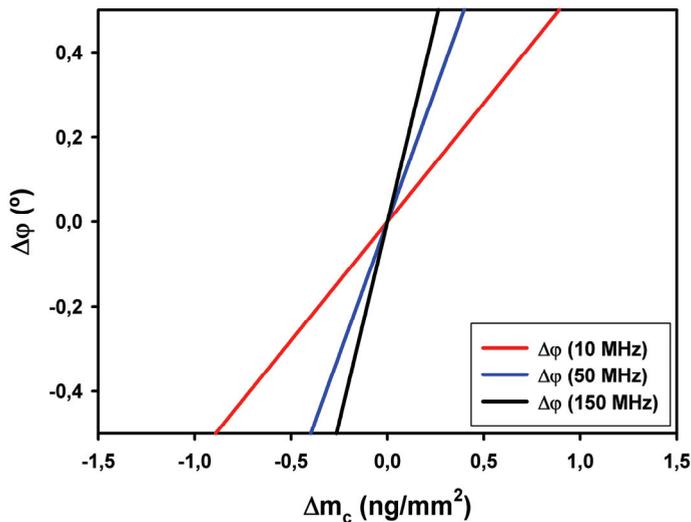


Figura 8.4: Comparación gráfica de la sensibilidad de masa con respecto al cambio de fase, dada por la ecuación (4.63), para cristales de 10 MHz, 50 MHz y 150 MHz

La Figura 8.4, es un zoom de las Figura 8.1, Figura 8.2 y Figura 8.3, que muestra una comparación de la sensibilidad entre tres cristales de diferente frecuencia de resonancia fundamental (10 MHz, 50 MHz y 150 MHz), en términos de la variación de fase debido al cambio de la densidad superficial de masa del recubrimiento.

8.2 Validación Celda de Flujo

Los efectos del recubrimiento de aluminio de la celda de flujo utilizada en esta tesis han sido evaluados con el sistema de caracterización de fase y se muestran en la Figura 8.5. Como se observa, la mejor prestación se logra cuando la celda tiene la pantalla conectada a masa del circuito, la función principal de pantalla es proteger al cristal de los efectos electromagnéticos ajenos al sensor y que producen inestabilidades en la señal.

Las variaciones de la señal se deben a que en el momento de realización de estos experimentos, únicamente la celda estaba bajo condiciones de temperatura controlada. Posteriormente, se evaluaron los efectos de la variación de la temperatura sobre el sistema de caracterización y se decidió controlar la temperatura tanto de la celda como del circuito de caracterización, para aumentar la estabilidad de la señal. Otra de las causas de la inestabilidad de la señal es la producida por la tensión de referencia con la que es comparada la salida del AD8302, cualquier tipo de inestabilidad de la tensión de referencia es amplificada y se presentará como inestabilidad de la respuesta del sistema de caracterización; esta inestabilidad ha sido solventada por medio de un regulador de tensión en la señal de referencia. Por último, estas pruebas se realizaron con el cristal en aire, donde el factor de calidad es mayor, con lo cual, cualquier pequeña perturbación del cristal se refleja en una mayor variación de fase

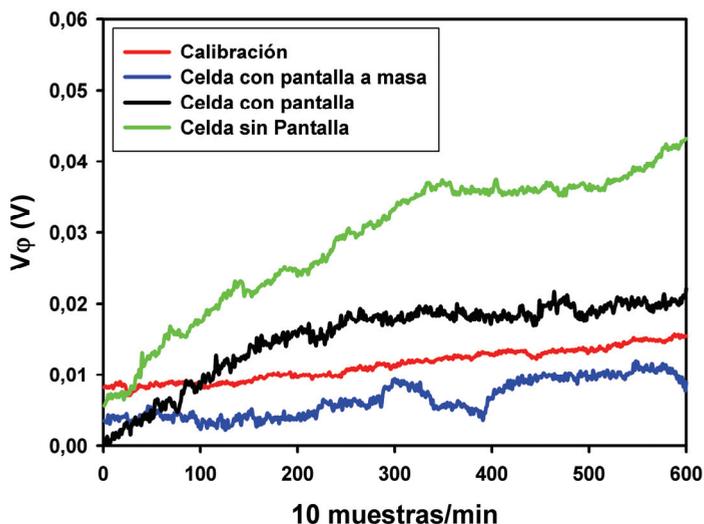


Figura 8.5: Efecto de la pantalla de aluminio de la celda de flujo

8.3 Inmunosensor Piezoeléctrico

El sistema de caracterización propuesto ha sido probado en una aplicación real, como interfaz del inmunosensor piezoeléctrico para la detección del insecticida Carbaryl, mediante un inmunoensayo competitivo.

Los ensayos se realizaron conforme al protocolo de trabajo (definido en el apartado Inmunoensayos.4.5 Inmunoensayos).

8.3.1 Optimización del Ensayo

Se determinaron experimentalmente los siguientes parámetros: forma y valor de la señal, velocidades de flujo, tiempo máximo de interacción bioquímica y tiempo máximo del ciclo de medida. Al ser un sistema nuevo es importante elegir correctamente las condiciones de trabajo.

8.3.1.1 Velocidad de Flujo

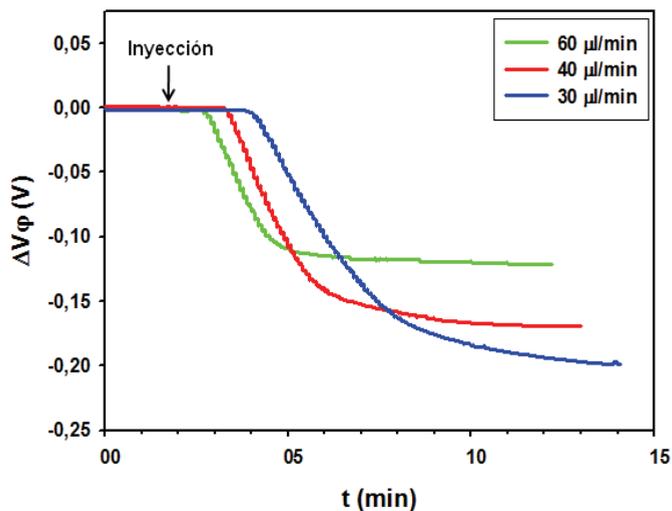


Figura 8.6: Efecto de la velocidad de flujo sobre la respuesta del inmunosensor piezoeléctrico

La velocidad de flujo es un factor importante a determinar, ya que el nivel de la señal está relacionado con el tiempo que interactúan la muestra con la capa sensible del sensor; de esta manera la velocidad de flujo es inversamente proporcional al nivel de la señal. Al mismo tiempo la velocidad de flujo condiciona la duración del ensayo; una velocidad de flujo pequeña proporciona una amplia señal de salida, pero el ensayo tardará demasiado tiempo y por lo tanto, no será operativo. La velocidad de flujo seleccionada debe ser aquella que permita la máxima señal en un tiempo razonablemente corto de interacción.

De acuerdo a la Figura 8.7, donde se muestra la respuesta del sistema en relación a la velocidad de flujo, se seleccionó la velocidad de $30\mu\text{l}/\text{min}$ como velocidad de trabajo, debido a que es la velocidad de flujo que mayor respuesta ofrece en un tiempo razonable de ensayo. El tiempo de respuesta se sitúa en 12 minutos desde la inyección, aunque la señal a este tiempo no es estable del todo (no ha llegado a su valor asintótico), está muy cerca de serlo; la diferencia de frecuencia entre el valor tomado a los 12 minutos y la señal estable totalmente es muy poco significativa. De acuerdo a lo anterior, conviene más en términos de amplitud de la señal, trabajar a $30\mu\text{l}/\text{min}$ durante 12 minutos y perder una parte muy pequeña de la señal, que trabajar a $40\mu\text{l}/\text{min}$ y medir cuando la señal es estable.

8.3.1.2 Señal Máxima

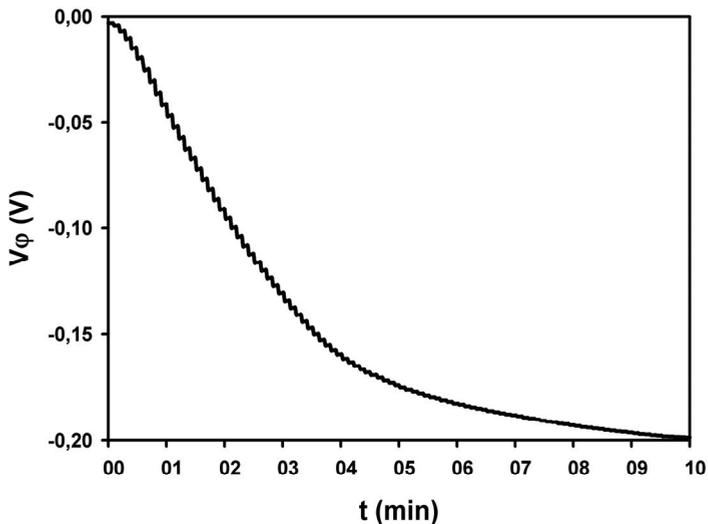


Figura 8.7: Señal máxima del inmunosensor piezoeléctrico para la detección de Carbaryl, registrada con el detector de fase

La Figura 8.7, muestra la respuesta del sistema al inyectar 100 μl de anticuerpo de concentración 15,625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$.

La señal máxima o respuesta máxima, es la mayor diferencia de fase, representada por la tensión V_φ , que se obtiene al inyectar únicamente anticuerpo (en ausencia de carbaryl). Por tanto, el anticuerpo sólo se unirá con el conjugado de hapteno inmoviliado previamente sobre la superficie del cristal. Permitiendo con esto determinar la diferencia máxima de tensión V_φ al inyectar la muestra (en este caso la señal máxima es $V_\varphi = -200\text{mV}$) y la característica de la señal del inmunosensor piezoeléctrico.

8.3.1.3 Ciclo de Medida

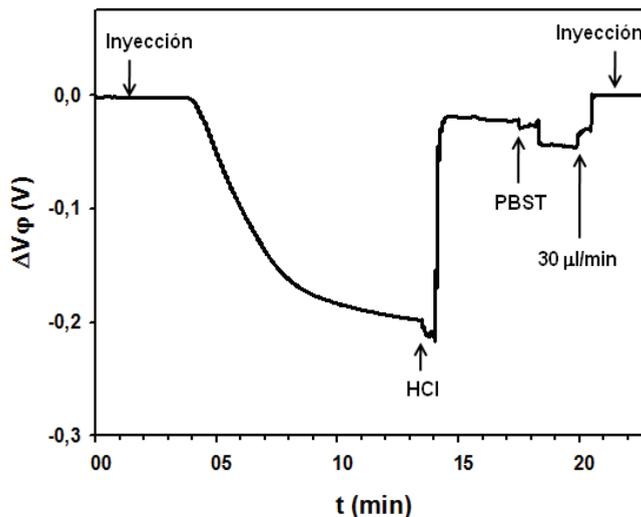


Figura 8.8: Ciclo de medida del inmunosensor piezoeléctrico, basado en el detector de fase

La Figura 8.8, muestra un ciclo de ensayo del inmunosensor piezoeléctrico.

Las fases que corresponden al ciclo de ensayo son:

1. **Línea base:** señal inicial, estable, que sirve de referencia. Duración aproximada de 1,5 min. Durante este tiempo, está fluyendo sobre el cristal PBST a una velocidad de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$.
2. **Inyección:** se inyecta la muestra a una velocidad de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Luego de 3 minutos aproximadamente, llega la muestra al cristal, durante 9

minutos se lleva a cabo la inmunoreacción, representada con la respectiva variación de fase, que se medirá a través de la tensión V_{ϕ} .

4. **Regeneración:** dividida en dos etapas: la primera mientras se hace circular solución de HCl al 0,1M, a una velocidad de 280 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 4 minutos, para romper los enlaces conjugado de hapteno – anticuerpo y la segunda al hacer fluir PBST a una velocidad de 280 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 2,5 minutos.

Los tiempos de regeneración y línea base son los tiempos necesarios para que se establezca la señal, lo que garantiza que se ha cambiado completamente el líquido anterior. Estos tiempos han sido medidos de manera experimental.

8.3.1.4 Caracterización del Inmunosensor

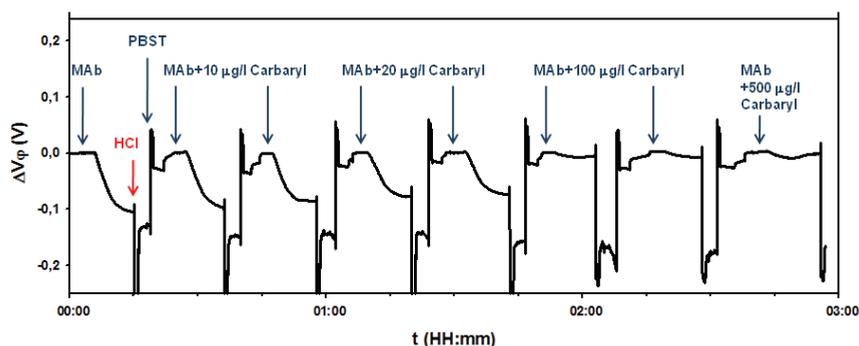


Figura 8.9: Respuesta del inmunosensor piezoeléctrico a la variación de la concentración de analito. Registro de la fase en tiempo real de inmunoensayos consecutivos de carbaryl a diferentes concentraciones.

La Figura 8.9, muestra las señales que se obtuvieron en los ensayos competitivos para la detección de Carbaryl a distintas concentraciones. La variación de la tensión V_{ϕ} es inversamente proporcional a la concentración del plaguicida. La Figura 8.9 es solo una parte de los ensayos realizados para generar la curva de calibración; en este caso se grafican las señales obtenidas al inyectar anticuerpo y las mezclas anticuerpo/analito a 10 $\mu\text{g}/\text{l}$, 20 $\mu\text{g}/\text{l}$, 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{l}$, respectivamente.

A partir de las señales obtenidas, se ha realizado una curva patrón de calibración, de ella se extraen los parámetros de sensibilidad expresado como I_{50} , límite de detección (I_{90}) y rango lineal de trabajo (I_{80} - I_{20}).

La Figura 8.10, representa la curva estándar obtenida al promediar tres curvas individuales con dos ensayos por punto. Es decir, cada punto de la curva

promedio es la medida de seis ensayos. Los datos obtenidos han sido analizados usando la ecuación (3.16). Las variación de la fase en cada uno de los casos han sido normalizadas y representadas como un porcentaje de la señal máxima ($100 \times \Delta V_\varphi / \Delta V_{\varphi 0}$), donde ΔV_φ es la variación de la tensión V_φ del patrón analizado y $\Delta V_{\varphi 0}$ es la variación máxima de la señal.

La curva estándar promedio para la detección de Carbaryl presenta una forma sigmoidea y decreciente. La señal del inmunosensor piezoeléctrico es inversamente proporcional a la concentración del plaguicida.

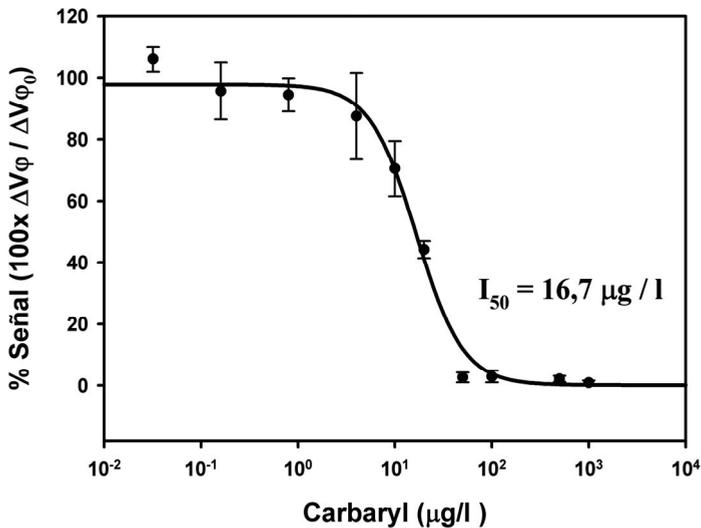


Figura 8.10: Curva estándar promedio para la detección de Carbaryl, usando detector de fase

De la Figura 8.10, se puede observar lo siguiente:

El valor de la I_{50} , representa la concentración del plaguicida que produce un 50% de la variación de la señal máxima, es generalmente aceptado como un indicativo de la sensibilidad del inmunosensor, en este caso es de $16,7 \mu\text{g/l}$.

El límite de detección (LOD), calculado como la concentración de plaguicida que proporciona un 90% de la señal máxima (I_{90}), para este caso es de $4 \mu\text{g/l}$.

Finalmente, el rango lineal de trabajo que se define como el intervalo de concentración que produce una variación de la señal, entre el 80% y el 20% de la señal máxima, se establece entre $7 \mu\text{g/l}$ y $35 \mu\text{g/l}$.

9 DISCUSIÓN

9.1 Ecuación de Fase

La ecuación (4.40), asocia los cambios de la densidad superficial de masa del recubrimiento con las variaciones de la fase de la rama dinámica del cristal, teniendo en cuenta las características del medio en contacto con el sensor (m_L); a diferencia de la ecuación de Sauerbrey [Sauerbrey 1959] donde las variaciones de la densidad superficial de masa están relacionadas con el cambio de la frecuencia, sin tener en cuenta el medio en contacto con el sensor. La ecuación de fase deja clara la alta sensibilidad del QCM en vacío, cuando $m_L=0$; debido al mayor factor de calidad (Q) del sensor, que disminuye cuando el cristal entra en contacto con el líquido. En otras palabras, la ecuación de Sauerbrey predice que una variación de masa produce el mismo cambio de frecuencia para un cristal que está en contacto con un líquido que para un cristal en contacto con un gas, sin importar el efecto que produce el factor de calidad en la respuesta del sensor. De esta manera, la ecuación de Sauerbrey predice idealmente la misma sensibilidad frecuencia-masa, sin tener en cuenta que, cuando el sensor se encuentra en un medio líquido, es necesaria una mayor estabilidad de fase y frecuencia del sistema, para obtener la misma capacidad de detección (resolución).

De las ecuaciones (4.10) y (4.16), se puede decir que m_L se reduce de acuerdo a la profundidad de penetración de la onda en el líquido, esta reducción es proporcional a $\omega^{1/2}$; de esta forma, la sensibilidad fase-masa en un medio líquido y para un ruido de fase dado, se podrá incrementar con la frecuencia, pero únicamente en proporción a $\omega^{1/2}$.

La máxima sensibilidad en términos de cambios de fase por unidad de masa, ocurre cuando el sensor esta en vacío, donde m_L es nula. La Tabla 9.1, muestra la capacidad de detección teórica del QCM para diferentes frecuencias fundamentales de resonancia y en contacto con diferentes medios, para un límite de detección dado de $0,1^\circ$; Además la Tabla 9.2 incluye el cambio de frecuencia, para las variaciones de masa de la Tabla 9.1, de acuerdo a la ecuación de Sauerbrey.

Como se puede observar, se obtiene la misma sensibilidad fase-masa para todos los sensores en vacío, debido a que se ha usado el mismo valor de η_q en todos los casos; de esta manera, el mismo valor de Δm_c es necesario para obtener la misma variación $\Delta\varphi=0,1^\circ$. Para incrementar la sensibilidad en el vacío, es necesario incrementar la velocidad de propagación de la onda usando diferentes materiales o reduciendo las fuentes de pérdidas. Sin embargo, esto no es importante, ya que la mayoría de aplicaciones del QCM se realizan en

entornos líquidos. En este caso, los cálculos realizados en agua son importantes; Como se puede observar, un incremento en la sensibilidad de masa es obtenido, a medida que decrece la profundidad de penetración de la onda en el líquido, como consecuencia del aumento de la frecuencia.

Tabla 9.1: Sensibilidad de masa para 0,1° de límite de detección, para diferentes cristales y en diferentes medios.

Medio	ρ_L (Kg m ⁻³)	η_L (Pa s)	Δm_c (pg mm ⁻²)		
			$f_{s0}=10\text{MHz}$	$f_{s0}=50\text{MHz}$	$f_{s0}=150\text{MHz}$
Vacío	0	0	7,62	7,62	7,62
Hidrogeno	0,08988	8,6x10 ⁻⁶	7,76	7,68	7,66
Aire	1,18	1,783x10 ⁻⁵	8,34	7,94	7,81
Agua	1000	0,001	163,32	77,25	47,82

Tabla 9.2: Variación de frecuencia (sensibilidad) que producen las variaciones de masa de la Tabla 9.1

Medio	ρ_L (Kg m ⁻³)	η_L (Pa s)	Δf_s (Hz)		
			$f_{s0}=10\text{MHz}$	$f_{s0}=50\text{MHz}$	$f_{s0}=150\text{MHz}$
Vacío	0	0	0,17	4,31	38,81
Hidrogeno	0,08988	8,6x10 ⁻⁶	0,18	4,35	38,99
Aire	1,18	1,783x10 ⁻⁵	0,19	4,49	39,75
Agua	1000	0,001	3,70	43,70	243,47

Como se puede observar en la Tabla 9.1 y Tabla 9.2, se obtiene una mayor variación de la MSRF a medida que se aumenta la frecuencia fundamental de resonancia, como predice Sauerbrey. Este incremento de la MSRF es correspondiente a un incremento de 0,1°. De esta manera, la sensibilidad masa-frecuencia ha aumentado 255 veces para el cristal de 150 MHz, comparado con el sensor de 10 MHz (150²/10²), mientras que la sensibilidad masa-fase, para los mismos resonadores, tan solo se ha incrementado 3,4 veces ($\approx(150/10)^{1/2}$).

Los detectores de fase que existen en la actualidad, pueden detectar a frecuencias muy altas variaciones de fase inferiores a 0,1°; por lo tanto, para un límite de detección, de 0,1°, la sensibilidad real, medible, tan solo aumentará 3,4

veces y no 255 veces. En consecuencia, es muy importante disponer de sistemas de detección de fase muy sensibles. El aspecto más importante para aumentar la sensibilidad es mejorar la estabilidad de fase del sistema de caracterización, tanto como sea posible y al mismo tiempo mejorar la capacidad de detección del sistema, llegando a medir variaciones de fase lo más pequeñas posible (resolución).

El aumento de la sensibilidad fase-masa parece ser irrelevante, al lado del gran aumento de la sensibilidad frecuencia-masa, al usar cristales de mayor frecuencia fundamental de resonancia; no obstante, este aumento de sensibilidad frecuencia-masa, solo es teórico: en la práctica y por efectos del ruido, que en algunos casos puede ser de la misma magnitud que las variaciones de la frecuencia a medir, producto del cambio de la densidad superficial de masa en el recubrimiento, resulta casi imposible alcanzar tales niveles de sensibilidad, como queda demostrado en el trabajo de Rodríguez-Pardo [Rodríguez-Pardo et al. 2005] y como se ha mencionado a lo largo de esta tesis.

En el mismo trabajo, Rodríguez-Pardo [Rodríguez-Pardo et al. 2005] relaciona el ruido en la frecuencia de oscilación con la disminución del factor de calidad del cristal (Q) y define al factor de calidad con respecto a la frecuencia fundamental del cristal y a las características del medio en contacto con el cristal, como:

$$Q \approx \frac{1}{\sqrt{f_0}} \sqrt{\frac{C_{66} \rho_q \pi}{4}} \frac{1}{\sqrt{\rho_L \eta_L}} \quad (4.64)$$

Por lo tanto, si el medio en contacto con el cristal se mantiene constante y sólo se aumenta la frecuencia fundamental de resonancia del sensor, el factor de calidad se reducirá proporcionalmente a $f_0^{1/2}$. La pendiente de la respuesta fase-frecuencia del sensor está condicionada por el factor de calidad, entonces, cualquier variación del factor de calidad, modificará en la misma medida la respuesta fase-frecuencia del sensor. Como se observa en la Figura 9.1, para una misma variación de fase (α), la variación de frecuencia (f_1 , f_2) aumenta proporcionalmente con la frecuencia fundamental de resonancia del cristal, este aumento de frecuencia es debido fundamentalmente al aumento de frecuencia (en relación directamente proporcional) y también a la disminución del factor de calidad (en relación proporcional a $f^{1/2}$).

La disminución del factor de calidad afecta directamente a la estabilidad en frecuencia de oscilación, porque aumenta el ruido de la señal. Al usar osciladores como sistemas de caracterización de QCM la estabilidad de la frecuencia de oscilación depende de la fase de oscilación según la respuesta fase-frecuencia del resonador. En osciladores, a medida que se aumenta la frecuencia fundamental de resonancia, cualquier pequeña variación de la fase de

oscilación representa una gran variación de la frecuencia de oscilación, dando origen a ruido en la señal, como se había explicado anteriormente.

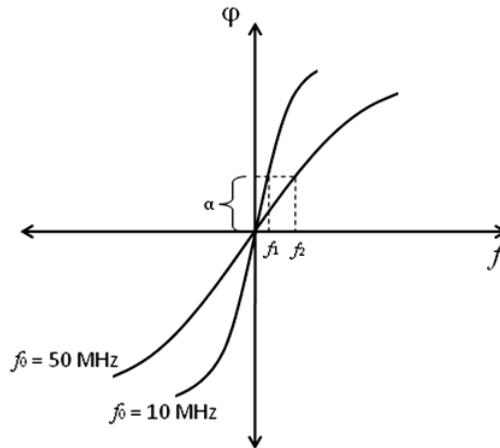


Figura 9.1: Representación gráfica de la respuesta fase-frecuencia para dos sensores de frecuencia fundamental de resonancia (f_0) diferente

La ecuación de Sauerbrey predice que la sensibilidad del sensor aumenta con el cuadrado de la frecuencia fundamental de resonancia. Esta predicción, correcta desde un punto de vista teórico no va asociada necesariamente a un aumento en el límite de detección. Este aumento en el LOD sólo sería posible si al mismo tiempo se redujera el ruido de fase. Sin embargo, al aumentar la frecuencia se reduce el factor de calidad y por lo tanto el ruido aumenta reduciendo la resolución. Por ello, al usar osciladores como método de caracterización para cristales de frecuencia fundamental de resonancia mayor, tanto el aumento de frecuencia, como la disminución del factor de calidad aumentan el ruido de la señal como se ha explicado anteriormente. Esto hace que la resolución o límite de detección real se aleje del teóricamente accesible, como muestra Rodríguez-Pardo. Por tanto la sensibilidad en términos de límite de detección depende de la estabilidad de la señal y de la capacidad del sistema de medida para detectar cambios en la señal de interés.

En el caso de medir las variaciones de fase, los cálculos han demostrado que el límite de detección, es decir la capacidad de detectar cambios en la variación de masa para una resolución dada del sistema de medida, aumenta solo con la raíz cuadrada de la frecuencia. Es decir, para una resolución determinada del sistema de medida, la capacidad de aumentar el límite de detección de masa

cuando no se tiene en cuenta el medio en contacto con el resonador, no depende de la frecuencia. Esto se pone de manifiesto a partir de la definición de factor de estabilidad. En efecto, el factor de estabilidad viene definido por:

$$S_F = \frac{\Delta\varphi}{\Delta f / f} \quad (4.65)$$

Y es igual al doble del factor de calidad del sistema resonante:

$$S_F = \frac{\Delta\varphi}{\Delta f / f} = 2Q \quad (4.66)$$

En los sistemas de medida que conocemos, la capacidad de discriminar frecuencias va asociada a la capacidad que tiene el sistema para detectar cambios en la fase. Por tanto, si se mantiene constante el límite mínimo de detección en el cambio de fase $\Delta\varphi_{\min}$, la capacidad de detectar un cambio en la masa no depende de la frecuencia. En efecto, de la ecuación (4.66), se sigue que:

$$\Delta m_{\min} = \frac{f}{2QS_a} \Delta\varphi_{\min} \quad (4.67)$$

Donde S_a es la sensibilidad en frecuencia-masa ($\Delta f/\Delta m$) o constante de Sauerbrey. Por tanto, como el factor de calidad del resonador, sin tener en cuenta el medio en contacto, disminuye proporcionalmente a la frecuencia, la ecuación anterior indica que no tiene sentido aumentar la frecuencia del resonador si no se aumenta su factor de calidad o bien se aumenta la capacidad de detección de fase, es decir reducción de $\Delta\varphi_{\min}$.

Ahora bien, cuando se tiene en cuenta el medio en contacto con el sensor, según la ecuación (4.40)b, el cambio de fase para la misma variación de masa depende de m_L , que se reduce proporcionalmente a la raíz cuadrada de la frecuencia. Por tanto, sí tiene sentido aumentar la frecuencia cuando se trabaja en medios líquidos, ya que aumenta la sensibilidad fase-masa y por tanto también la sensibilidad frecuencia-masa en la misma proporción. En efecto, de (4.40)b y (4.67), se sigue que:

$$\Delta f = \frac{f}{2Q} \frac{1}{m_L} \Delta m \quad (4.68)$$

En conclusión, para una QCM siempre vale la pena aumentar la frecuencia para mejorar la sensibilidad, sin embargo la resolución en la medida, que en definitiva es el parámetro de interés, dependerá de la estabilidad de la magnitud a medir y de la capacidad del sistema de medida por detectar cambios en dicha magnitud. Por esta razón se modifica el concepto de caracterización en el

método de fase, ya que interrogar con una señal de frecuencia de altísima estabilidad y mínimo ruido de fase equivaldría a disponer de un oscilador ideal. El que se mida frecuencia o fase es finalmente una cuestión irrelevante pues ambos incrementos están relacionados y depende más bien de lo que resulte más apropiado en una aplicación determinada.

9.2 Inmunoensayos

Se ha desarrollado un inmunosensor piezoeléctrico para la detección del insecticida Carbaryl, usando el método y sistema de caracterización basado en la detección de fase. Demostrando con esto, que el nuevo sistema es válido como método de caracterización de QCM en aplicaciones reales.

Los resultados obtenidos se comparan con trabajos previos del grupo [March et al. 2009a], que han usado el mismo formato de ensayo, los mismos reactivos, pero, utilizando en ese caso el Maxtek-RQCM como instrumento de caracterización y haciendo todos los ensayos a temperatura ambiente.

En nuestro caso, la velocidad de flujo de trabajo ha disminuido en comparación con el trabajo anterior, se paso de trabajar a una velocidad de 60µl/min a una velocidad de 30µl/min; este cambio en la velocidad sugiere aumentar en un 45% la variación de la señal máxima, sin influir en el tiempo total de ensayo que continua siendo de 20 minutos, igual que el reportado por March [March et al. 2009a]. Sin embargo, la posibilidad de disminuir la velocidad de flujo no es sólo debida al método de caracterización, sino que además a una nueva celda de flujo con menor volumen, al mejoramiento de los sistemas de fluidica, al control de temperatura, a la optimización de los procesos del ensayo y al diseño de un protocolo de ensayo acorde a las prestaciones del nuevo inmunosensor.

Los resultados del inmunosensor basado en el detector de fase como interfaz de caracterización, obtenidos en esta tesis, se comparan con los reportados por March [March et al. 2009a] mediante tres aspectos:

- Límite de detección (LOD): En el inmunosensor basado en la detección de fase el LOD es de 4 µg/l, mientras que en March el LOD es de 11 µg/l; lo que sugiere un aumento de la resolución del inmunosensor.
- Rango lineal de trabajo: para el inmunosensor basado en la detección de la fase el rango lineal de trabajo se establece entre 7 µg/l y 35 µg/l; en el trabajo de March el rango lineal de trabajo es 15µg/l a 53µg/l.

- I_{50} : generalmente la I_{50} es aceptada como un indicador de la sensibilidad, en el caso del inmunosensor piezoeléctrico basado en la detección de fase, $I_{50}=16,7 \mu\text{g/l}$, mientras que, en March $I_{50}= 30 \mu\text{g/l}$.

Los niveles de concentración del límite de detección y la I_{50} indican que se ha aumentado considerablemente la sensibilidad del sistema, comparado con los trabajos realizados anteriormente por el grupo y teniendo en cuenta que se han usado los mismos cristales, el mismo formato de ensayo y el mismo protocolo de inmovilización.

Los rizados de la señal apreciados en las Figura 8.6, Figura 8.7, Figura 8.8 y Figura 8.9, son debidos al sistema de adquisición de datos y no al sistema de caracterización.

El nuevo método de caracterización propuesto permite una mayor estabilidad de la señal, al mismo tiempo que caracteriza directamente el comportamiento de la rama dinámica del cristal, que influye directamente en el aumento de la sensibilidad en la medida.

Al permitir la calibración y al interrogar al cristal en pasivo, es fácil discriminar las interferencias de la celda y la electrónica de caracterización. A diferencia del oscilador, en este caso el cristal no es usado para compensar los desfases del circuito.

La sencillez del circuito, su gran capacidad de integración y el bajo coste hacen que se pueda considerar como una buena alternativa para la caracterización de biosensores piezoeléctricos. Además, esta técnica se puede usar para la caracterización simultánea de múltiples sensores (*arrays*).

La capacidad de mantener la respuesta cuando se disminuye el factor de calidad Q y la mejora de la relación señal a ruido, hacen de esta técnica una buena interfaz para aplicaciones de HFF-QCM.

9.3 Comparación entre los dos Sistemas de Caracterización Desarrollados en esta Tesis

Los dos sistemas desarrollados han sido usados como interfaz en un inmunosensor piezoeléctrico; al usar los mismos cristales, el mismo protocolo de medida, la misma velocidad de flujo y el mismo montaje experimental, se puede establecer una comparación entre los dos sistemas diseñados, cualquier

mejora en la respuesta del inmunosensor es debida básicamente al método y sistema de caracterización.

La estabilidad de la señal cuando el cristal está en contacto con un líquido es un punto a favor del nuevo sistema propuesto frente al oscilador. Como se explicó anteriormente, los osciladores se ven ampliamente afectados por la reducción del factor de calidad al estar el cristal en contacto con un líquido, lo que genera inestabilidad en la respuesta del oscilador; por el contrario, en el sistema de caracterización de fase, la disminución del factor de calidad del resonador no reduce la estabilidad en frecuencia de la fuente interrogante, y por tanto las variaciones de fase detectadas son debidas exclusivamente al sensor, sean por efectos externos, tales como presión, temperatura, etc., o por cambios debidos a las propiedades a medir; sin embargo, ya no dependen de la bondad del oscilador.

En el caso del oscilador la resolución está limitada no sólo por el ruido de la señal debida a los efectos físicos, de todo tipo, sobre el sensor, sino también por el comportamiento no ideal del propio circuito realimentado, que resulta muy difícil de calibrar; por el contrario, en el caso del sistema propuesto, la resolución está limitada por el ruido generado sobre el sensor por causas externas al sistema de caracterización y que podrían ser calibradas mediante un sistema de adquisición y procesado de señal apropiado. En ambos casos la capacidad de detección del cambio de fase mínimo establece, en función del ruido, la resolución del sistema en su conjunto.

La Tabla 9.3, realiza una comparación entre los dos sistemas de caracterización desarrollados, se puede observar la mejora en la sensibilidad del sistema de detección de fase. Esta mejora se debe fundamentalmente al cambio de concepción en el método de caracterización del sensor.

Tabla 9.3: Comparación entre los dos sistemas de caracterización desarrollados

Oscilador	Detector de fase
LOD = 6,5 µg/l	LOD = 4 µg/l
Rango lineal de trabajo	Rango lineal de trabajo
11 µg/l – 42 µg/l.	7 µg/l – 35 µg/l.
I ₅₀ = 24 µg/l	I ₅₀ = 16,7 µg/l

Y al compararlos con el trabajo previamente realizado por el grupo:

Tabla 9.4: Comparación de resultados

Oscilador	Detector de Fase	March [March et al. 2009a]
LOD = 6,5 µg/l	LOD = 4 µg/l	LOD = 11 µg/l
Rango lineal de trabajo 11 µg/l – 42 µg/l.	Rango lineal de trabajo 7 µg/l – 35 µg/l.	Rango lineal de trabajo 15 µg/l – 53 µg/l.
I ₅₀ = 24 µg/l	I ₅₀ = 16,7 µg/l	I ₅₀ = 30 µg/l

9.4 Proyección

Como un aporte añadido, gracias a la versatilidad del circuito de caracterización diseñado, se pueden evaluar con este mismo circuito diferentes métodos de caracterización o simplemente, seleccionar el método de caracterización del cristal de acuerdo a la aplicación. Por tanto, el método de caracterización dependerá tan solo de la configuración y no del circuito, pudiendo elegir entre las siguientes técnicas de caracterización:

- **Seguimiento de Fase:** al configurar el circuito de acuerdo a lo explicado en esta tesis, fijando una señal de frecuencia fija, muy estable y cercana a la MSRF del cristal (f_i), es posible medir las variaciones de la fase de la rama dinámica del sensor, que está relacionada con el cambio de la densidad superficial de masa del recubrimiento del cristal, según la ecuación demostrada en esta tesis: $\Delta\varphi = -\Delta m_c / (m_q + m_l)$.
- **Seguimiento de Frecuencia:** variando la frecuencia de la señal a la entrada del circuito, se puede establecer la frecuencia a la cual la fase de la rama dinámica del cristal es cero ($\varphi=0$), por lo tanto, en todo momento se busca y se registra la frecuencia a la cual $\varphi=0$. Esta técnica es lo más parecida a un sistema de enganche de fase. La variación de la frecuencia está relacionada con el cambio de la

densidad superficial de masa en el recubrimiento de acuerdo a la ecuación de Sauerbrey.

- ***Barrido en Frecuencia:*** Se puede realizar un barrido entre dos valores de frecuencia determinados; los incrementos de la frecuencia para el barrido estarán determinados por la aplicación y por la resolución con la que se desee medir. En cada paso de frecuencia, se mide la fase y la amplitud, de esta manera se puede determinar la impedancia del cristal en todo un rango de frecuencias.

***CAPÍTULO V:
CONCLUSIONES***

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Las conclusiones de la tesis son las siguientes:

1. Se ha realizado un estudio del arte de los principales métodos y sistemas de caracterización de microbalanza de cuarzo usados en la actualidad; analizado la funcionabilidad de cada uno de ellos como sistema de caracterización de cristales de cuarzo de alta frecuencia de fundamental.
2. Se ha propuesto una mejora al oscilador en configuración diferencial equilibrado, reduciendo los efectos del elemento activo, al sustituir los transistores por amplificadores de transconductancia (OTA's).
3. Se ha propuesto al oscilador con rama de compensación capacitiva y condensador $C_v = 6,8$ pF, como configuración apropiada para la caracterización de líquidos.
4. Se ha explicado el efecto que produce la capacidad C_v en la respuesta del oscilador: determinándose que la capacidad C_v no compensa la capacidad paralela (C_θ^*) del cristal, para cuyo propósito había sido diseñado; sino que la función de la capacidad C_v es la de compensar los desfases del circuito, especialmente los producidos por los amplificadores de transconductancia (OTA's) al cambiar la ganancia. Esta compensación de los desfase del circuito se ve reflejada en la oscilación del cristal a una fase constante para distintas cargas.
5. Se ha diseñado y validado la celda de medida para cristales de 10 MHz.
6. Se ha demostrado que los osciladores no son el mejor método de caracterización de cristales de cuarzo de alta frecuencia de fundamental, esta afirmación se basa en el principio de funcionamiento de los osciladores, donde la frecuencia de oscilación del cristal depende de la fase de oscilación y esta a su vez del factor de calidad del resonador.

Cualquier pequeña variación en la fase de oscilación se verá reflejada como ruido de frecuencia, afectando la estabilidad y la resolución del sistema.

7. Se ha propuesto un nuevo método de caracterización para biosensores piezoeléctricos, basado en la variación de fase de la rama dinámica del cristal a una frecuencia fija, producida por el cambio de la densidad superficial de masa en la capa sensible del sensor.
8. Se ha obtenido una nueva ecuación que relaciona la variación de la fase de la rama dinámica del cristal con el cambio de la masa del recubrimiento en contacto con un líquido newtoniano semi-infinito (como el caso de los biosensores piezoeléctricos). Esta nueva ecuación tiene en cuenta las propiedades del cristal de cuarzo y el aporte del medio líquido en contacto con el sensor.
9. Se ha diseñado y validado un sistema electrónico que aplica el método de caracterización propuesto; destacándose por: bajo costo, alto nivel de integración, reducido tamaño, facilidad de calibración y por la posibilidad de ser usado como interfaz para sistemas de múltiples sensores.
10. El sistema de caracterización propuesto puede ser usado como interfaz de microbalanza de cuarzo de alta sensibilidad, basados en cristales de alta frecuencia de fundamental.
11. El circuito desarrollado, permite la configuración de múltiples técnicas de caracterización, permitiendo con esto la evaluación y la selección del método de caracterización de acuerdo a la aplicación, sin cambiar de sistema electrónico.
12. Se ha desarrollado un inmunosensor piezoeléctrico para la detección del pesticida Carbaryl. Mejorando la sensibilidad y el límite de detección.
13. Se ha realizado una comparación de sensibilidad bajo los mismos parámetros, entre los dos métodos de caracterización usados en esta tesis (detección de fase y oscilador); destacándose el método de detección de fase, donde el aumento de la sensibilidad se debe a que el cristal está configurado como un elemento pasivo, al que se le están controlando todas las posibles causas de inestabilidad.

Como conclusión general de esta tesis, se puede decir que:

Se ha desarrollado un nuevo concepto de caracterización, específicamente para aplicaciones de biosensores piezoeléctricos, que tiene las siguientes ventajas:

- a) El sensor es interrogado pasivamente con una fuente externa que puede ser diseñada con alta estabilidad en frecuencia y bajo ruido de fase, incluso para altas frecuencias.
- b) El circuito sensor es muy simple y de alta capacidad de integración.
- c) Sensores que trabajen a la misma frecuencia fundamental de resonancia, podrán ser caracterizados, en principio, con una sola fuente, abriendo la posibilidad de un nuevo campo de investigación con sistemas de múltiples sensores.

*FUTURAS LÍNEAS DE
INVESTIGACIÓN Y
PRODUCCIÓN
CIENTÍFICA*

FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN

Se plantean las siguientes líneas futuras de investigación

1. Desarrollo de sistemas de microbalanza de cristal de cuarzo de alta frecuencia (50 – 150 MHz o incluso superiores con cristales en tecnología inverted MESA).
2. Desarrollo de sistemas de múltiples sensores para sistemas QCM.
3. Estudio y comparación de sensibilidad de sensores de cuarzo de diferente frecuencia de fundamental.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La investigación llevada a cabo en este trabajo de tesis ha dado origen a la siguiente producción científica.

Patentes:

- “Sistema y método de medida de resonadores piezoeléctricos para aplicaciones de nano gravimetría en medios fluidos”
Arnau Vives, Antonio; **Montagut Ferizzola, Yeison**; Garcia Narbon, Jose Vicente; Jimenez Jimenez, Yolanda; García Mollá, Pablo; Reig Fabado, Antonio.
Nº Solicitud: P20090153. Fecha: 23/06/2009. País de prioridad: ESPAÑA.
Nº Solicitud:PCT-ES2010-070409. Fecha: 18/06/2010 País de prioridad: INTERNACIONAL.
Entidad Titular: Universidad Politécnica de Valencia.

Artículos en Revistas:

- A. Arnau, **Y. Montagut**, J.V. García, Y. Jiménez. “A Different point of View of the Sensitivity in QCM Sensors”. Measurement Science and Technology (Meas. Sci. Technol.) Vol. 20 – Numero 12, 124004 (2010)

Capítulos de Libros:

- **Y. Montagut**, J.V. García-Narbón, C. March, Y. Jiménez, A. Montoya and A. Arnau. "QCM Technology in Biosensors". En: Pier Andrea Serra (Ed) *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*. Intech. ISBN 978-953-307-155-8

Trabajos en Congresos Internacionales:

- **Y. Montagut**, J.V. García-Narbón, Y. Jiménez, C. March, A. Montoya, A. Arnau. "A new QCM Sensor Characterization Technique Based on the Phase/Mass Sensitivity Concept". IEEE International Frequency Control Symposium. San Francisco. EEUU. 2010. (En revisión).
- Ángel Montoya Baidés, Juliana Fernández Arteaga, Aquiles Ocampo, J. Vicente García Narbon, **Yeison Montagut Ferizzola**, Carmen March Iborra. "Inmunosensor piezoeléctrico para el análisis de plaguicidas". XXIX Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ 2010). Cartagena de Indias, Colombia. 2010.
- Ángel Montoya Baidés, Juliana Fernández Arteaga, Aquiles Ocampo, J. Vicente García Narbon, **Yeison Montagut Ferizzola**, Carmen March Iborra. "Desarrollo de inmunosensores piezoeléctricos para el análisis de plaguicidas y sus metabolitos". Congreso Iberoamericano de Biotecnología y Biodiversidad (CIB). Manizales, Colombia. 2010

Trabajos en Congresos Nacionales

- **Y. J. Montagut Ferizzola**, J.V. García Narbon, M.I. Rocha Gaso, A. Arnau Vives "Interfaz para Microbalanza de Cuarzo (QCM) Basada en Osciladores que Permitan la Aplicación de Biosensores". Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB 2009). Cádiz, España. 2009
- Nuria Pastor-Navarro, **Yeison J. Montagut**, Diana Fda. Tamayo, Jose V. García-Narbón, Antonio Arnau, Ángel Maquieira, Rosa Puchades; "Ensayo de detección biomolecular sin marcaje mediante resonadores de cuarzo". V workshop on sensors and molecular reconigition, Valencia, España, 2010

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abad,A.; Primo,J. and Montoya,A. 1997. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 1. Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassay Formats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, (4), pp. 1486-1494.
- AD8302, 2002, Data sheet AD8302, (Analog Devices,
- Arnau,A., Ferrero,J.J., Jimenez,Y., and Sogorb,T., (2000), *Sistemas Electrónicos de Comunicaciones II*, UPV, Valencia, pp.110-111
- Arnau,A.; Garcia,J.V.; Jimenez,Y.; Ferrari,V. and Ferrari,M. 2007. Improved electronic interfaces for heavy loaded at cut quartz crystal microbalance sensors. In proceedings of frequency control symposium joint with the 21 european frequency and time forum.IEEE international, pp. 357-362.
- Arnau A. and Soares D. 2008. Fundamentals of Piezoelectricity. En: Arnau A. (ed.) *Piezoelectric Transducer and Applications*. 2nd Edition. Springer, pp.1-38
- Arnau,A.; Sogorb,T. and Jimenez,Y. 2002. Circuit for continuous motional series resonant frequency and motional resistance monitoring of quartz crystal resonators by parallel capacitance compensation. *Rev.Sci.Instrum.*, 73, (7), pp. 2724-2737.
- Arnau,A.; Jimenez,Y. and Sogorb,T. 2000a. Thickness shear mode quartz crystal resonators in viscoelastic fluid media. *J.Appl.Phys.*, 88, pp. 4498-4506.
- Arnau,A.; Jimenez,Y. and Sogorb,T. 2001a. An extended Butterworth-Van Dyke model for quartz crystal microbalance applications in viscoelastic fluid media. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control*, 48, (5), pp. 1367-1382.
- Arnau,A.; Jimenez,Y. and Sogorb,T. 2001b. An extended Butterworth-Van Dyke model for quartz crystal microbalance applications in viscoelastic fluid media. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control*, 48, (5), pp. 1367-1382.
- Arnau,A.; Sogorb,T. and Jimenez,Y. 2001c. A new method for continuous monitoring of series resonance frequency and simple determination of motional impedance parameters for loaded quartz-crystal resonators. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control*, 48, (2), pp. 617-623.

- Arnau,A.; Sogorb,T. and Jimenez,Y. 2000b. A continuous motional series resonant frequency monitoring circuit and a new method of determining Butterworth - Van Dyke parameters of a quartz crystal microbalance in fluid media. *Review Scientific Instruments*, 71, pp. 2563-2571.
- Auge,J.; Dierks,F.; Eichelbaum,F. and Hauptmann,P. 2003. High-speed multi-parameter data acquisition and web-based remote access to resonantsensors and sensor arrays. *Sensors and Actuators B*, 95, pp. 32-38.
- Auge,J.; Hauptmann,P.; Eichelbaum,F. and Rösler,S. 1994. Quartz crystal microbalance sensor in liquid. *Sensors and Actuators B*, 18-19, pp. 518-522.
- Auge,J.; Hauptmann,P.; Hartmann,J.; Rösler,S. and Lucklum,R. 1995. New design for QCM sensors in liquids. *Sensors and Actuators B*, 24-25, pp. 43-48.
- Barnes,C. 1991. Development of quartz crystal-oscillators for under liquid sensing. *Sensors and Actuators A-Physical*, 29, (1), pp. 59-69.
- Barnes,C. 1992. Some new concepts on factors influencing the operational frequency of liquid-immersed quartz microbalances. *Sensors and Actuators A-Physical*, 30, (3), pp. 197-202.
- Behrends,R. and Kaatze,U. 2001. A high frequency shear wave impedance spectrometer for low viscosity liquids. *Meas.Sci.Technol.*, 12, pp. 519-524.
- Benes,E.; Gröschl,M.; Burger,W. and Schmid,M. 1995. Sensors based on piezoelectric resonators. *Sensors and Actuators A*, 48, pp. 1-21.
- Benes,E.; Schmid,M.; Groschl,M.; Berlinger,P.; Nowotny,H. and Harms,K.C. 1999. Solving the cable problem between crystal sensor and electronics by use of a balanced bridge oscillator circuit. *Frequency and Time Forum*, 1999 and the IEEE International Frequency Control Symposium, 1999., *Proceedings of the 1999 Joint Meeting of the European*, 2, pp. 1023-1026.
- Benjaminson,A. 1984. Balanced feedback oscillators. In *proceedings of the 38 Annual symposium on frequency control*, pp. 327-333.
- Benjaminson,A. 1986. A crystal oscillator with bidirectional frequency control and feedback ALC. In *proceedings of the 40 Annual Symposium on frequency control*, pp. 344-349.
- Biset,K.; Grabielli,C. and Perrot,H. 1999. Biosensors based on piezoelectric transducers. *Analisis EurJAC*, 27, pp. 609-616.

- Borngräber,R.; Schröder,J.; Lucklum,R. and Hauptmann,P. 2002. Is an oscillator-based measurement adequate in a liquid enviroment. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelect.Freq.Contr.*, 49, (9), pp. 1254-1259.
- Bottom,V.E., (1982), *Introduction to quartz crystal unit design*, Van Nostrand, New York,
- Briand,E.; Salmain,M.; Herry,J.M.; Perrot,H.; Compère,C. and Pradier,C.M. 2006. Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? *Biosensors and Bioelectronics*, 22, (3), pp. 440-448.
- Bund,A.; Chmiel,H. and Schwitzgebel,G. 1999. Determination of the complex shear modulus of polymer solution with piezoelectric resonators. *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 1, pp. 3933-3938.
- Bustabad E.A.; García G.; Rodriguez-Pardo L.; Faria J.; Perrot H.; Gabrielli C.; Bucur B.; Lazerges M.; Rose D.; Compere C. and Arnau A. 2009. A Biosensor for Detection of DNA Sequences Based on a 50MHz QCM electronic oscillator circuit. *Sensors*, 2009 IEEE, pp. 687-690.
- Cady,W.G., (1964), *Piezoelectricity: an introduction to the theory and applications of electromechanical phenomena in crystals*, New York,
- Calvo,E.J.; Ethenique,R.; Barlett,P.N.; Singhal,K. and Santamaria,C. 1997. Quartz crystal impedance studies at 10 MHz of viscoelastic liquids and films. *Faraday Discussions*, 107, pp. 141-157.
- Cernosek,R.W.; Martin,S.J.; Hillman,A.R. and Bandey,H.L. 1998. Comparison of lumped-element and transmission-line models for thickness-shear. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelect.Freq.Contr.*, 45, pp. 1399-1407.
- Chagnard,C.; Gilbert,P.; Watkins,A.N.; Beeler,T. and Paul,D.W. 1996. An electronic oscillator with automatic gain control: EQCM applications. *Sensors and Actuators B*, 32, pp. 129-136.
- Chou,S.F.; Hsu,W.L.; Hwang,J.M. and Chen,C.Y. 2004. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on surface plasmon resonance. *Biosens.Bioelectron.*, 19, (9), pp. 999-1005.
- Cooper,M.A. and Singleton,V.T. 2007. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *J.Mol.Recognit.*, 20, (3), pp. 154-184.
- Czanderna,A.W. and Lu,C. 1984. *Applications of piezoelectric quartz crystal microbalances*. Elsevier, 7,

- Daikhin,L.; Gileadi,E.; Tsionsky,V.; Urbakh,M. and Zilberman,G. 2000. Slippage at adsorbate-electrolyte interface. Response of electrochemical quartz crystal microbalance to adsorption. *Electrochimica Acta*, 45, (22-23), pp. 3615-3621.
- Davis,K.A. and Leary,T.R. 1989. Continuous liquid-phase piezoelectric biosensor for kinetic immunoassays. *Anal.Chem.*, 61, pp. 1227-1230.
- Dickert,F.L.; Lieberzeit,P. and Hayden,O. 2003. Sensor strategies for microorganism detection--from physical principles to imprinting procedures. *Anal.Bioanal.Chem.*, 377, (3), pp. 540-549.
- Ehahoun,H.; Gabrielli,C.; Keddou,M.; Perrot,H. and Rousseau,P. 2002. Performances and limits of a parallel oscillator for electrochemical quartz crystal microbalances. *Anal.Chem.*, 74, (5), pp. 1119-1127.
- Eichelbaum,F.; Borngräber,R.; Schröder; Lucklum,R. and Hauptmann,P. 1999. Interface circuits for quartz crystal microbalance sensors. *Rev.Sci.Instrum.*, 70, pp. 2537-2545.
- Etchenique,R. and Calvo,E.J. 1997. Electrochemical quartz crystal impedance study of redox hydrogel mediators for amperometric enzyme electrodes. *Analytical chemistry*, 69, (23), pp. 4833-4841.
- Fahnrich,K.A.; Pravda,M. and Guilbault,G. 2002. Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Analytical Letters*, 35, (8), pp. 1269-1300.
- Ferari,M.; Ferrari,V. and Kanazawa,K.K. 2007. Dual-harmonic oscillator for quartz crystal resonator sensors. In proceedings of Transducers & Eurosensors Conference, pp. 241-244.
- Ferrari,M.; Ferrari,V.; Marioli,D.; Taroni,A.; Suman,M. and Decanale,E. 2006. In-Liquid sensing of chemical compounds by QCM sensors coupled with high-accuracy ACC oscillator. *IEEE trans.Instrum.Meas.*, 55, (3), pp. 828-834.
- Ferrari,V.; Marioli,D. and Taroni,A. 2000. Oscillator circuit configuration for quartz crystal-resonator sensor subject to heavy acoustic load. *Electron.lett.*, 36, (7), pp. 610-612.
- Ferrari,V.; Marioli,D. and Taroni,A. 2001. Improving the accuracy and operating range of quartz microbalance sensors by purposely design oscillator. *IEEE trans.Instrum.Meas.*, 50, pp. 1119-1122.

- Ferrari,V.; Marioli,D. and Taroni,A. 2003. ACC oscillator for in-liquid quartz microbalance sensors. in proceedings of IEEE sensors, 2, pp. 849-854.
- Frerking,M.E., (1978), Crystal oscillator design and temperature compensation, New York, pp.240p-
- Fruböse,C.; Doblhofer,K. and Soares,D. 1993. Impedance analysis of the quartz micro-balance signal. Ber.Bunsenges.Phys.Chem., 97, (3), pp. 475-478.
- Gabrielli,C.; Perrot,H.; Rose,D.; Rubin,A.; Pham,M.C. and Piro,B. 2007. New frequency/voltage converters for ac-electrogravimetric measurements based on fast quartz crystal microbalance. Review Scientific Instruments, 78, (7), pp. 6 pages-
- Geelhood,S., Frank,C.W., and Kanazawa,K., (2001), Acoustic Wave Sensor Workshop 3, Taos, New Mexico
- Granstaff,V.E. and Martin,S.J. 1994. Characterization of a thickness-shear mode quartz resonator with multiple nonpiezoelectric layers. J.Appl.Phys., 3, pp. 1319-1329.
- Hayward,G. 1992. Viscous interaction with oscillating piezoelectric quartz crystals. Analytica Chimica Acta, 264, (1), pp. 23-30.
- Hayward,G. and Chu,G.Z. 1994. Simultaneous measurement of mass and viscosity using piezoelectric quartz crystal in liquid-media. Analytica Chimica Acta, 288, (3), pp. 179-185.
- Henn, Ch., 1995, New ultrahigh-speed circuit techniques with analog ICs, (AB-183), Burr-Brown
- Hug,T.S. 2003. Biophysical methods for monitoring cell-substrate interactions in drug discovery. Assay.Drug Dev.Technol., 1, (3), pp. 479-488.
- IEC. 1986. Measurement of quartz crystal unit parameters by zero phase techniques in a pi-network (Part 1). International Electrotechnical Commission - IEC Standard, Publication 444-1,
- J.M.Abad; F.Pariante; L.Hernández; H.D.Abruña and E.Lorenzo. 1998. Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Using a Piezoelectric Biosensor. Analytical chemistry, 70, (14), pp. 2848-2855.
- Jakoby,B.; Art,G. and Bastemeijer,J. 2005. A novel analog readout electronics for microacoustic thickness shear-mode sensors. IEEE Sensors Journal, 5, (5), pp. 1106-1111.

- Janshoff,A.; Galla,H.J. and Steinem,C. 2000. Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors? *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, 39, (22), pp. 4004-4032.
- Jimenez,Y.; Fernandez,R.; Torres,R. and Arnau,A. 2006. A contribution to solve the problem of coating properties extraction in quartz crystal microbalance applications. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control*, 53, (5), pp. 1057-1072.
- Johannsmann,D.; Mathauer,K.; Wegner,G. and Knoll,W. 1992. Viscoelastic properties of thin films probed with a quartz-crystal resonator. *Phys.Rev.B Condens.Matter*, 46, (12), pp. 7808-7815.
- Kanazawa,K.K. and Gordon II,J.G. 1985. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid. *Anal.Chim Acta*, 175, pp. 99-105.
- Kankare,J.; Loikas,K. and Salomaki,M. 2006a. Method for measuring the losses and loading of a quartz crystal microbalance. *Anal.Chem.*, 78, (6), pp. 1875-1882.
- Kankare,J.; Loikas,K. and Salomaki,M. 2006b. Method for measuring the losses and loading of a quartz crystal microbalance. *Anal.Chem.*, 78, (6), pp. 1875-1882.
- Karousos,N.G.; Aouabdi,S.; Way,A.S. and Reddy,S.M. 2002. Quartz crystal microbalance determination of organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytica.Chimica.Acta*, 469, (2), pp. 189-196.
- Konash,P.L. and Bastiaans,G.J. 1980. Piezoelectric crystal as detectors for liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 52, pp. 1929-1931.
- Kurosawa,S.; Kitajima,H.; Ogawa,Y.; Muratsugu,M.; Nemoto,E. and Kamo,N. 1993. Resonant Frequency of a piezoelectric quartz crystal in contact with solutions. *Analytica Chimica Acta*, 274, pp. 209-217.
- Kurosawa,S. and Tawara,E. 1990. Oscillating frequency of piezoelectric quartz crystal in solutions. *Analytica Chimica Acta*, 230, (1), pp. 41-49.
- Kurosawa,S.; Aizawa,H. and Park,J.W. 2005. Quartz crystal microbalance immunosensor for highly sensitive 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin detection in fly ash from municipal solid waste incinerators. *Analyst*, 130, (11), pp. 1495-1501.
- Kurosawa,S.; Aizawa,H. and Yoshimoto,M. 2000. Latex piezoelectric immunoassay: analysis of C-reactive protein in human serum. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control*, 47, (5), pp. 1256-1258.

- Kurosawa,S.; Park,J.W.; Aizawa,H.; Wakida,S.; Tao,H. and Ishihara,K. 2006. Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring. *Biosens.Bioelectron.*, 22, (4), pp. 473-481.
- Lazcka,O.; Del Campo,F.J. and Munoz,F.X. 2007. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens.Bioelectron.*, 22, (7), pp. 1205-1217.
- Lazerges,M.; Perrot,H.; Rabehaaso,N.; Antoine,E. and Compere,C. 2005. 45- and 70-Base DNA supramolecular polymerizaion on quartz crystal microbalance biosensor. *Chem.Commun.*, 48, pp. 6020-6022.
- Lazerges,M.; Perrot,H.; Zeghib,N.; Antoine,E. and Compere,C. 2006. In situ QCM DNA-biosensor probe modification. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 120, (1), pp. 329-337.
- Lee,S.W.; Hinsberg,W.D. and Kanazawa,K.K. 2002. Determination of the viscoelastic properties of polymer films using a compensated phase-locked oscillator circuit. *Anal.Chem.*, 74, (1), pp. 125-131.
- Lucklum,R.; Behling,C.; Cernosek,R.W. and Martin,S.J. 1997a. Determination of complex shear modulus with thickness shear mode resonators. *J.Phys.D.*, 30, pp. 346-356.
- Lucklum,R. and Hauptmann,P. 1997b. Determination of polymer shear modulus with quartz crystal resonantors. *Faraday Discussions*, 107, pp. 123-140.
- Lucklum R.; Soares D. and Kanazawa K. 2008. Models for Resonant Sensors. En: Arnau A. (ed.) *Piezoelectric Transducers and Applications*. 2nd edn. Springer, pp.63-96
- March,C.; Manclus,J.J.; Jimenez,Y.; Arnau,A. and Montoya,A. 2009a. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*, 78, (3), pp. 827-833.
- March,C.; Manclus,J.J.; Jimenez,Y.; Arnau,A. and Montoya,A. 2009e. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*, 78, (3), pp. 827-833.
- March,C.; Manclus,J.J.; Jimenez,Y.; Arnau,A. and Montoya,A. 2009d. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*, 78, (3), pp. 827-833.
- March,C.; Manclus,J.J.; Jimenez,Y.; Arnau,A. and Montoya,A. 2009c. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*, 78, (3), pp. 827-833.

- March,C.; Manclus,J.J.; Jimenez,Y.; Arnau,A. and Montoya,A. 2009b. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*, 78, (3), pp. 827-833.
- Martin,S.J.; Granstaff,V.E. and Frye,G.C. 1991a. Characterization of quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading. *Anal.Chem.*, 63, (20), pp. 2272-2281.
- Martin,S.J.; Granstaff,V.E. and Frye,G.C. 1991b. Characterization of quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading. *Anal.Chem.*, 63, pp. 2272-2281.
- Martin,S.J.; Spates,J.J.; Wessendorf,K.O.; Schneider,T.W. and Huber,R.J. 1997. Resonator/oscillator response to liquid loading. *Anal.Chem.*, 69, pp. 2050-2054.
- Martinez,G.I. 2001. Automatic Gain Control (AGC) Circuits - Theory and design. Universidad de Toronto, ECE1352 Analog Integrated Circuits I, pp. 1-25.
- Marx,K.A. 2003. Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules.*, 4, (5), pp. 1099-1120.
- Mathys,R.J. 1992. Crystal oscillator circuits. Krieger Malabar revised ed, pp. 251-
- Michalzik,M.; Wendler,J.; Rabe,J.; Böttgenbach,S. and Bilitewski,U. 2005. Development and application of a miniaturised quartz crystal microbalance (QCM) as immunosensor for bone morphogenetic protein-2. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 105, (2), pp. 508-515.
- Montoya A.; Ocampo A. and March C. 2008. Fundamentals of Piezoelectric Immunosensors. En: Arnau A. (ed.) *Piezoelectric Transducers and Applications*. Second Edition. Springer, pp.289-306
- Nakamoto,T. and Kobayasi,T. 1994. Development of circuit for measuring both Q variation and resonant frequency shift of quartz crystal microbalance. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelect.Freq.Contr.*, 41, (6), pp. 806-811.
- Namsoo Kim; In-Seon Park and Dong-Kyung Kim. 2007. High-sensitivity detection for model organophosphorus and carbamate pesticide with quartz crystal microbalance-precipitation sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, (8), pp. 1593-1599.
- Ni,R.; Zhang,X.; Liu,W.; Shen,G. and Yu,R. 2003. Piezoelectric quartz crystal sensor array with optimized oscillator circuit for analysis of organic vapours mixtures. *Sensors and Actuators B*, 88, pp. 198-204.

- Noël M and Topart,P.A. 1994. High frequency impedance analysis of quartz microbalances I. General considerations. *Analytical chemistry*, 66, (4), pp. 484-491.
- Nwankwo,E. and Durning,J. 1998. Impedance response of thickness-shear mode quartz crystal resonators to contact with linear viscoelastic fluids. *Rev.Sci.Instrum.*, 69, (6), pp. 2375-2384.
- O'Sullivan,C.K. and Guilbault,G.G. 1999a. Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 14, (8-9), pp. 663-670.
- O'Sullivan,C.K.; Vughan,R. and Guilbault,G. 1999b. Piezoelectric immunosensors - theory and applications. *Analytical Letters*, 32, (12), pp. 2353-2377.
- OPA660, 1995, Data Sheet OPA660, (PDS-1072E), Burr-Brown, Tucson,
- OPA860, 2005, Data Sheet OPA860, (SBOS331B), Burr-Brown,
- Park,J.W.; Kurosawa,S.; Aizawa,H.; Hamano,H.; Harada,Y.; Asano,S.; Mizushima,Y. and Higaki,M. 2006. Dioxin immunosensor using anti-2,3,7,8-TCDD antibody which was produced with mono 6-(2,3,6,7-tetrachloroxanthene-9-ylidene) hexyl succinate as a hapten. *Biosens.Bioelectron.*, 22, (3), pp. 409-414.
- Park,J.W.; Kurosawa,S.; Aizawa,H.; Wakida,S.i.; Yamada,S. and Ishihara,K. 2003. Comparison of stabilizing effect of stabilizers for immobilized antibodies on QCM immunosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 91, (1-3), pp. 158-162.
- Parzen,B. and Ballato,A., (1983), *Design of crystal and other harmonic oscillators*, New York, pp.454-
- Paul,D.W. and Beeler,T.L., (1998), *Piezoelectric sensor Q-loss compensation*, US Patent 4788466.
- Reed,C.E.; Kanazawa,K.K. and Kaufman,J.H. 1990. Physical description of a viscoelastically loaded AT-cut quartz resonator. *Journal of Applied Physics*, 68, (5), pp. 1993-2001.
- Rodahl,M.; Hook,F. and Kasemo,B. 1996a. QCM operation in liquids: An explanation of measured variations in frequency and Q factor with liquid conductivity. *Anal.Chem.*, 68, pp. 2219-2227.

- Rodahl, M. and Kasemo, B. 1996b. A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance. *Rev.Sci.Instrum.*, 67, pp. 3238-3241.
- Rodahl, M. and Kasemo, B. 1996c. Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode. *Sensors and Actuators B*, 37, pp. 111-116.
- Rodriguez-Pardo, L.; Fariña, J.; Gabrielli, C.; Perrot, H. and Brendel, R. 2004. Resolution in quartz oscillator circuits for high sensitivity microbalance sensor in damping media. *Sensors and Actuators B*, 103, pp. 318-324.
- Rodriguez-Pardo, L.; Fariña, J.; Gabrielli, C.; Perrot, H. and Brendel, R. 2005. Sensitive, noise and resolution in QCM sensor in liquid media. *IEEE Sensors Journal*, 5, (6), pp. 1251-1257.
- Rodriguez-Pardo, L.; Fariña, J.; Gabrielli, C.; Perrot, H. and Brendel, R. 2006. Quartz crystal oscillator circuit for high resolution microgravimetric sensors. *Electronics Letters*, 42, (18), pp. 1065-1067.
- Rosebaum, J.F. 1988. *Bulk acoustic wave theory and devices*. Artech House Inc, Boston,
- Sakti, S.P.; Hauptmann, P.; Zimmermann, B.; Böhling, F. and Ansorge, S. 2001. Disposable HSA QCM-immunosensor for practical measurement in liquid. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 78, (1-3), pp. 257-262.
- Sauerbrey, G. 1959. Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Z.Phys.*, 155, pp. 206-222.
- Schilling, D.L. and Belove, C., (1993), *Circuitos Electrónicos*, McGraw Hill, pp.395-396
- Schröder, J.; Borngräber, R.; Lucklum, R. and Hauptmann, P. 2001. Network analysis based interface electronics for quartz crystal microbalance. *Review Scientific Instruments*, 72, (6), pp. 2750-2755.
- Schumacher, R. 1990. The quartz microbalance: a novel approach to the in situ investigation of interfacial phenomena at the solid/liquid junction. *Angew.Chem.Int.Ed.In English*, 29, (4), pp. 329-343.
- Shana, Z.A. and Radtke, D.E. 1990. Theory and applications of quartz resonator as a sensor for viscous-liquid. *Analytica Chimica Acta*, 231, (2), pp. 317-320.

- Soares,D. 1993. A quartz microbalance with the capability of viscoelasticity measurements for in-situ electrochemical investigations. *Meas.Sci.Technol.*, 4, pp. 549-553.
- Soares,D.; Kautek,W.; Fruböse,C. and Doblhofer,K. 1994. The electrochemical quartz crystal microbalance in media of changing viscoelastic properties and the design and characterization of suitable driver electronics. *Ber.Bunsenges.Phys.Chem.*, 98, (2), pp. 219-228.
- Stehrer,B.P.; Gruber,H.; Schwärzhauser,R.; Graz,I.M. and Bauer,S. 2009b. High Frequency QCM Flow Cell with Enhanced Accuracy for Liquid and Biochemical Sensing. *Procedia Chemistry*, 1, (1), pp. 1507-1510.
- Stehrer,B.P.; Gruber,H.; Schwärzhauser,R.; Graz,I.M. and Bauer,S. 2009a. High Frequency QCM Flow Cell with Enhanced Accuracy for Liquid and Biochemical Sensing. *Procedia Chemistry*, 1, (1), pp. 1507-1510.
- TA.Camesano,YT.I.a.M.D. 2007. Measuring bacterial adhesion at environmental interfaces with single-cell and single-molecule techniques. *Advances in Water Resources*, 30, pp. 1470-1491.
- Tiean,Z. and Nie,L.H. 1990. On equivalent-circuits of piezoelectric quartz crystal in a liquid and liquid properties I. Theoretical derivation of equivalent-circuit and effects of density and viscosity of liquids. *Journal of electroanalytical chemistry*, 293, (1-2), pp. 1-18.
- Torres R. 2007. Instrumental techniques for improving the measurements based on Quartz Crystal Microbalances (Tesis). Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Torres,R.; Arnau,A. and Perrot,H. 2007. Electronic System for experimentation in AC Electrogravimetry II: Implemented Design. *Revista EIA*, 7, pp. 63-73.
- Torres,R.; Arnau,A.; Perrot,H.; Garcia,J. and Gabrielli,C. 2006. Analog-Digital Phase-Locked Loop for alternating current quartz electrogravimetry. *Electronics Letters*, 42, (22), pp. 1272-1273.
- Towery,R.B.; Fawcett,N.C.; Zhang,P. and Evans,J.A. 2001. Genomic DNA hybridizes with the same rate constant on the QCM biosensor as in homogeneous solution. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, (1-2), pp. 1-8.
- Uttenthaler,E.; Schröml,M.; Mandel,J. and Drost,S. 2001a. Ultrasensitive quartz crystal microbalance sensors for detection of M13-Phages in liquids. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, (9-12), pp. 735-743.

- Uttenthaler,E.; Schröml,M.; Mandel,J. and Drost,S. 2001b. Ultrasensitive quartz crystal microbalance sensors for detection of M13-Phages in liquids. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, (9-12), pp. 735-743.
- W.Yao; Z.Gao and Y.Cheng. 2009. Quartz crystal microbalance for the detection of carbaryl using molecularly imprinted polymers as recognition element. *Journal of Separation Science*, 32, (19), pp. 3334-3339.
- Weast, R. and Astle, M., 1980, *CRC Handbook of Chemistry and physics*, (60, CRC Press, inc.
- Wegener,J.; Janshoff,A. and Steinem,C. 2001. The quartz crystal microbalance as a novel means to study cell-substrate interactions in situ. *Cell Biochem.Biophys.*, 34, (1), pp. 121-151.
- Wessendorf,K.O. 1993. The lever oscillator for use in high resistance resonator applications. in *proceedings of the 1993 IEEE international frequency control symposium*, pp. 711-717.
- Wessendorf,K.O. 1998. The active bridge oscillator. in *proceedings of the 1993 IEEE international frequency control symposium*, pp. 361-369.
- Wessendorf,K.O., (2001), Active bridge oscillator, US Patent 6169459.
- Wessendorf,K.O. 2001. The active-bridge oscillator for use with liquid loaded QCM sensors. in *proceedings of the IEEE international frequency control symposium and PDA exhibition*, pp. 400-407.
- Wessendorf,K.O., (1995), Oscillator circuit for use with high loss quartz resonator sensors, US Patent 5416448.
- Yang,M. and Thompson,M. 1993. Interfacial properties and the response of the thickness-Shear-Mode acoustic wave sensor in Liquids. *Langmuir*, 9, pp. 802-811.
- Zhang,C. and Vetelino,J.F. 2001. Bulk acoustic wave sensors for sensing measurand-induced electrical property changes in solutions. *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control*, 48, (3), pp. 773-778.