

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 839**

51 Int. Cl.:

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2012 E 12199524 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2610617**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior**

30 Prioridad:

28.12.2011 FR 1104126

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.05.2015

73 Titular/es:

**CENTRE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DU
BATIMENT (100.0%)**

**84 avenue Jean Jaurès Champs-sur-Marne
77447 Marne La Vallée Cedex 2, FR**

72 Inventor/es:

**MOULARAT, STÉPHANE;
JOBLIN, YAËL y
ROBINE, ENRIC**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 536 839 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y procedimiento de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior, a su uso, así como a un procedimiento de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior que utiliza dicho dispositivo.

10 El individuo de las sociedades industrializadas para más del 90 % de su tiempo en espacios cerrados, donde se encuentra con múltiples contaminantes de naturaleza física, química y biológica. Conscientes de los riesgos sanitarios potencialmente inducidos por esta contaminación compleja, los poderes públicos han introducido en el reglamento ambiental Grenelle 2 el principio de vigilancia de la calidad del aire en ambientes interiores. Este principio incluye la instalación de sistemas de medida y de información en establecimientos que acojan personas vulnerables (niños, personas ancianas...), y el lugares que reciban público (escuelas, transportes, museos....) De este modo, como recuerda la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe publicado en 2009 "WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould", las humedades podrían inducir alergias, infecciones, toxiinfecciones e incluso irritaciones. Además de su impacto sanitario, estos microorganismos pueden actuar sobre la propia estructura de los edificios, alterando irremediablemente los productos de construcción y decoración, que es un fenómeno muy temido especialmente por los conservadores del patrimonio.

25 El interés por estos microorganismos se ve aumentado por la constatación que numerosos alojamientos de países industrializados están afectados por problemas de humedad y/o de mohos. De este modo, estudios basados en cuestionarios o inspecciones visuales indican una proporción muy importante de alojamientos contaminados. Algunos estudios europeos notifican también que la proporción de alojamientos que presentan mohos visibles puede alcanzar el 25 % (Brunekreef, 1992; Pirhonen, 1996). Los estudios realizados en América del Norte, en su caso, indican tasas de contaminación comprendidas entre 14 y 38 % (Dales, 1991). Esta proporción alcanza el 80 % cuando se tienen en cuenta habitaciones con mucha humedad detectada en las paredes (Miller, 1988; Koskinen, 1999).

35 En Francia, las autoridades subvencionan un Observatorio de la Calidad del Aire Interior (OQAI, por sus siglas en francés) controlado por el Centro Científico y Técnico de la Edificación (CSTB). Los resultados de la campaña nacional de alojamientos realizada por el OQAI, publicados a finales de 2007, trazan el primer estado de la calidad del aire en las habitaciones francesas. Esta campaña de mediciones revela especialmente que la contaminación de los alojamientos debida a hongos implica una proporción importante de los hogares franceses, con valores comprendidos entre 37 y 42 % de los que el 2 % (es decir más de 610.000 alojamientos) presentan superficies contaminadas mayores de 1 m² (Moularat, 2008).

40 Entre los biocontaminantes de estos ambientes, los micromicetos (hongos) constituyen un eje de investigación de muchos equipos de todo el mundo (América del Norte, países de Europa del Norte, Bélgica, Italia, Australia, Francia...).

45 Por ambiente interior se entiende un espacio confinado en el interior de un edificio ventilado de forma no continua. Los ejemplos de ambientes interiores se pueden referir a habitaciones, museos, iglesias, bodegas, monumentos históricos, edificios administrativos, escuelas y hospitales.

50 La presencia de hongos en los ambientes interiores tiene consecuencias sanitarias. Efectivamente, numerosos estudios han demostrado la aparición de síntomas en ocupantes de locales que contienen mohos, así como su papel en la degradación tanto de los materiales como de las obras que colonizan. Efectivamente, las enzimas y/o los ácidos producidos por los champiñones producen igualmente el deterioro de su soporte.

55 Desde el principio de su desarrollo, los champiñones emiten moléculas volátiles (compuestos orgánicos volátiles, COV) procedentes bien de su metabolismo, o bien de la degradación del material sobre el que se desarrollan gracias a las enzimas o los ácidos que producen. Los COV se difunden a través de las paredes y se pueden detectar en el aire incluso en el caso de contaminaciones escondida. Sin embargo, los COV presentes en un ambiente interior también pueden proceder de otras fuentes como los materiales de construcción, los productos domésticos y también de la actividad humana. Las concentraciones de COV de origen fúngico, especialmente en un estadio precoz de la contaminación, parecen ser relativamente débiles en comparación con el conjunto de los COV presentes en un ambiente interior.

Estado de la técnica anterior

65 En este contexto, el solicitante ha realizado desde hace más de 10 años diferentes acciones de investigación, especialmente en el dominio del desarrollo de mohos en soportes y en la detección precoz de su crecimiento.

Tradicionalmente, la contaminación fúngica de un ambiente está objetivada por su examen visual o por el cultivo de los microorganismos presentes en el aire, sobre las superficies o en el polvo. Debido a ello, los métodos habituales pocas veces permiten detectar las contaminaciones ocultas (crecimiento tras un cerramiento, en la estructura del edificio o en los sistemas de ventilación, por ejemplo) o recientes, cuando no evidencia de ningún signo de desarrollo.

En una óptica de detección precoz de un desarrollo fúngico, los trabajos del solicitante se basan en la emisión, desde las primeras horas del desarrollo fúngico, de compuestos orgánicos volátiles de origen microbiano (COVm) específicos, que se emiten al entorno y constituyen una huella digital bioquímica cuya detección señala una actividad fúngica.

De este modo, para detectar el conjunto de los casos de contaminaciones, el solicitante ha desarrollado en la solicitud de patente FR 2913501 una técnica basada en la identificación de trazadores químicos que constituyen esta huella dactilar y permiten el cálculo de un índice de contaminación.

La solicitud de patente FR 2913501 propone un procedimiento de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior mediante la determinación de un índice de contaminación fúngica basado en el análisis de los COV presentes en el aire ambiente. Este procedimiento permite detectar un desarrollo fúngico en un estadio precoz de su desarrollo, incluso en el caso de una contaminación oculta, pero aplica métodos clásicos de análisis, como la cromatografía en fase gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas. Estos métodos requieren la recogida de una muestra que se debe llevar al laboratorio, donde experimentan etapas prolongadas de concentración, separación y análisis. Estas etapas para detectar una contaminación fúngica en un ambiente interior necesitan la intervención de un técnico cualificado y resultan ser relativamente largas y costosas. Estas técnicas de análisis no permiten, por tanto, una medición rápida y continua.

Enrico Cozzani describe en "Modeling, design and experimental characterization of micro-electro-mechanical systems for gas-chromatographic applications" (urn:nbn:it:unibo-2609) un módulo para identificar COV, especialmente benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, que comprende un sistema de inyección, un sistema de separación mediante una columna de cromatografía de gases y un sistema de detección.

Las soluciones disponibles en la actualidad no permiten, por tanto, responder a la demanda de detección precoz y vigilancia continua de las contaminaciones fúngicas. El principio general del microsistema de acuerdo con la invención se describe en la solicitud de patente N° 10 59636.

La empresa solicitante ha conseguido, por sí misma, poner a punto un dispositivo de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior que permite un análisis rápido in situ del aire ambiental en un tiempo de medida corto, y por tanto la detección de la contaminación de forma continua. El dispositivo de la invención tiene además la ventaja de poderse utilizar sin la intervención de un técnico experto.

40 **Exposición de la invención**

De este modo, la presente invención se refiere a un dispositivo de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior que comprende:

- 45 - un módulo de preconcentración;
- un módulo de separación que incluye una microcolumna cromatográfica; y
- un módulo de detección que comprende una matriz de captadores.

El solicitante ha desarrollado, por tanto, un sistema autónomo de microcaptadores químicos adaptado a la medición in situ. Además de la ganancia de tiempo producida por la ausencia de la fase de análisis en laboratorio, integrada en el sistema a desarrollar, este dispositivo debe garantizar una vigilancia continua de entornos frecuentados por el público, como museos, escuelas, centros hospitalarios....

En particular, el módulo de preconcentración se encuentra corriente arriba de los módulos del dispositivo. El uso de un preconcentrador es necesario para el uso de sistemas cromatográficos cuando la resolución de la columna cromatográfica es demasiado débil o bien la sensibilidad de los detectores está limitada por las concentraciones muy bajas de las moléculas diana.

La preconcentración se basa en el principio de acumulación. Durante la utilización de un preconcentrador, el flujo a analizar, habitualmente el gas, atraviesa el módulo de preconcentración en el que se acumulan las moléculas diana, durante una fase de recogida en un material adsorbente. Por supuesto, la elección del material adsorbente depende de las moléculas diana buscadas, de forma que puedan quedar atrapadas en el material y posteriormente desorberse por ejemplo térmicamente e inyectarse en una columna cromatográfica para su separación y posterior análisis. De este modo, las moléculas diana liberadas permiten obtener, a la salida de la columna, picos de desorción con una concentración más elevada de las moléculas diana. Este módulo de preconcentración aumenta por tanto la eficacia de la separación de la columna y los picos de concentración fuerte aumentan la sensibilidad del

análisis. En la interpretación de la presente solicitud, las expresiones "módulo de preconcentración" y "módulo de concentración" deben considerarse como sinónimos.

Preferentemente, el módulo de concentración comprende una microestructura de preconcentración. Este tipo de microestructura permite por una parte realizar un dispositivo más pequeño, preferentemente portátil y fácil de manipular. Por otra parte, este tipo de microestructura permite no solamente un consumo energético bajo durante la desorción sino también una mejor eficacia de calentamiento vinculada a una masa térmica menor y volúmenes muertos menos importantes.

La presencia o ausencia de moho en un ambiente interior no se puede deducir a partir de la detección de un solo COV de origen fúngico. Por tanto, los presentes inventores han concebido un dispositivo que utiliza un principio de detección de una contaminación fúngica que se basa en la detección de varios COV diana. El dispositivo de la invención permite, por tanto de forma particular, la detección de la presencia de una gama de COV diana que pueden resultar del desarrollo de una contaminación fúngica. Los COV diana incluyen especialmente:

- (1) los COV emitidos independientemente de la especie fúngica y de su soporte, y que solamente se emiten por especies fúngicas tales como 1-octen-3-ol, 1,3-octadieno y 2-etilhexanoato de metilo;
- (2) los COV emitidos independientemente de la especie fúngica y de su soporte pero que también pueden tener otros orígenes biológicos, como 2-metilfurano, 3-metilfurano, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol y α -pineno;
- (3) los COV emitidos dependiendo de la especie fúngica y de su soporte, como 2-hepteno, dimetilsulfuro, 4-heptanona, 2(5H)-furanona, 3-heptanol y metoxibenceno.

Los COV diana también pueden incluir COV que no pertenezcan a las categorías (1), (2) o (3) pero que intervienen en la apreciación de la presencia de una contaminación fúngica, como 2-etilhexanol.

En particular, el módulo de preconcentración del dispositivo de acuerdo con la invención permite una concentración de los COV diana presentes en el aire ambiental hasta una concentración detectable mediante el módulo de detección. La concentración de los COV se puede realizar por cualquier método conocido del experto en la técnica, especialmente la acumulación sobre un material adsorbente. El módulo de preconcentración comprende, por tanto, ventajosamente un material adsorbente que permite la acumulación de los COV diana. La estructura del material adsorbente tiene de forma típica una forma que permite optimizar su superficie específica. Preferentemente, el material adsorbente está en forma de partículas que tienen normalmente un tamaño de 50 a 200 μm , una superficie específica de 20 a 50 m^2/g , una porosidad de 1 a 5 cm^3/g y un tamaño de poros promedio de 50 a 500 nm. El material adsorbente se selecciona preferentemente entre carbón activo, gel de sílice, zeolitas y resinas sintéticas porosas, tales como las comercializadas con las marcas Tenax®, Carbograph® o Chromosorb®. El módulo de preconcentración incluye ventajosamente además un sistema de calentamiento que permite la desorción de los COV adsorbidos sobre el material adsorbente.

En particular, dichos módulos se encuentran sucesivamente uno a continuación del otro. De acuerdo con un primer aspecto, el dispositivo de acuerdo con la invención comprende un medio de generación de flujo, preferentemente una bomba, y al menos una primera electroválvula corriente arriba del módulo de detección que permite bien dirigir un flujo de moléculas diana hacia el módulo de detección, o bien dirigir un flujo filtrado por un primer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de detección cuando el flujo no comprende las moléculas diana. Preferentemente, el flujo filtrado se dirige directamente hacia el módulo de detección.

De forma ventajosa, un mismo flujo se dirige bien hacia el módulo de detección cuando comprende moléculas diana, o bien dirigirse hacia el primer medio de filtración cuando no comprende moléculas diana.

La determinación de la presencia o ausencia de las moléculas diana en particular los COV diana se realiza preferentemente de acuerdo con los tiempos de retención del módulo de separación de dichas moléculas diana. Estos tiempos de retención se pueden estimar mediante patrones. De forma ventajosa, dicha primera electroválvula se sitúa entre el módulo de separación y el módulo de detección.

De acuerdo con otro aspecto, el dispositivo comprende además al menos una segunda electroválvula corriente arriba del módulo de separación que permite dirigir un flujo bien hacia el módulo de separación cuando el flujo comprende moléculas diana o cuando el flujo está filtrado mediante un medio de filtración, bien hacia el exterior cuando el flujo no comprende moléculas diana. De forma ventajosa, dicha segunda electroválvula está situada entre el módulo de concentración y el módulo de separación.

De este modo, durante la retención de las moléculas diana por ejemplo en el módulo de concentración, el módulo de separación no queda obturado por el resto de las moléculas de la muestra. Además, es posible hacer pasar un flujo filtrado sucesivamente a través del módulo de concentración y el módulo de separación.

Preferentemente, el dispositivo comprende además al menos una tercer electroválvula corriente arriba del módulo de concentración que permite bien dirigir un flujo de toma de muestra hacia el módulo de concentración, bien dirigir un flujo filtrado por un medio de filtración que permite limpiar al menos el módulo de concentración. El flujo filtrado sirve

de gas portador durante el análisis.

De este modo, además de las fases de toma de muestra, el dispositivo se puede limpiar mediante un flujo filtrado.

- 5 Preferentemente, está previsto un mismo medio de filtración para generar un flujo de aire filtrado para la limpieza del módulo de concentración y del módulo de separación.

10 De acuerdo con un aspecto ventajoso, el primer y/o el segundo medio de filtración comprenden un polímero adsorbente. En particular, el polímero adsorbente del primer y/o del segundo medio de filtración es adecuado para adsorber las moléculas volátiles o semivolátiles. De este modo, el paso por un medio de filtración permite disminuir el ruido de fondo durante el análisis de las moléculas diana y una limpieza de los diferentes módulos. Por ejemplo, un material adsorbente de ese tipo comprende una resina polimérica porosa a base de óxido de 2,6-difenileno. También se puede incluir un medio de filtración que comprenda carbón activo.

15 De forma ventajosa, los módulos de concentración y/o separación comprenden un material que puede adsorber o absorber dichas moléculas diana asociado a un medio de desorción correspondiente. Preferentemente, el material que puede adsorber o absorber dichas moléculas diana es un polímero adsorbente tal como 2,6-difenileno preferentemente granos de polímero en el caso del módulo de concentración y un gel de dimetilpolisiloxano (PDMS) en el caso del módulo de separación, y el medio de desorción comprende resistencias de calentamiento instaladas
20 en dichos módulos de concentración y/o de separación.

25 De acuerdo con otro aspecto interesante, el dispositivo comprende además una tarjeta de control que permite controlar, preferentemente de forma automática, al menos una de dichas electroválvulas, el medio de elución especialmente las resistencias de calentamiento, el medio de generación de flujo especialmente al menos una bomba.

30 Preferentemente, la tarjeta de control está conectada al módulo de detección de forma que recibe los datos del mismo. Las tarjetas de tratamiento de las señales del módulo de detección y de control del sistema también pueden estar disociadas.

De forma ventajosa, la tarjeta de control y el módulo de detección están configurados para medir una diferencia de resistividad entre el flujo que comprende las moléculas diana y el flujo filtrado. En particular, el módulo de detección comprende un circuito denominado "puente de Wheatstone" asociado a un circuito de amplificación.

35 Otro objeto de la invención consiste en una tarjeta de control para un dispositivo de detección como se ha descrito anteriormente, configurada para controlar, preferentemente de forma automática, dichas electroválvulas, para realizar al menos uno entre:

- 40 - bien dirigir un flujo que comprende moléculas diana hacia el módulo de detección, o bien dirigir un flujo filtrado por un primer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de detección cuando el flujo no comprende las moléculas diana,
- dirigir un flujo bien hacia el módulo de separación cuando el flujo comprende moléculas diana o cuando el flujo está filtrado mediante un segundo medio de filtración, bien hacia el exterior cuando el flujo no comprende moléculas diana,
- 45 - bien dirigir un flujo de toma de muestra hacia el módulo de concentración, o bien dirigir un flujo filtrado por un tercer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de concentración cuando el flujo no comprende las moléculas diana.

50 Preferentemente, la tarjeta de control está configurada para controlar además preferentemente de forma automática, los medios de generación de flujo especialmente al menos una bomba.

De forma ventajosa, la tarjeta de control está configurada para controlar además, preferentemente de forma automática, el medio de elución especialmente las resistencias de calentamiento de manera que desorba las moléculas diana.

55 La invención se refiere igualmente a un procedimiento de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior a partir de un dispositivo de detección que comprende:

- un módulo de preconcentración;
- 60 - un módulo de separación que comprende una microcolumna cromatográfica corriente abajo del módulo de preconcentración; y
- un módulo de detección que comprende una matriz de captadores corriente abajo del módulo de separación,
- los medios de generación de flujo especialmente al menos una bomba,

65 comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- concentración, en la que las moléculas diana quedan retenidas en el módulo de preconcentración durante un tiempo de concentración;
- limpieza de captadores, en la que un flujo filtrado atraviesa al menos uno entre el módulo de preconcentración, el módulo de separación y el módulo de detección,
- 5 - análisis, en el que las moléculas diana pasan al módulo de detección, preferentemente durante un tiempo de análisis.

De forma más general, la invención se refiere a un procedimiento de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior a partir de un dispositivo de detección que comprende:

- 10 - un módulo de preconcentración;
- un módulo de separación que comprende una microcolumna cromatográfica corriente abajo del módulo de preconcentración; y
- un módulo de detección que comprende una matriz de captadores corriente abajo del módulo de separación,
- 15 - los medios de generación de flujo especialmente al menos una bomba,

comprendiendo el procedimiento al menos una etapa de:

- 20 - limpieza de captadores, en la que un flujo filtrado atraviesa al menos uno entre el módulo de preconcentración, el módulo de separación y el módulo de detección.

De acuerdo con un aspecto ventajoso, el procedimiento comprende al menos una etapa inactiva (12, 13, 10) antes y/o después de dichas etapas de concentración y de análisis, en la que están inactivados al menos los medios de generación de flujo, aplicándose preferentemente las etapas del procedimiento de forma continua de forma que detecten una contaminación fúngica en un ambiente interior.

Preferentemente, el procedimiento de detección comprende las etapas para controlar preferentemente de forma automática, al menos una electroválvula, para realizar al menos uno entre:

- 30 - bien dirigir un flujo que comprende moléculas diana hacia el módulo de detección, bien dirigir un flujo filtrado por un primer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de detección cuando el flujo no comprende moléculas diana,
- dirigir un flujo bien hacia el módulo de separación cuando el flujo comprende moléculas diana o cuando el flujo está filtrado por un segundo medio de filtración, bien hacia el exterior cuando el flujo no comprende moléculas diana,
- 35 - bien dirigir un flujo de toma de muestra hacia el módulo de concentración, o bien dirigir un flujo filtrado por un tercer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de concentración cuando el flujo no comprende las moléculas diana.

40 Preferentemente, el procedimiento de detección comprende además las etapas para controlar preferentemente de forma automática, el medio de generación de flujo especialmente al menos una bomba de forma que realice dichas direcciones de flujo.

45 De forma ventajosa, el procedimiento de detección comprende además las etapas para controlar preferentemente de forma automática, el medio de elución especialmente las resistencias de calentamiento de manera de desorba las moléculas diana.

50 La invención se refiere igualmente a un producto de programa informático que se puede cargar en la memoria de una unidad de control que comprende partes de un código informático para realizar el procedimiento de detección de acuerdo con la invención cuando se aplica mediante una unidad de control. De este modo, la tarjeta de control anteriormente descrita puede incluir, por ejemplo, un producto de programa informático de ese tipo.

55 El "pegado" de capas dieléctricas se considere, por ejemplo, una de las técnicas de "pegado" que permite obtener cavidades cerradas expuestas en el libro de S. Mir, Charlot (Charlot, 2002). En particular, el "pegado" entre placas ("*wafer bonding*") es una técnica que permite soldar entre sí sustratos de silicio o de materiales diferentes (como el vidrio) para obtener estructuras tridimensionales que puedan formar cavidades cerradas. Las dos técnicas conocidas del experto en la técnica son, por ejemplo, la soldadura anódica y la soldadura por fusión.

60 De acuerdo con un aspecto ventajoso, el dispositivo de acuerdo con la invención comprende captadores poliméricos. Efectivamente, los captadores químicos se utilizan para la medida en continuo de contaminantes orgánicos. Sin embargo, dichos captadores no son suficientemente sensibles para detectar los niveles de concentración de los COV emitidos durante un desarrollo fúngico, ni lo suficientemente selectivos para diferenciar los COV de origen fúngico de otros COV que procedan de otras fuentes tales como los materiales de construcción o de decoración, por ejemplo.

65

Preferentemente, el módulo de detección comprende un polímero conductor seleccionado entre el grupo que comprende PEDOT-PSS, bifenileno dibromado, polipirrol dopado con octanosulfonato, polipirrol dopado con percolato de litio o cualquier otro derivado de polipirrol, politiofeno o polianilina.

5 De acuerdo con una variante, en el dispositivo de la invención, el módulo de preconcentración comprende un micropreconcentrador. Dicho micropreconcentrador tiene ventajosamente un volumen útil de 0,1 a 1 cm³, preferentemente de 0,1 a 0,5 cm³, más preferentemente de 0,1 a 0,3 cm³. El micropreconcentrador está compuesto por una placa de sustrato, tal como una placa de silicio, en cuya superficie se han grabado surcos en los que se encuentra el material adsorbente. Una segunda placa de un material idéntico o diferente al del sustrato (como una
10 placa de vidrio), pegada sobre la superficie de la placa de sustrato grabada con los surcos cierra el micropreconcentrador. La placa de sustrato tiene por ejemplo una superficie de 2 a 20 cm². Los surcos tienen ventajosamente una longitud de 3 a 10 cm, una anchura de 100 a 1000 μm, una profundidad de 100 a 500 μm, y una sección de 0,01 a 0,5 mm². La sección de los surcos puede tener varias formas, como la rectangular, semicircular o circular.

15 De forma ventajosa, el módulo de preconcentración comprende también un sistema de circulación forzada que permite forzar el paso del aire ambiente a través del módulo de preconcentración.

20 El módulo de separación comprende una microcolumna cromatográfica que tiene ventajosamente una sección de 0,01 a 0,25 mm². La longitud de la microcolumna también se deberá escoger para optimizar la separación de los COV. Ventajosamente, es superior a 1 m, preferentemente comprendida entre 1 y 50 m. La selección de una longitud grande permite mejorar la eficacia de la columna y obtener de este modo una mejor separación de los COV. La microcolumna comprende una fase estacionaria que el experto en la materia sabrá escoger para optimizar la separación de los COV. Esta pertenece ventajosamente a la familia de los polisiloxanos (por ejemplo, dimetilpolisiloxano (PDMS)). También se pueden usar varias fases estacionarias. Estas fases pueden ser hidrocarburos ramificados, polietilenglicoles y polipropilenglicoles, poliésteres, sulfonas y poliariléteres, e incluso fases estacionarias con selectividades específicas.

30 La microcolumna comprende por ejemplo una placa de sustrato, tal como una placa de silicio, sobre cuya superficie se ha grabado un surco en el que se encuentra la fase estacionaria. Una segunda placa de un material idéntico o diferente al del sustrato (como una placa de vidrio), pegada sobre la superficie de la placa de sustrato grabada que incluye los surcos, cierra la microcolumna. La placa de sustrato tiene normalmente una superficie de 2 a 20 cm². El surco tiene ventajosamente una longitud superior a 1 m, preferentemente de 1 a 50 m, una anchura de 100 a 500 μm, una profundidad de 100 a 500 μm, y una sección de 0,01 a 0,25 mm². La sección de los surcos puede tener
35 varias formas, como la rectangular, semicircular o circular. El surco se puede realizar de varias maneras para minimizar la saturación y por tanto el tamaño de la estructura, por ejemplo en cordones paralelos (serpentin).

40 De acuerdo con otro modo de realizar el dispositivo de la invención, el módulo de separación comprende también un sistema de selección de los COV diana que comprende preferentemente una electroválvula y una unidad programable que permite el control de dicha electroválvula. Este sistema de selección está conectado directamente a la salida de la microcolumna. El tiempo de retención para una fase estacionaria y una longitud de microcolumna dadas es específico de cada COV. De este modo, recogiendo los tiempos de retención de cada COV diana, la unidad programable puede preprogramarse para que el sistema de selección dirija selectivamente las porciones de eluato correspondientes a los tiempos de retención de cada COV diana hacia el módulo de detección, evacuándose el resto del eluato del circuito de análisis. Dichas porciones del eluato pueden enviarse bien unas después de otras
45 al módulo de detección, según se van eluyendo, o bien almacenarse y después enviarse juntas al módulo de detección.

50 Los COV diana, que comprenden principalmente COV de origen fúngico, tienen concentraciones muy débiles comparadas con las concentraciones totales del conjunto de los COV presentes en el aire ambiente. De este modo, esta separación selectiva de los COV diana permite impedir la formación de un ruido de fondo y/o fenómenos de histéresis y/o de saturación de los captadores del módulo de detección que serían perjudiciales para la detección de los COV diana.

55 El módulo de detección del dispositivo de acuerdo con la invención comprende una matriz de captadores ventajosamente seleccionados los captadores electroquímicos de tipo polímero. Los captadores comprenden preferentemente una capa de polímero o de una mezcla de polímeros que tengan afinidad por los COV de origen fúngico.

60 Los COV pueden clasificarse en diferentes familias de acuerdo con su naturaleza química: COV alifáticos, alcoholes, cetonas, ésteres, éteres, aldehídos, COV aromáticos, COV clorados, COV nitrogenados o COV azufrados. Existen captadores químicos que pueden detectar compuestos que tienen un grupo funcional determinado. Este tipo de captadores pueden detectar e identificar la presencia de un COV que pertenezca a una familia determinada, pero no permiten diferenciar los COV que pertenecen a una misma familia.

65

En una realización particular, la matriz de captadores comprende captadores específicos de cada familia de COV. En ese caso, la respuesta de la matriz de captadores permite extraer una conclusión acerca de la presencia o ausencia de un COV en una parte del eluato dada, pero no es suficiente por sí misma para determinar la naturaleza del COV detectado. En cambio, la respuesta de la matriz de captadores permite determinar a qué familia o familias pertenece el COV detectado, y el conocimiento del tiempo de retención de la porción del eluato considerada permite conocer qué COV diana puede estar presente en dicha porción del eluato. De este modo, se puede deducir la presencia o la ausencia de los COV diana al combinar las informaciones suministradas por los tiempos de retención y la matriz de captadores.

En otra realización, la matriz comprende un conjunto de captadores que permite obtener una huella dactilar global específica de cada COV diana. Por huella dactilar global se entiende la combinación de respuestas del conjunto de captadores de la matriz. En ese caso, aunque captador de la matriz no sea específico de un COV diana único, la respuesta combinada de varios captadores permite identificar de forma específica cada COV diana. De este modo, se puede deducir la presencia o la ausencia de los COV diana a partir de las informaciones suministradas por la matriz de captadores.

En otra realización, la matriz de captadores comprende captadores específicos de cada COV diana. En ese caso, la matriz de captadores comprende tantos captadores como COV diana, y la respuesta de cada captador específico permite extraer una conclusión individual acerca de la presencia o la ausencia del COV diana del que es específico.

De forma ventajosa, el módulo de detección comprende también una cámara de confinamiento que encierra la matriz de captadores. Esta cámara permite el confinamiento de capas sensibles de captadores para exponerlos solamente a las muestras a analizar. De forma ventajosa, la cámara de confinamiento se realiza de un material no emisor o poco emisor COV en las condiciones de análisis, tal como acero inoxidable o politetrafluoroetileno (PTFE), para evitar la contaminación de la muestra a analizar.

En una realización particular, el dispositivo de la invención comprende además un módulo de tratamiento de la información tal como la tarjeta de control. Esta puede interpretar las señales emitidas por cada captador y deducir la presencia o la ausencia de cada COV diana. Preferentemente, el módulo de tratamiento de la información determina la presencia o no de una contaminación fúngica. Esta determinación se puede hacer por ejemplo mediante el cálculo de un índice de contaminación fúngica como el que se define en la solicitud de patente FR 2913501.

Los métodos clásicos de detección y/o de identificación utilizan equipos complejos tales como espectrómetros de masas, espectrómetros de infrarrojo, detectores de ionización de llama o detectores de conductividad térmica que son difíciles de miniaturizar. Este dispositivo tiene la ventaja de poderse miniaturizar y además la ventaja de poderse utilizar sin la intervención de un técnico experto.

El dispositivo de la invención presenta por tanto una ventaja en lo que respecta a su tamaño y permite reducir considerablemente el intervalo de tiempo entre las medidas sucesivas y/o el tiempo de respuesta de la medida. La duración de una medida con el dispositivo de la invención es normalmente de 10 a 180 min, preferentemente de 30 a 120 min. Un dispositivo de ese tipo permite la posibilidad de aplicar una estrategia eficaz de vigilancia de las contaminaciones fúngicas con un intervalo de tiempo corto entre las medidas. Así, se podría considerar un procedimiento de alerta para investigar y tratar las contaminaciones en sus primeros estadios del desarrollo. Además, los sistemas de control del aire ambiente, como los VMC, se pueden utilizar en el dispositivo de la invención para impedir o limitar el desarrollo fúngico.

En particular, la presente invención se refiere también a un procedimiento de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior aplicado mediante el dispositivo de la invención y que comprende:

- la toma de una muestra de COV en el ambiente interior;
- la separación de los COV muestreados; y
- la detección de los COV fúngicos presentes.

El procedimiento de la invención comprende la toma de una muestra de moléculas diana, preferentemente de COV del ambiente interior. Para hacerlo, el dispositivo de la invención está dispuesto en el ambiente interior y la toma de muestra se realiza por contacto entre el módulo de preconcentración y el aire ambiente. La toma de muestra se realiza por convección forzada provocando el paso del aire ambiente a través del módulo de preconcentración. El caudal del aire ambiente que atraviesa el módulo de toma de muestra es, por ejemplo, de 10 a 1000 ml/min. La toma de la muestra dura, en ese caso, entre 5 y 60 min. La toma de muestra se realiza preferentemente mediante adsorción de los COV sobre un material adsorbente. En ese caso, el procedimiento de la invención comprende igualmente una etapa de desorción de los COV adsorbidos. Esta se realiza por termodesorción en las condiciones bien conocidas del experto en la técnica.

El procedimiento de la invención comprende también la separación de moléculas diana, concretamente de los COV muestreados. La separación de los COV muestreados se realiza con el módulo de separación. En particular, los COV muestreados se separan por elución en una microcolumna cromatográfica. Los parámetros de separación óptimos como la temperatura de la columna o el caudal de la fase móvil se determinan por técnicas bien conocidas del experto en la técnica dependiendo de la geometría de la columna, la naturaleza de la fase estacionaria y del gas portador.

En una realización del procedimiento de acuerdo con la invención, los COV diana se seleccionan entre los COV muestreados mediante el módulo de separación. Esta etapa se realiza mediante el sistema de selección durante la elución de la muestra en la microcolumna cromatográfica. Para hacerlo, se procede de la siguiente forma. Cada COV diana se eluye a una velocidad diferente conocida por un sistema cromatográfico dado. Se atribuye, por tanto, un tiempo de retención dado a un COV diana. Se programa el sistema de selección con estos valores. El sistema de selección puede, en ese momento, seleccionar las partes del eluato que tengan un tiempo de retención correspondientes a los COV dianas. Estas partes del eluato se envían entonces selectivamente hacia el módulo de detección. Las partes del eluato que no corresponden a los valores preprogramados se eliminan. En consecuencia, el módulo de detección solamente detecta la presencia o la ausencia de los COV diana.

Como el resto del eluato se extrae del circuito de análisis, se pueden evitar los fenómenos de histéresis y/o de saturación de los captadores del módulo de detección que podrían provocar la presencia de COV no dianas que tienen por lo general una concentración bastante superior a los COV de origen.

Los COV diana se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en 1-octen-3-ol, 1,3-octadieno, metil-2-etilhexanoato, 2-metilfurano, 3-metilfurano, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, α -pineno, 2-hepteno, dimetilsulfuro, 4-heptanona, 2(5H)-furanona, 3-heptanol, metoxibenceno y 2-etilhexanol, y sus mezclas.

De forma ventajosa, el procedimiento de la invención comprende también la determinación de un índice de contaminación fúngica por ejemplo, utilizando el procedimiento definido en la solicitud de patente FR 2913501.

El procedimiento de acuerdo con la invención se utiliza preferentemente en continuo. De forma ventajosa, la duración de un ciclo de medida es de 10 a 180 min, preferentemente de 30 a 120 min.

Breve descripción de las figuras

Otras características, detalles y ventajas de la presente invención serán evidentes tras la lectura de la descripción siguiente, en referencia a las figuras anexas, que ilustran:

- Figura 1: esquema de un dispositivo de detección de acuerdo con una variante preferida de la invención.
- Figura 2: representación de los motivos de alineamiento de la microestructura de pretratamiento;
- Figura 3: representación de los 3 niveles de máscara para la realización de una microcolumna cromatográfica;
- Figura 4: representación de los 3 niveles de máscara para la realización de una microestructura de preconcentración;
- Figura 5: representación esquemática del procedimiento de fabricación de los micromódulos de pretratamiento;
- Figura 6: representación esquemática del procedimiento de fabricación de los electrodos interdigitados del módulo de detección ;
- Figura 7: representación de la máscara para realizar los chips que contienen los electrodos interdigitados del módulo de detección;
- FIG. 8: cromatograma de las emisiones de la cámara que contiene los 8 trazadores (Chaîne Hewlett Packard – modo SIM) para validar el módulo de concentración,
- FIG. 9: cromatograma obtenido a partir de la inyección de 5 μ l de la solución madre que contiene 8 trazadores en etanol (HP)) para la validación del módulo de separación,
- Figura 10A: circuito de "puente de Wheatstone" y circuito de amplificación para el tratamiento de las informaciones de los captadores del módulo de detección;
- Figura 10 B: circuito de amplificación para el tratamiento de las informaciones de los captadores del módulo de detección;
- FIG. 10C: esquema de la respuesta de la película Ppy/octanosulfonato (0,3 M) a los 8 COVm en etanol y en agua;
- FIG. 10D: esquema de la respuesta de las películas Ppy / octanosulfonato (0,3 M) y PEDOT-PSS; y
- FIG. 10E: esquema de la respuesta de la película PEDOT-PSS.
- FIG. 10F: esquema de la respuesta de la película PEDOT-PSS para los alcoholes obstruidos.
- FIG. 11: esquema de principio del sistema de análisis que comprende el dispositivo de detección y la interfaz de control;
- FIG. 12: representación esquemática de los estados de los elementos del sistema de análisis;
- FIG. 13: esquema de la interfaz de control del dispositivo de detección y
- FIG. 14: organigrama de funcionamiento del sistema de análisis.

Para mayor claridad, los elementos idénticos o similares se marcan con números de referencia idénticos en el conjunto de las Figuras.

Descripción detallada de las realizaciones

5 En referencia a la Figura 1, el dispositivo de acuerdo con una variante preferida de la invención comprende un módulo de concentración MC, un módulo de separación MS y un módulo de detección MD, estando los módulos sucesivamente unos a continuación de otros. El dispositivo comprende además una electroválvula E1 que tiene dos posiciones a y b corriente arriba del módulo de concentración. Esta electroválvula E1 permite una entrada de una muestra de aire cuando está en posición a, y una entrada de un aire filtrado por un tubo tenax Tx2 cuando está en posición b. El dispositivo comprende también una electroválvula E2 entre el módulo de concentración y el módulo de separación. Esta electroválvula E2 tiene dos posiciones a y b y permite orientar un flujo de aire procedente del módulo de concentración MC hacia el módulo de separación MS cuando está en posición b, y una salida de dicho flujo hacia el exterior del dispositivo cuando está en posición a. Los flujos de aire se generan con una bomba P situada aquí entre el módulo de concentración y la electroválvula E2. El dispositivo incluye también igualmente una electroválvula E3 entre el módulo de separación MS y el módulo de detección MD. Esta electroválvula E3 tiene dos posiciones a y b y permite orientar un flujo de aire procedente del módulo de separación MS directamente hacia el módulo de detección MD cuando está en posición a, y una orientación de este flujo hacia el módulo de detección MD mediante un tubo tenax Tx1 cuando está en la posición b.

20 Los ejemplos de realización siguientes ilustran las presente invención, sin limitar de forma alguna su alcance.

EJEMPLO 1: PRIMERA REALIZACIÓN DEL DISPOSITIVO

25 El módulo de preconcentración comprende un micropreconcentrador grabado sobre una placa de silicio mediante un procedimiento DRIE. El micropreconcentrador está compuesto de 20 surcos de 6 cm de longitud, de sección rectangular de 500 µm de anchura y 250 µm de longitud, y tiene un volumen útil de 0,15 cm³. Los surcos están rellenos de partículas de resina basada en óxido de 2,6-difenilo comercializado con el nombre TENAX® TA con un diámetro promedio de 120 µm, una superficie específica de 35 m²/g, una porosidad de 2,4 cm³/g y un tamaño de poros promedio de 200 nm. El micropreconcentrador está cerrado por una placa de vidrio encolada a la superficie que tiene los surcos de la primera placa.

35 Una microcolumna cromatográfica se graba sobre una placa de silicio mediante un procedimiento DRIE. La microcolumna está compuesta por un surco de 5 m de longitud, de sección rectangular de 150 µm de anchura y 200 µm de longitud. El surco está dispuesto en forma de cordones paralelos (o serpentín) que tiene codos en forma de arco circular para evitar la formación de ángulos muertos. Una fase estacionaria de PDMS, dimetilpolisiloxano (Sylgard® 184, comercializada por la empresa Dow Corning), está incluida dentro de la microcolumna. La microcolumna está cerrada con una segunda placa de vidrio encolada sobre la superficie que tiene el surco de la primera placa.

40 El módulo de detección comprende una matriz de captadores compuesta por 4 captadores poliméricos. Los captadores poliméricos tienen afinidad por los COV de origen fúngico (respectivamente PEDOT-PSS, polipirrol/octanosulfonato de sodio, polipirrol/perclorato de tipio y polibiloureno) depositado sobre pares de electrodos interdigitados. La matriz de captadores está situada en una cámara de confinamiento de acero inoxidable con una junta de PTFE.

45 Los diferentes elementos están conectados entre sí y al sistema de circulación mediante conectores NanoPort™.

EJEMPLO 2: MARCADO CON PATRONES DE LA MICROCOLUMNA DE LA PRIMERA REALIZACIÓN

50 Para el marcado con patrones, la matriz de captadores del dispositivo del ejemplo 1 se sustituye por un espectrómetro de masas.

55 Los parámetros experimentales de la cadena de análisis de recogen en la tabla 1.

Tabla 1: Características del GC/MS

Parámetros	Condiciones analíticas
Termodesorbedor	Turbomatrix ATD (Perkin Elmer)
Temperatura de desorción	370 °C
Caudal de desorción	50 ml/min Nitrógeno N50
Duración de la desorción	15 min
Temperatura de la trampa fría (Tenax TA)	-30 °C

Temperatura de inyección (40 °C/s)	300 °C
Temperatura de la línea de transferencia	220 °C
Cromatografía de gases / Espectrometría de masas	Autosystem XL / Turbomass (Perkin Elmer)
Microcolumna	Sylgard 184
Gas portador	Helio N60
Presión constante	258,6 kPa (37,5 psi)
Ciclo de temperatura	40 °C durante 2 min 1 °C/min. hasta 41 °C Meseta de 2 min 0,3 °C/min. hasta 44 °C durante 2 min 1 °C/min. hasta 47 °C Meseta de 2 min
Parámetros del espectrómetro de masas	Modo cuadrupolo EI, barrido (33-400)

Las muestras de los COV diana se hicieron pasar por la microcolumna para determinar los tiempos de retención de cada COV diana.

- 5 Los tiempos de retención de cada COV diana se recogen en la tabla 2.

Tabla 2

Compuestos	Tiempos de retención (min)
1-octen-3-ol	4,7
1,3-octadieno	1,6
metil-2-etilhexanoato	9,1
2-etilhexanol	5,7
α-pineno	2,7
2-metilfurano	0,5
3-metilfurano	0,5
3-metil-1-butanol	1,4
2-metil-1-butanol	1,4
2-hepteno	0,8
4-heptanona	2,1
3-heptanol	4,8
Metoxibenceno	2,6

EJEMPLO 3: MÉTODOS EXPERIMENTALES

- 10 3.1 Dispositivo experimental para captadores poliméricos
- 3.1.A Sistema de adquisición de datos
- 15 Los experimentos se realizaron con un sistema que permite la adquisición de señales procedentes de una tarjeta compuesta de polímeros conductores que conformar el núcleo del sistema.
- Las cámaras de emisión se situaron fuera del sistema. Un sistema de filtración compuesto de un tubo TENAX -Tx se situó corriente arriba de la cámara de emisión y garantiza una renovación de aire "limpio" (fuga). Posteriormente, un tubo de PTFE permite la conexión entre la cámara de emisión y una electroválvula de 3 vías. El conjunto de conexiones también es de PTFE. La electroválvula de 3 vías (comercializada por la empresa BIO-CHEM-VALVE CORP) permite seleccionar una vía de referencia (aire filtrado con carbón activo), una vía de toma de muestra (cámara de emisión) o una vía de limpieza (mezcla de 1-butanol / agua).
- 20
- 25 Una bomba (comercializada por la empresa ESCAP) permite transferir aire de diferentes ambientes a 147 ± 1 ml.min⁻¹ hacia la matriz de captadores confinada en una cámara de PTFE (20x25x5 mm de dimensiones internas, es decir, un volumen total de 2,5 ml).
- 30 Se realizó específicamente para este estudio una tarjeta adaptada a dicho sistema. Esta tarjeta está formada por 12 pares de electrodos de oro (con una capa de sujeción de cromo) depositados sobre una oblea de vidrio (se sigue hablando de tarjeta o microtarjeta).

A continuación se depositaron polímeros entre cada par de electrodos mediante electropolimerización o revestimiento de gota (depósito de una gota de polímeros en solución).

5 El sistema se controla con el tiempo. Permite observar la evolución de la resistividad de los captadores ($R_{muestra}$), así como recuperar informáticamente dichos datos para su tratamiento. El aire filtrado sobre carbón activo constituye la referencia para determinar la línea de base ($R_{referencia}$). Una mezcla de 1-butanol / agua (1/50; v/v) permite la limpieza completa de los captadores después de su exposición a una cámara de emisión. Efectivamente, esta mezcla permite saturar el captador a la vez que permite un retorno rápido a la línea de base.

10 Los resultados se presentan en forma de diferencias fraccionales de resistencias:

$$\% \frac{\Delta R}{R} = \frac{(R_{muestra} - R_{referencia})}{R_{referencia}} \times 100$$

3.1.B Depósito de la capa de polímeros

15 Los polímeros conductores se pueden sintetizar a partir de una amplia gama de monómeros en diferentes solventes en presencia de numerosos contraiones. Así, los experimentos consistieron en depositar diferentes polímeros conductores, dopados con distintos contraiones, así como de mezclas de dichos polímeros, sobre los electrodos de la matriz del sistema.

20 Los polímeros en solución se depositaron con la punta de una micropipeta. Los polímeros disponibles en forma pulverulenta se solubilizaron en cloroformo y después depositados análogamente mediante la punta de una micropipeta. Estos polímeros en solución se doparon después con vapores de yodo (I_2) durante 2 horas. El PEDOT-PSS es un polímero en solución acuosa ya conductor y no necesita doparse con vapores de yodo.

25 El depósito de los polímeros insolubles se realiza mediante electropolimerización hasta percolación (unión de polímero entre los dos electrodos) mediante un circuito de 3 electrodos y la solución de monómero (concentración de $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) con un electrolito (concentración de $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$).

30 EJEMPLO 4: CARACTERIZACIÓN DE CAPAS SENSIBLES

4.1 Diferenciación de ambientes mediante captadores poliméricos

35 4.1.A Caracterización a partir de capas fúngicas

Los ensayos preliminares, realizados a partir de diferentes cepas del estudio, permitieron obtener respuestas específicas de los captadores poliméricos sometidos a ambientes mohosos. El conjunto de los perfiles obtenidos con las diferentes cepas (repetido 3 veces) muestra un comportamiento diferente de la respuesta de los captadores entre un ambiente contaminado y un ambiente estéril. Después de esta observación, se realizó una captación más precisa de las respuestas de los captadores poliméricos con dos especies de mohos que aparecen frecuentemente en todos los tipos de ambientes interiores: *Penicillium brevicompactum* y *Aspergillus niger*.

45 El protocolo experimental utilizado para la caracterización de las respuestas consiste en hacer pasar diferentes muestras de aire sobre los 12 captadores poliméricos presentes en la tarjeta del sistema durante 20 min. Entre los 14 polímeros y mezclas de polímeros ensayados (tabla 3), 5 muestran un comportamiento diferente de la señal en función de los tipos de muestras (aire filtrado, cámara testigo, cámara contaminada). Se realizaron ensayos a partir de los siguientes polímeros conductores. La lista de los polímeros así como las mezclas (superposición de las diferentes capas) utilizados para distinción entre entornos contaminados y no contaminados se presenta en la tabla 3.

50 Tabla 3: Lista de polímeros conductores ensayados.

Polímero en solución:	
Poli(etilendioxitiofeno)poli(estirenosulfonato) (PEDOT-PSS)	
Polímeros en solución (dopados con I_2)	
Polímeros solos	Mezclas de polímeros
Poli(bifluoreno-EDOT-carbazol)	PEDOT-PSS + poli(bifl-EDOT-Cz)
Poli (4-fluorenil) tiofeno	PEDOT-PSS + Poli (4-fluorenil) tiofeno
Copolímero de (bifluoreno-EDOT-carbazol) (COPO (bifl-EDOT-Cz))	PEDOT-PSS) + COPO (bifl-EDOT-Cz))
Poli (EDOT-di-Cz)	PEDOT-PSS + poli (EDOT-di-Cz)
Poli (3-hexilteofeno) (P3HT)	PEDOT-PSS + P3HT

Polímeros electrodepositados

Polímeros solos

Polipirrol + perclorato de litio

Polipirrol + paratoluensulfonato de sodio

PEDOT + perclorato de litio

Los captadores que proporcionaron resultados aprovechables son de PEDOT-PSS, polipirrol + perclorato de litio, PEDOT-PSS y de COPO, con unidades de biftuoreno dibromado, correctamente dopado con vapores de diyodo y de Ppy/octanosulfonato (0,3 M) en etanol y agua.

5 El resto de polímeros bien no mostraron ninguna respuesta o bien mostraron respuestas variables no específicas de los estímulos aplicados.

10 Se realiza preferentemente después un protocolo de limpieza que permite una desorción completa de los COV adsorbidos para evitar esta deriva en el caso de uso de estos polímeros en un sistema de captadores dedicado a la detección de mohos para aplicaciones in situ.

15 En los diferentes ensayos se constató igualmente un fenómeno de dilución de aire contaminado derivado de las tomas de muestras sucesivas. Esto permite explicar las variaciones entre dos tomas de muestra en una misma cámara.

20 Los COV emitidos por los mohos son moléculas polares (alcohol, cetonas, compuestos azufrados). La hipótesis realizada sobre el mecanismo de interacción sería, por tanto, una interacción de estas funciones polares con los átomos de oxígeno (O), azufre (S) y nitrógeno (N) presentes en los polímeros.

EJEMPLO 5: SEGUNDA REALIZACIÓN.

25 En una problemática de análisis de los compuestos en el aire, los límites principales de los sistemas multicaptadores son su fuerte sensibilidad a la humedad, la deriva y la contaminación de las capas sensibles de los captadores. Sin embargo, la utilización de una matriz de captadores permite un muestreo rápido, simple, no invasivo y no destructivo, para la detección e identificación de los compuestos volátiles, sin que sea necesaria una formación compleja del usuario.

6.1 Material biológico y soporte de crecimiento

30 La especie fúngica seleccionada para los ensayos es una cepa del Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie de Bruselas (IHEM): *Aspergillus niger*. Esta cepa se conservó a 4 °C en agua ultrapura en medio S10 (caldo de Sabouraud glucosado al 2 % diluido; Merck). El cultivo se alterna sobre S10 que constituye un medio pobre (medio más cercano a la realidad) y sobre gelosa avena, que es un medio rico en nutrientes. El cultivo final se obtiene después de 7 días a 25 °C sobre gelosa avena.

35 Para todos los medios nutrientes, los cultivos se incubaron a 25 °C en la oscuridad. Esta especie se seleccionó porque se encuentra frecuentemente en ambientes anteriores y emite, durante su desarrollo, todos los trazadores del índice de contaminación fúngica.

40 El soporte de crecimiento empleado es tela de vidrio para pintar. Este material se recorta y se esteriliza (121 °C, 45 min, calor húmedo) antes de añadirle agua destilada.

6.2 Cámaras de emisión de COV específicos

45 Los ensayos en módulos de concentración y realización también se realizaron a partir de cámaras de emisión de 300 ml idénticas a las utilizadas anteriormente en esta realización para el desarrollo de los índices de contaminación. Se depositaron entonces patrones de dianas químicas en las cámaras para ensayar los diferentes micromódulos. Para ello, se usaron ocho compuestos identificados como trazadores de un desarrollo fúngico. La lista de estos patrones (comercializados por la empresa SIGMA-ALDRICH) se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Lista de patrones para validar los módulos de pretratamiento

Compuesto	Pureza (%)
2-metilfurano	99
3-metil-1-butanol	99
2-metil-1-butanol	99
4-heptanona	98
3-heptanol	99

Metoxibenceno	99
α -pineno	98
1-octen-ol	98

Estos 8 trazadores se solubilizaron en etanol para obtener una concentración a 5 g.l⁻¹.

5 El soporte de crecimiento empleado es tela de vidrio. Este material se recorta y se esteriliza (121 °C, 45 min, calor húmedo) antes de añadirle agua destilada. Cada una de las cámaras incluye 50 ml de canicas de vidrio y 5 ml de agua destilada. Tras disponer el soporte en las cámaras, la tasa de carga obtenida es de 7,10⁻² cm²/cm³.

10 A partir de estas cámaras de emisión se desarrollaron tres ambientes, un ambiente testigo (ausencia de contaminación), un ambiente contaminado por *Aspergillus niger* y un ambiente que incluye una solución de los 8 patrones. La preparación de la suspensión de esporas utilizada para la contaminación por *Aspergillus niger* se realizó vertiendo 50 ml de agua ultrapura sobre la cepa repicada en avena.

15 Para el condicionamiento de las diferentes cámaras, se hizo pasar aire filtrado con carbón activo (eliminación de los COV presentes antes del inicio del crecimiento) durante 30 min. Las cámaras se colocaron a continuación en una incubadora durante 7 días a 25 °C y en la oscuridad.

6.3 Muestreo y análisis de los COV

6.3.A Muestreo de los COV

20 Para el muestreo y el análisis de los COV durante la fase de validación de las microestructuras, se utilizaron dos cadenas analíticas. De este modo, se prefieren dos técnicas de toma de muestra para permitir un muestreo compatible con el sistema de inyección de cada una de las dos cadenas analíticas.

25 En lo que respecta a la primera cadena analítica -GC/MS 1- (comercializada por la empresa Perkin Elmer), el muestreo se realiza a partir de un tubo Tenax. Como para la parte del desarrollo de los índices de contaminación, los muestreos en el tubo Tenax -Tx- se realizan de forma dinámica con un caudal de 100 ml.min⁻¹ durante 30 min en una cámara mediante una bomba de aire FL-1001, comercializada por la empresa Flec.

30 De este modo, los COV quedan atrapados en los tubos de acero inoxidable, que contienen un adsorbente sólido adecuado para los COV que contiene de 4 a 18 átomos de carbono, Tenax TA (comercializado por la empresa Supelco).

35 Este adsorbente es un polímero poroso basado en óxido de 2,6-difenileno cuya granulometría varía de 0,18 mm a 0,25 mm (malla 60 a malla 80). Se realiza de forma ventajosa una limpieza previa del Tenax TA mediante condicionamiento térmico, bajo un caudal de nitrógeno.

40 El tubo Tenax se desorbe a continuación con un termodesorbedor automático que permite liberar de este modo los COV atrapados. La muestra así desorbida se inyecta directamente en la columna. La desorción térmica es una técnica de extracción de compuestos orgánicos volátiles a partir de una matriz sólida mediante calentamiento de una muestra barrida con un flujo de gas inerte. Los compuestos quedan adsorbidos en una trampa fría a -30 °C y después se desorben a 300 °C antes de dirigirse hacia la columna cromatográfica donde se separan posteriormente.

45 La segunda cadena -GC/MS 2- (comercializado por la empresa Hewlett Packard) no incluye un termodesorbedor. En ese caso, el muestreo de COV se realiza a partir de viales (frascos de vidrio con un volumen de 2 ml), en los que se recogen las muestras de gas a analizar. Las emisiones procedentes de las cámaras se retiran entonces con una bomba de membrana SP 725 EC con un caudal de 6,2 ml.min⁻¹ durante 30 min hacia una cámara que contiene un vial de toma de muestra.

50 La muestra de gas queda confinada en el vial, lo que permite después que un inyector automático de la cadena de análisis extraiga un volumen de aire mediante una jeringa hacia uno de los viales presentes en el alimentador automático.

6.3.B Descripción de las cadenas analíticas

55 Las 2 cadenas analíticas, GC/MS 1 y 2, usadas para analizar los COV consisten en la combinación de dos técnicas:

- Cromatografía en fase gaseosa (CG) utilizada para separar los COV.

60 - Espectrometría de masas (EM) utilizada para identificar dichos compuestos.

Las características de las dos cadenas de análisis, Perkin Elmer y Hewlett Packard, utilizadas para la validación de

las microestructuras se precisan respectivamente en las tablas 5 y 6.

Tabla 5: Características del CG/EM 1 (Perkin-Elmer).

Parámetros	Condiciones analíticas
Termodesorbedor	Turbomatrix ATD (Perkin Elmer)
Temperatura de desorción	370 °C
Caudal de desorción	50 ml/min Nitrógeno N50
Duración de la desorción	15 min
Temperatura de la trampa fría (Tenax TA)	-30 °C
Temperatura de inyección (40 °C/s)	300 °C
Temperatura de la línea de transferencia	220 °C
Cromatografía de gases / Espectrometría de masas	Autosystem XL / Turbomass (Perkin Elmer)
Columna capilar	CP-SIL PONA CD
Características geométricas de la columna. longitud; diámetro interno; espesor de la fase estacionaria	50 m ; 0,21 mm, 0,5 µm
Gas portador	Helio N60
Presión constante	37,5 psi
Ciclo de temperatura	40 °C durante 2 min 1 °C/min. hasta 41 °C Meseta de 2 min 0,3 °C/min. hasta 44 °C durante 2 min 1 °C/min. hasta 47 °C Meseta de 2 min
Parámetros del espectrómetro de masas	Modo cuadripolo EI, barrido (33-400)

5

Tabla 6: Características del CG/EM 2 (Hewlett Packard).

Parámetros	Condiciones analíticas
Temperatura de inyección (40 °C/s)	300 °C
Temperatura de la línea de transferencia	200 °C
Cromatografía de gases / Espectrometría de masas	HP 6890 / HP 5973
Columna capilar	HP-SMSUI (fase: 5 % fenilo 95 % metilpolisiloxano)
Características geométricas de la columna. longitud; diámetro interno; espesor de la fase estacionaria	30 m ; 25 mm, 0,25 µm
Gas portador/caudal	Helio / 0,5 ml/min
Ciclo de temperatura	Isoterma 40 °C durante 2 min
Interfaz	200 °C
Parámetros del espectrómetro de masas	Modo cuadripolo EI, barrido (20-700)
Temperatura fuente EM	230 °C
Temperatura EM cuadripolo	150 °C

Para las 2 cadenas analíticas, Los espectros obtenidos se comparan con una biblioteca de espectros de masa (NIST, 1998).

10 Se utilizaron dos modos de análisis para la detección de estos compuestos.

- El modo denominado "de barrido" o "fullscan", usado cuando se desea registrar espectros denominados "de origen", es decir, espectros en los que están presentes todos los productos iónicos en la fuente en un momento dado.

5 - El modo "SIM" ("Single Ion Monitoring"), que consiste en detectar solamente uno (o varios) ion(iones). Así, el espectrómetro de masas funciona como un filtro. Está programado para detectar solamente algunos iones característicos de los analitos estudiados (1 a 4, en general). El aumento en la señal asociada con la detección de los analitos permite un aumento de la sensibilidad disminuyendo a la vez el ruido de fondo cromatográfico. Con un cuadrípulo, la duración del barrido (dwell) de los iones es proporcional a la gama de relaciones de m/z barrida. Al operar sobre pocos valores de m/z aumenta de esta forma considerablemente el tiempo dedicado a la detección de los iones correspondientes, si se compara con el modo "fullscan". El modo "SIM" se utiliza cuando se inyectan concentraciones muy pequeñas de muestra.

15 De este modo, durante una toma de muestra en un tubo Tenax, un divisor a la salida de la columna permite inyectar un 3 % del volumen de la muestra tomada, es decir 90 ml, para proteger el detector en caso de concentraciones muy importantes de un compuesto.

20 En el caso de una toma de muestra con vial, el volumen inyectado es de 5 µl. Existe, por tanto, un factor de dilución de 18000 si se compara con el análisis de una muestra tomada con el tubo Tenax. La tabla 7 indica las características de la toma de muestra en función de los dos modos de muestreo utilizados.

Tabla 7: Características de las tomas de muestra

Modo de toma de muestra	Tubo Tenax	Vial
Caudal (ml.min ⁻¹)	100	6,2
Duración (min)	30	30
V _{toma de muestra} (ml)	3000	186
V _{inyección}	90 ml	5 µl

6.4 DISPOSITIVOS DE VALIDACIÓN DE LOS MÓDULOS

25

6.4.A Módulo de preconcentración

30 La microestructura de concentración desarrollada en esta realización se compone de un sustrato de silicio en el que se han grabado surcos de 60 mm de longitud por una anchura de 500 µm. La fusión con un sustrato de vidrio permite realizar cavidades cerradas. La microestructura se funcionaliza después con granos de Tenax con un diámetro promedio de 120 µm. Conectores de fluidos adaptados a este tipo de microestructuras permiten introducir en los orificios de acceso unos micromódulos capilares para permitir la conexión con una bomba y permitir una circulación de aire a través de la estructura.

35 El protocolo de ensayo relativo a la microestructura de concentración implica preferentemente el uso de dos tipos de muestras, una muestra con los trazadores (cámara de emisión que contiene la mezcla de 8 trazadores) y una muestra con una contaminación fúngica (cámara de emisión que contiene la tela de vidrio contaminada con *Aspergillus niger*).

40 El protocolo de ensayo consiste en extraer el aire de las diferentes cámaras a través del preconcentrador durante 30 min a un caudal de 6,2 ml.min⁻¹ mediante una bomba de membrana SP 725 EC. La muestra procedente del preconcentrador se desorbe después a 140 °C durante 30 min y se extrae mediante la bomba en una cámara que contiene un vial de toma de muestra. La muestra procedente del preconcentrador incluida en el vial se analiza después en una cadena de análisis GC/EM.

45

6.4.B Módulo de separación

50 La microestructura de separación desarrollada en esta realización se compone igualmente de un sustrato de silicio en el que se ha grabado un surco de 5 m de longitud por una anchura de 150 µm y una profundidad de 200 µm. La fusión con un sustrato de vidrio permite realizar el canal. La microestructura se funcionaliza después con una fase estacionaria compuesta de PDMS para permitir la retención de las moléculas que la atraviesan. Como para la microestructura de concentración, conectores de fluidos adaptados permiten introducir en los orificios de acceso unos micromódulos capilares para permitir la conexión con una bomba y permitir la circulación del flujo de aire a través de la estructura.

55

Una vez que la microcolumna cromatográfica se ha realizado y funcionalizado, se realizaron ensayos para comprobar su eficacia de retención y de separación de los diferentes compuestos dianas del estudio.

60 Para ello, el banco de análisis de cromatografía en fase gaseosa utilizado durante el desarrollo de los índices de contaminación se utilizó sustituyendo la columna cromatográfica clásica por la microcolumna. Se instaló a la salida el

espectrómetro de masas para identificar los compuestos.

Igualmente se utilizaron dos tipos de muestras en el protocolo de ensayo de la microcolumna, una muestra con los trazadores (cámara de emisión que contiene la mezcla de 8 trazadores) y una muestra con una contaminación fúngica (cámara de emisión que contiene la tela de vidrio contaminada con *Aspergillus niger*). Las muestras de aire de las diferentes cámaras se recogieron mediante el tubo Tenax con un caudal de 100 ml.min⁻¹ durante 30 min mediante una bomba (Air Pump 1001, Flec). A continuación, los tubos se colocaron en el termodesorbedor automático de la cadena de análisis GC/MS para facilitar su análisis. Así, las muestras se separan mediante la microcolumna y se analizan a la salida mediante espectrometría de masas para comprobar la eficacia de la retención. En el protocolo de ensayo de la microcolumna, también se utilizó el método de toma de muestra mediante vial. Análogamente, las muestras se analizaron sustituyendo la columna clásica por la microcolumna en la segunda cadena de análisis GC/MS.

EJEMPLO 6: PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DE LOS MÓDULOS DE PRETRATAMIENTO.

7.1.A Elementos constituyentes de los micromódulos

Para definir el procedimiento de fabricación de los micromódulos, la primera elección tecnológica se refiere al sustrato usado para grabar los motivos. El silicio constituye un material de base muy usado en la realización de microsistemas gracias a sus características mecánicas y eléctricas. El silicio monocristalino es abundante y barato, y resulta un material bien adaptado a la miniaturización.

Los dispositivos se realizaron sobre el sustrato de silicio a partir de placas (obleas) de doble cara de 4 pulgadas (aproximadamente 10 cm) de diámetro y con un espesor de 500 µm (entre 475 y 525 µm).

La realización de estructuras microfluidas implica poder realizar una conexión entre el microsistema y el sistema de circulación de aire (microbomba, válvula...). La solución escogida para esta realización es el uso de "NanoPort". Los conectores fluidos están adaptados a las microestructuras y permiten proporcionar a los orificios de acceso unos micromódulos capilares. La instalación de estos conectores requiere un buen alineamiento entre el orificio de acceso de la microestructura y el orificio del conector que permite la inserción de los capilares. Estos conectores se componen de un anillo de cola, una junta de estanqueidad, el cuerpo del conector, y finalmente el "tornillo" que permite la inserción del capilar.

Los tubos utilizados en esta realización para conformar las conexiones entre los diferentes módulos del sistema son tubos PEEK con un diámetro exterior de 1/32 pulgadas (800 µm) y un diámetro interior de 0,008 pulgadas (200 µm).

El uso de los dos módulos que son una microcolumna cromatográfica así como una microestructura de concentración implica poder controlar la temperatura. Efectivamente, la temperatura de la columna afecta a su eficacia, y las estructuras de concentración requieren una temperatura de calentamiento para poder liberar las moléculas atrapadas. Desde este punto de vista, se han integrado en los micromódulos, por tanto, resistencias de calentamiento.

El material más utilizado en la bibliografía para este tipo de aplicación es el platino. Además de un coeficiente de temperatura positivo, y un buen factor de sensibilidad, este material tiene una resistividad elevada. Un material de fuerte resistividad tiene la ventaja de disipar una gran cantidad de calor por efecto joule. El platino también se caracteriza por una importante linealidad de la temperatura. El uso del platino requiere, sin embargo, el uso de una capa de agarre. El material utilizado para realizar esta capa de agarre es el titanio. Los espesores de los depósitos son, respectivamente para el titanio y el platino, de 50 y 100 nm.

7.1.B Diseño de las máscaras

El uso de la litografía sigue siendo, entre las tecnologías del silicio, una vía muy usada para la fabricación de microestructuras como las microcolumnas cromatográficas o las microestructuras de concentración. Permite realizar estructuras con resoluciones muy importantes. El enfoque usado generalmente para la realización de este tipo de estructuras se denomina "top-down", es decir que, desde el sustrato, el procedimiento graba el motivo en el material.

La litografía implica diseñar previamente las máscaras utilizadas en el procedimiento de fabricación propiamente dicho, que permiten definir las zonas de exposición y por tanto las zonas de grabación del sustrato. El diseño de estas máscaras se realizó con el programa informático Coventor 2008.

Así, estas máscaras permiten definir la geometría final de las estructuras. Para la realización de los dos módulos de los inventores, "separación" y "concentración", fueron necesarios 3 niveles de máscaras: el primero define la geometría de los surcos grabados en la cara delantera, el segundo, en la cara posterior, para la creación de los orificios de acceso a la estructura, finalmente el tercero, para realizar las resistencias de calentamiento igualmente en la cara posterior.

Máscaras de la microcolumna.

El primer nivel de máscara -N1- se refiere por tanto a la geometría de los surcos -surco- de la columna. Se pueden prever varias formas geométricas relativas a la disposición de los surcos de una microcolumna para limitar la saturación y por tanto el tamaño de la estructura. En esta realización, la forma geométrica retenida es una configuración de tipo "serpentín". Para limitar los volúmenes muertos y facilitar el llenado de la columna, los codos de la columna entre cada surco se realizaron en forma de arco circular que permite la realización de una estructura que no presenta ángulos rectos. La selección de la longitud de la columna se fijó en 5 m. La selección de esta longitud relativamente importante para este tipo de microestructura se debe a que este dispositivo debe permitir la separación de muestras complejas de diferentes compuestos. La selección de una longitud grande permite mejorar también la eficacia de la columna y obtener de este modo una mejor separación de los compuestos.

Las características geométricas del chip para la realización de la microcolumna se recogen en la tabla 8.

Tabla 8: Características geométricas (en μm) del chip de la microcolumna

Surcos				Codos		Chip	
Longitud	Anchura	Espacio entre surcos	Número de surcos	Radio de los codos	Anchura de los codos	Longitud	Anchura
30000	150	100	162	125	150	41400	40900

Como para la selección de las resinas fotosensibles positivas o negativas, en un procedimiento de fabricación, durante el diseño de las máscaras se debe precisar la selección de la "polaridad" de la máscara. De este modo, los datos impresos en la máscara ("digitized data") deben precisarse bien en claro ("clear"), con un fondo opaco, o bien en opaco ("dark"), con un fondo claro. En la realización de este primer nivel de máscara, se ha seleccionado la polaridad con los datos en claro.

El segundo nivel de máscara -N2- se refiere a los orificios de acceso a la microestructura. La selección hecha en esta realización es acceder a la estructura desde la cara posterior del sustrato mediante NanoPorts que permiten la conexión entre el microsistema y el sistema de circulación de aire mediante el tubo PEEK. El diámetro interno de los tubos PEEK seleccionado fue de 200 μm para un diámetro externo de 800 μm , las dimensiones de los orificios de acceso seleccionadas son 400 μm de diámetro para facilitar la instalación del NanoPort. Efectivamente, estas dimensiones permiten el apoyo del tubo sobre la estructura y evitan el riesgo de cabalgamiento de los orificios del tubo y de la estructura. La polaridad de esta máscara también se ha seleccionado con los datos en claro.

El tercer nivel de máscara -N3- se refiere a la creación de resistencias de calentamiento utilizadas para calentar y controlar la temperatura de la estructura. El estado de la técnica conocido por el experto en la materia muestra la importancia de la temperatura en la realización de este tipo de microestructuras de separación.

El valor de una resistencia depende de las características geométricas, y está definida por la siguiente fórmula:

$$R = \rho \frac{l}{s} = \frac{\rho l}{e w}$$

en la que ρ es la resistividad del material, l la longitud, w la anchura, S la superficie, y e el espesor.

Las resistencias de calentamiento pueden estar integradas en las microestructuras, sin embargo, en un primer momento, se utiliza un recinto de confinamiento que incluye una resistencia de calentamiento externa.

Se prefiere la presencia de motivos de alineación durante la fase de la litografía para poder superponer las diferentes máscaras y alinear los diferentes motivos presentes en cada máscara. La colocación de las diferentes máscaras se realiza por alineación y superposición de dos figuras geométricas. Los motivos de alineación encontrados y utilizados de forma general en esta realización son cruces (Figura 2).

En esta realización, la presencia de motivos de alineación permite especialmente colocar los orificios de acceso -orif- en la cara posterior -post- con los orificios de entrada/salida situados en la cara anterior -ant- en los extremos de los microcanales. En ese caso, La precisión de los motivos de alineación es aún más importante, ya que un desajuste de algunos micrómetros entre estos dos motivos puede convertir la estructura en inútil. El uso de motivos de alineación de pequeñas dimensiones permite obtener de este modo precisiones de alineamiento de aproximadamente 1 μm .

También aparecen motivos de alineamiento sobre la máscara de las resistencias de calentamiento RC para colocarlas sobre la superficie formada por los microcanales.

Se muestra en la Figura 3 una imagen de los distintos niveles de máscaras desarrollados mediante Coventor 2008 para la realización de un chip de microcolumna.

Máscara del micropreconcentrador.

5 En la realización de la microestructura de concentración también se pueden aplicar varias formas geométricas. El material adsorbente usado en esta realización que permite atrapar las moléculas seleccionadas para la detección fúngica es TENAX TA. Para facilitar el llenado de la estructura con este material (disponible en forma de gránulo), se ha seleccionado una estructura que carece de codos. Los tubos TENAX de toma de muestra usados clásicamente
10 para la detección de los COV en el estudio de los inventores tienen un volumen útil de 1 cm^3 (longitud de 5 cm para un diámetro de 0,5 cm), con gránulos con un diámetro promedio de $300 \mu\text{m}$. En la realización de la microestructura de preconcentración, el tamaño de los gránulos utilizados es menor (diámetro promedio de $120 \mu\text{m}$). El uso de un diámetro inferior permite aumentar la superficie específica (6 veces), en consecuencia, se consigue una reducción del volumen útil a $0,25 \text{ cm}^3$ (por 4). De esta forma se diseñaron surcos de 60 mm de longitud por una anchura de
15 $500 \mu\text{m}$.

Para retener los gránulos en la microestructura durante el paso del aire, se fabricó una rejilla con micropilares a la salida de la estructura. Como el tamaño de los gránulos de TENAX insertados en la estructura puede alcanzar un diámetro mínimo de $75 \mu\text{m}$, las dimensiones de la rejilla de retención son pilares de $56 \mu\text{m}$ de ancho con un espacio entre pilares de $55 \mu\text{m}$.
20

Las características geométricas del chip para la realización del micropreconcentrador se recogen en la tabla 9.

Tabla 9: Características geométricas (en μm) del chip de micropreconcentrador

Surcos				Codos		Chip	
Longitud	Anchura	Espacio entre surcos	Número de surcos	Radio de los codos	Anchura de los codos	Longitud	Anchura
60000	500	50	20	56	55	84600	11450

25 En lo que respecta a los orificios de acceso en el segundo nivel de máscara, la solución tecnológica (NanoPorts) y las características geométricas de los orificios seleccionados son idénticas a las utilizadas para la realización del chip de la microcolumna.

30 Como en el caso del diseño de las máscaras de la microcolumna, también se aborda la integración de las resistencias de calentamiento en el módulo de preconcentración y por tanto se desarrolla un tercer nivel de máscara. Así, se prevé igualmente un recinto de confinamiento en un primer momento para poder utilizar una resistencia de calentamiento externa.

35 Se muestra en la Figura 4 una imagen de los distintos niveles de máscaras desarrollados mediante Coventor 2008 para la realización de un chip de preconcentración.

7.1.C Procedimiento de fabricación de los módulos de pretratamiento

40 La realización de tales estructuras supone naturalmente el problema de la selección de un procedimiento de fabricación, o más exactamente de una técnica de grabado compatible con estas resoluciones. Las dimensiones características de los canales son de aproximadamente un centenar de micrómetros y las selecciones, de forma clásica, tienen una forma rectangular, semicircular o circular. Según la bibliografía, la forma de la sección de las columnas capilares no afecta a la eficacia de la separación de la columna. Esta cuestión permite, por tanto, no
45 imponer ninguna limitación en lo que respecta al a forma del grabado definida mediante el procedimiento de fabricación.

El DRIE es un procedimiento de fabricación que permite realizar grabados anisótropos profundos con una intensa relación de aspecto. Se ha conservado por tanto la selección de la sección rectangular realizada mediante grabado DRIE.
50

Para los dos módulos de pretratamiento de las muestras, que son microcolumna y el preconcentrador, el procedimiento de fabricación establecido es prácticamente el mismo que el detallado en la Figura 5. La diferencia principal en el procedimiento entre los dos módulos se refiere a la profundidad de grabación de los surcos. De este modo, se ha definido una profundidad de grabación de $200 \mu\text{m}$ para los canales que constituyen la microcolumna cromatográfica y se ha definido una profundidad de grabación de $250 \mu\text{m}$ para los surcos de la estructura de preconcentración.
55

Etapa T1: Limpieza de la oblea

El sustrato (Si) de la placa (oblea) se sumerge preferentemente en un baño de HF al 1 % hasta obtener hidrofobia. Posteriormente este se aclara con agua desionizada durante 5 min. La limpieza consiste, en un primer momento, en disolver las impurezas orgánicas mediante ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 150 °C durante 3 min). En un segundo momento, las impurezas metálicas se atrapan mediante la formación de un óxido superficial mediante ácido nítrico (HNO_3 durante 3 min). La oblea se vuelve a aclarar durante 5 min en agua desionizada, después, la capa de óxido formada se suprime con otro baño de HF al 1 %, antes de un último aclarado con agua desionizada. A continuación, la oblea se seca bajo nitrógeno.

Etapa T2: Depósito de aluminio

El grabado con DRIE implica preferentemente el uso de una capa de protección que permite definir las zonas en las que el sustrato no se graba. La capa de protección utilizada en esta realización es una capa de aluminio -Al- de 5000 Å (es decir 500 nm) de espesor. El depósito se realiza mediante pulverización catódica a temperatura ambiente (24 °C) en un plasma de argón. La aceleración de los iones se obtiene con una diferencia de potencial de 0,5 kV. El depósito se realiza a baja presión, a $3 \cdot 10^{-7}$ Torr ($3 \cdot 10^{-4}$ Pa). La duración del depósito depende del espesor deseado del aluminio. La velocidad de depósito, con esos parámetros, es de aproximadamente 1 000 Å/min, por lo que el depósito dura 5 min.

Las etapas siguientes consisten en definir las zonas de grabación de la oblea mediante DRIE, es decir, las zonas no protegidas por la capa de aluminio. Estas etapas conllevan, por tanto, una fase de fotolitografía UV clásica sobre cada cara de la oblea, después un grabado en húmedo de la capa de aluminio.

Etapas T3, T4, T5 y T6: definición de las zonas de grabado

La etapa T3 consiste, por tanto, en depositar sobre cada cara de la oblea una capa de resina fotosensible res+. En el caso actual, la resina seleccionada es una resina positiva (PFR 7790), es decir, que las zonas de la resina expuestas a los UV quedarán disueltas. La resina se deposita primero de forma uniforme sobre una cara de la oblea, mediante un torno. Los parámetros de esparcimiento de la resina (velocidad de rotación, aceleración y, sobre todo, viscosidad de la resina) condicionan el espesor final del depósito. Como el espesor deseado es de 1,2 µm, la velocidad de rotación de la resina seleccionada es 4500 rev.min⁻¹ para una aceleración de 2000 rev.min⁻² durante 30 s. La utilización de la capa de resina en ambas caras de la oblea implica preferentemente un corto recocido de la resina (5 min a 110 °C) para endurecer esta y evacuar parte de los disolventes.

El depósito de resina en la segunda cara de la oblea se realiza después en las mismas condiciones, seguido de un recocido durante 15 min a 100 °C.

Se puede realizar ahora la primera etapa de la fotolitografía -L- en la cara posterior. Los parámetros de exposición (potencia de la lámpara y el tiempo de exposición) permiten definir la nitidez de los motivos. En el caso actual, el tiempo de iluminación se fija en 10 s con una potencia de la lámpara de 345 w.

La etapa T4 consiste, a continuación, en revelar la resina, especialmente con el fin de hacer aparecer los motivos de alineación para poder alinear la máscara de la cara anterior, durante la iluminación. Así, la oblea se sumerge en el baño de revelador (PRD 238) durante 1 min 10 s. La oblea revelada se enjuaga después con agua desionizada durante 3 min y se seca.

La etapa T5 consiste después en realizar la fotolitografía en la cara anterior. Para ello, antes de la iluminación es preferible realizar una alineación entre los motivos de la máscara y los de la cara anterior de la oblea. Las coordenadas de los motivos de la oblea se memorizan, y la posición de la máscara se puede alinear después al microscopio con las coordenadas de dichos motivos. Una vez realizado el alineamiento, las condiciones de exposición de la cara anterior son las mismas que para la cara posterior.

La etapa T6 consiste en revelar la resina en el baño de revelado y hacer aparecer de esta forma los motivos de la cara anterior. La oblea se sumerge en el baño hasta la aparición completa de los motivos.

Finalmente, es preferible un segundo recocido para calentar la oblea para endurecer completamente la resina. Esta etapa de recocido se realiza en una estufa a 100 °C durante 15 min. La oblea se limpia después con un plasma O₂ para eliminar los restos de resina (especialmente el fondo de los agujeros grabados) tras el revelado y para mejorar la nitidez de los agujeros de la resina.

Etapa T7: grabado del aluminio -Al

El grabado del aluminio se realiza en una solución química compuesta de ácidos que permiten atacar el aluminio ("Al etch"). La solución se mantiene a una temperatura de 30 °C. El control del grabado se realiza visualmente hasta la eliminación completa de la capa de aluminio en las zonas delimitadas por la resina. La oblea se aclara después en

agua desionizada.

Etapas T8: supresión de la capa de resina

- 5 Tras el grabado de la capa de aluminio, la oblea se sumerge en acetona para suprimir la capa de resina, y después la oblea se pasa al recipiente de lavado. El recipiente de lavado es un tambor con un limpiador acuoso en rotación a 300 rev.min⁻¹, después a 1 000 rev.min⁻¹ y ligeramente caliente para secar la oblea.

Etapas T9 y T10: grabado de la cara posterior (inferior) y cara anterior (superior)

- 10 Durante el grabado DRIE para creación de los orificios de acceso, el grabado se debe realizar en la totalidad del espesor del sustrato -Si-, estando una parte grabada en la cara anterior con los surcos, y la otra parte por la cara posterior. Se prefiere un sobregrabado en la cara anterior (estando fijada la profundidad de grabado en la cara anterior por la profundidad de los surcos) para obtener una pared vertical en la totalidad del sustrato. Efectivamente, sin este sobregrabado, la intersección entre los grabados de cada lado del sustrato iría acompañada de una reducción en el diámetro del orificio.
- 15

- Par el chip de microcolumna, la profundidad de grabado de los surcos se fija a 200 µm. Como el espesor del sustrato es de 500 µm, la profundidad del grabado por la cara anterior queda fijada a 360 µm (por tanto 60 µm de sobregrabado).
- 20

- Para el chip del preconcentrador, la profundidad de grabado de los surcos se fija a 400 µm. Como el espesor del sustrato es de 500 µm, la profundidad del grabado por la cara anterior queda fijada a 160 µm (por tanto 60 µm de sobregrabado).
- 25

- Se inyectan dos tipos de gas, de forma alternante, para realizar un grabado DRIE, siendo el primero SF6 para el grabado del silicio, inyectado en el recinto a 300 ml.min⁻¹ durante 6 s, y el segundo C4FB para el depósito de la película de inhibidor, inyectado en el recinto a 150 ml.min⁻¹ durante 2 segundos. La presión en el recinto está comprendida entre 3 y 4 Pa. Se utilizan ciclos de grabado de 45 min (especialmente para evitar un calentamiento demasiado importante de la oblea). Una medida de la profundidad de la grabación después de un tiempo dado permite definir el tiempo de grabado necesario para obtener la profundidad deseada. En las condiciones utilizadas, la velocidad de grabado se aproxima por lo general a 5 µm.min⁻¹.
- 30

- Una vez ha finalizado el grabado DRIE en la cara posterior, se realiza el grabado DRIE en la cara anterior en las mismas condiciones. Las profundidades de grabación quedan fijadas respectivamente para el chip de la microcolumna y el chip del preconcentrador a 200 µm y 400 µm.
- 35

Etapas T11: Eliminación de la capa de aluminio

- 40 Después de las etapas del grabado DRIE, la oblea se sumerge en un baño de ácido que permite eliminar las capas de aluminio. La solución de ácido se mantiene a una temperatura de 60 °C, que permite acelerar de esta forma el proceso de grabado de los restos de aluminio. A continuación la oblea se limpia en un baño de agua oxigenada (H2O2 al 30 %) / ácido sulfúrico (H2SO4) durante 15 min después con plasma O2 caliente (225 °C) para eliminar el resto de residuos.
- 45

Etapas T12, T13, T14 y T15: Realización de las resistencias de calentamiento RC1 o RC2

- Las etapas siguientes permiten después la realización de las resistencias de calentamiento en titanio/platino. El procedimiento utilizado para el depósito de las resistencias es un procedimiento "lift-off", es decir, una técnica aditiva (en oposición a las técnicas de grabado) que utiliza una capa de sacrificio.
- 50

- Las etapas T12 y T13 constituyen una etapa de fotolitografía -L- clásica con el uso de una resina negativa "res-" (la resina no expuesta queda disuelta) como capa de sacrificio. La resina se extiende entonces con un torno para conseguir un espesor de 7 µm. Después se realiza un recocido a 110 °C durante 90 segundos. Se realiza un alineamiento al microscopio de la máscara M que incluye los motivos de las resistencias tras memorización de los motivos de alineamiento grabados en la oblea. La resina se ilumina a continuación durante 90 s antes de un nuevo recocido de 90 s a 110 °C. La oblea se sumerge después en el baño de revelado (AZ351 B 1 agua) y después se pasa al recipiente de lavado.
- 55

- La etapa T14 consiste en realizar depósitos sucesivos de ambas capas de los metales usados para realizar las resistencias, bien 500 Å (50 nm) de titanio -Ti1- para la capa de agarrado y 1 000 Å (100 nm) de platino -Pt1-. Antes de depositar las capas de metales, se realiza un decapado del sustrato con plasma de argón para limpiar correctamente los agujeros realizados y evitar los restos de resina en el fondo. Los depósitos de las capas de titanio -Ti- y platino -Pt se realizan a baja presión (1.10⁻² mbar, 1 Pa) respectivamente durante 1 min 15 s y 1 min 35 s en toda la superficie de la oblea que alcanza el sustrato en las zonas grabadas y depositándose en la resina en las zonas no grabadas.
- 60
- 65

5 La etapa T15 consiste después en suprimir la capa de sacrificio. Para ello, la oblea se sumerge en un baño de acetona bajo ultrasonidos. Durante la supresión de la capa de sacrificio, se arrancan las capas de metal en contacto con la resina. Tras la supresión de la capa de sacrificio, las capas de los metales (Ti2 et Pt2) permanecen solamente en las zonas de contacto con el sustrato. La oblea experimenta después varios limpiados para eliminar los diferentes restos (baño para los restos de polímeros como las resinas, baño de agua oxigenada/ácido sulfúrico y baño de HF al 1 %).

Etapa T16: soldadura anódica

10 Le micromaquinado directo del silicio permite obtener estructuras abiertas al exterior (surcos -surco-). La soldadura anódica entre obleas es una técnica que permite soldar entre sí sustratos de silicio o de materiales diferentes (como el vidrio) para obtener cavidades cerradas. La solución escogida para la realización de las cavidades cerradas es una soldadura anódica entre la oblea de silicio (que contiene los surcos) y una oblea de vidrio -v-.

15 La soldadura anódica se realiza a una temperatura elevada de 420 °C en vacío (10^{-4} a 10^{-5} mbar) y con un campo eléctrico de 500 V durante 10 min.

7.1.D Conexiones de microfluído

20 Para permitir el llenado de las microestructuras y también la circulación de las muestras de aire, deben estar provistas de los conectores de microfluído (NanoPorts) anteriormente citados.

25 El procedimiento de instalación de los conectores implica preferentemente en un primer momento una limpieza con etanol de la superficie de la oblea para garantizar una buena adhesión de la cola. Una vez limpia la superficie, el anillo de cola se coloca alrededor del orificio de acceso a la microestructura. A continuación se instala la junta de estanqueidad sobre el cuerpo del conector en una "arandela" de posicionamiento. El cuerpo del conector se deposita después sobre el anillo de cola, y se debe colocar cuidadosamente para permitir el alineamiento de los orificios de la oblea y del conector. Se realiza visualmente una verificación del alineamiento.

30 Una vez colocado el conector, la oblea y el cuerpo del conector se mantienen en su sitio mediante una pinza, lo que permite la compresión de la junta y garantizar la estanqueidad de la conexión. Previamente se pone en contacto una placa de vidrio contra la otra cara de la oblea (lado del vidrio) para evitar un contacto directo entre la microestructura y la pinza. El conjunto se pone después al horno a 180 °C durante 2 horas.

35 7.2 PROCEDIMIENTO DE FUNCIONALIZACIÓN DE LOS MÓDULOS

7.2.A Microestructura de separación

40 Una vez se han realizado las microcolumnas y se han instalado las conexiones de microfluído, estas se funcionalizan mediante el mero rellenado con una fase estacionaria que permite la elución y la separación de los compuestos gaseosos.

45 Durante el análisis de los COV para el desarrollo de los índices de contaminación, la separación de los diferentes compuestos se ha realizado mediante cromatografía en fase gaseosa mediante una columna capilar que contiene PDMS (preferentemente 5 % de fenilo - 95 % de dimetilpolisiloxano) como fase estacionaria. En la realización de las microcolumnas se ha mantenido la selección de una composición de columna similar de PDMS (Polidimetilsiloxano).

50 El PDMS utilizado (Sylgard® 184, comercializado por la empresa Dow corning) se comercializa en forma de dos líquidos, la base y el agente de reticulación. Por lo general se mezclan ambos componentes con una relación másica de 10:1 (base:agente de reticulación). Las reacciones de reticulación comienzan con la mezcla, induciendo de esta forma un aumento progresivo de la viscosidad, seguido de la formación de un gel. Durante el mezclado se introducen burbujas de aire, que deben extraerse antes de proceder al rellenado para permitir un depósito uniforme en la totalidad de la longitud de la columna. Para extraer las burbujas, la mezcla se introduce en una cámara a vacío. El tiempo de evacuación varía en función de la cantidad de aire introducida.

55 Para introducirse en el micromódulo y permitir la realización del canal con el principio activo, es decir, la fase estacionaria, la mezcla se diluye después con un disolvente. Para conseguir la mejor eficacia de la separación posible con una columna cromatográfica, se debe depositar una capa homogénea de fase estacionaria. En ese momento, el depósito de la capa estacionaria se puede realizar según dos métodos, el llenado dinámico ("dynamic coating") o estático ("static coating"):

60 - El procedimiento de llenado dinámico consiste en llenar de solución una parte de la columna, que después se impulsa a través de la columna, a una velocidad de aproximadamente de 1 a 2 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, por presión de un gas inerte. Una capa fina de la solución queda depositada, de esta forma, sobre las paredes de la columna. Tras el llenado, el flujo de gas se mantiene durante la evaporación del disolvente, dejando de esta forma una capa de fase estacionaria sobre las paredes de la columna. La columna se calienta por encima del punto de ebullición del

disolvente para eliminar las trazas residuales del disolvente. El espesor de la película está definido por la proporción de disolvente utilizado para la dilución de la fase. Este método sencillo tiene sin embargo problemas que producen un depósito no uniforme de la fase estacionaria (Xu y Vermeulen, 1988).

- 5 - El procedimiento de llenado estático consiste en llenar totalmente la columna con la solución de la fase estacionaria diluida en el disolvente. Tras el llenado de la columna con la solución, un extremo de la columna se tapa, y el otro extremo se conecta a una bomba de vacío. A continuación, la columna se coloca en un horno o en un baño María para controlar la temperatura de la columna. La evaporación del disolvente se realiza por aplicación de un vacío, dejando una capa de fase estacionaria sobre las paredes de la columna. Con este procedimiento, la relación entre el disolvente y la fase estacionaria se conoce de forma precisa y, por tanto, al conocer la densidad de la fase estacionaria, se puede determinar con precisión el espesor del depósito (Xu y Vermeulen, 1988).

15 Se ha elegido un llenado estático para la funcionalización de las microcolumnas. Los procesos de funcionalización de las columnas implican, por tanto, 3 etapas:

Etapa 1: Preparación de la solución

20 Junto con el procedimiento de llenado estático, el espesor de la capa de fase estacionaria depende de la concentración de la solución y se puede determinar mediante la ecuación siguiente para el caso de una columna capilar de sección circular:

$$\frac{1}{4} \pi d_c^2 c = \pi d_c d_f$$

25 Donde d_c es el diámetro interno de la columna, c la concentración de la solución, y d_f el espesor de la capa depositada, en la que:

$$c = 4 \frac{d_f}{d_c}$$

30 El disolvente seleccionado para el llenado de la microcolumna es el n-pentano. Este disolvente tiene la ventaja de ser muy volátil, ya que su temperatura de ebullición es de 36,06 °C facilitando de esta forma su evaporación. Además, es aprótico, lo que significa que no tiene un átomo de hidrógeno ácido (hidrógeno unido a un heteroátomo como un átomo de oxígeno o de nitrógeno) (funciones Si-O-Si del PDMS). Los disolventes próticos como el agua o el etanol conducen a una gelificación del poldimetilsiloxano.

35 La microcolumna utilizada en los ensayos tiene sección rectangular. Sabiendo que el espesor deseado del PDMS es de 200 nm y que la microcolumna tiene 200 μm de profundidad y 150 μm de anchura, se estimó que la relación $V_{PDMS}/V_{pentano}$ era 0,47 %.

40 Para comparar la concentración de la solución de PDMS utilizada en la microcolumna con respecto a la utilizada normalmente en las columnas capilares, se ha realizado un cálculo aproximando el valor del diámetro interno al de la profundidad de la microcolumna en la siguiente ecuación. Para una profundidad de 200 μm, se estimó que la relación $V_{PDMS}/V_{pentano}$ era 0,4 %. Este valor es coherente, por tanto, con el calculado anteriormente.

45 Para preparar la solución, esta relación de volumen se convierte en una relación másica: Sabiendo que $p = m / V$ donde p es la masa volumétrica del compuesto, m la masa y V el volumen, la relación de masa equivale a:

$$\frac{m_{PDMS}}{m_{pentano}} = \frac{\rho_{PDMS}}{\rho_{pentano}} \times \frac{V_{PDMS}}{V_{pentano}} = \frac{1,1}{0,63} \times 0,0047 = 0,0082$$

50 La relación de masa entre el PDMS y el pentano es, por tanto, 0,82 %.

Etapa 2: Llenado de la columna

55 Esta etapa consiste en llenar completamente la microcolumna de solución. Así, la solución de PDMS diluida en el disolvente se inyecta en la microcolumna con un émbolo de jeringa. En cada extremo de la columna se instalan válvulas para controlar fácilmente la abertura y el cierre del canal.

Durante el llenado, las dos válvulas se abren y la solución circula de esta forma a través de la columna. Una vez se ha llenado completamente la columna, se cierran sucesivamente las válvulas de salida, y luego las de entrada. La columna se puede desconectar de esta forma del émbolo de la jeringa. Antes de la conexión de la columna a la

bomba de vacío para la etapa de evaporación del disolvente, el tubo de acceso a la entrada de la microestructura se desconecta con antelación para evacuar la solución contenida en el interior del tubo. Se observa la formación de un menisco a la entrada de la microestructura. Este menisco corresponde a la superficie de la solución (PDMS diluido en el pentano) donde se produce la evaporación del disolvente. Esto permitirá controlar después la evaporación del disolvente.

La concentración de la solución tiene también un papel importante en esta etapa del procedimiento. Efectivamente, en caso de una dilución muy baja del PDMS en el disolvente, la pared del menisco forma una membrana que no permita la evaporación del disolvente.

Etapa 3: Evaporación del disolvente y funcionalización

Una vez se ha vuelto a conectar el tubo de acceso a la entrada de la columna, la bomba de vacío se puede conectar a la columna. Se inserta empalme en T entre la válvula de entrada y la bomba para crear una fuga controlada por una arandela que permite controlar de esta forma el vacío aplicado a la columna. La estanqueidad de las conexiones entre los elementos del montaje es un parámetro importante para garantizar la continuidad durante el proceso de evaporación del disolvente.

Tras la conexión, la microcolumna se pone entonces en contacto con una placa calefactora de temperatura controlada que permite controlar la temperatura aplicada a la microestructura.

Durante la puesta en contacto de la microestructura se observa un ligero desplazamiento del menisco después de la dilatación del disolvente debido al cambio de temperatura. Efectivamente, durante un procedimiento de llenado estático, el calor exterior se transfiere al menisco, lo que permite la evaporación del disolvente. El vapor del disolvente así creado, que tiene una presión superior a la del orificio de la columna, atraviesa la columna hacia la salida.

En este procedimiento, los dos factores principales son la transferencia de masa (vapor de disolvente) hacia la salida y la transferencia de calor en la columna. De la ley de Poiseville se desprende la reacción que gobierna este fenómeno físico:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi d_c^4 (P^2 - P_0^2)}{256 L \eta_v P_{atm}}$$

En la que dV / dt es el caudal de evaporación del disolvente, P y P_0 son respectivamente las presiones en el menisco y a la salida de la columna, η_v la viscosidad del vapor de disolvente, L la distancia entre el menisco y la salida de la columna, P_{atm} la presión atmosférica y d_c el diámetro interno de la columna.

Esta ecuación permite resaltar que el caudal de evaporación del disolvente a través de la columna 2 es proporcional al término $P_2 - P_0^2$ e inversamente proporcional a L . De la ecuación anterior se deduce la ecuación que controla la velocidad de llenado:

$$\frac{dL}{dt} = \frac{273,16 d_c^2 (P^2 - P_0^2) M}{64 \cdot 22400 T_c L \eta_v d_1 P_{atm}}$$

En la que dL/dt es la velocidad de llenado, M la masa molecular de disolvente, T_c la temperatura de llenado y d_1 la densidad del disolvente.

En un procedimiento de llenado estático convencional, P suele ser débil y en consecuencia, la velocidad de llenado dL/dt es también débil, especialmente si la columna a llenar es larga o su diámetro interno es pequeño. Cuando se utiliza una temperatura de llenado elevada, el término $P_2 - P_0^2$ puede ser grande, aunque P_0 también lo sea. Sin embargo, el uso de una temperatura elevada conlleva una diferencia entre la tensión de vapor P_1 , presión de equilibrio entre la fase líquida y la fase vapor de la solución, y P la presión en el menisco que será más alta. Es posible que este fenómeno aumente la formación de burbujas que conduce a una funcionalización de la columna no homogénea.

Para aumentar la velocidad de llenado, se conecta una bomba de vacío a la salida de la columna. Esto permite disminuir el valor de P_0 favoreciendo de esta forma la transferencia de materia.

Las condiciones iniciales del procedimiento de evaporación son, por tanto, las siguientes: la bomba de vacío (apagada) se conecta a la válvula de entrada (cerrada) con la inserción de la arandela de control. La válvula de salida también está cerrada. En un primer momento, la bomba se enciende con la arandela de control abierta para crear una fuga. La válvula de entrada se abre a continuación y la arandela de control se cierra progresivamente para crear un vacío progresivo en la columna. Se realiza una medición del vacío corriente arriba de la válvula de entrada.

En el caso actual, la evaporación del disolvente comienza con un vacío de aproximadamente 0,2 bares (20 kPa) y la temperatura de la columna se mantiene a 33 °C. La evolución del menisco, formado mediante la evaporación del disolvente, permite seguir la evolución del depósito. El menisco se desplaza por tanto por la columna desde la entrada hacia la salida.

5 El procedimiento de evaporación dura aproximadamente 15 min es decir, una velocidad de aproximadamente 0,5 cm.s⁻¹. Una vez el menisco llega a la salida de la columna, se mantiene el vacío durante algunos minutos para permitir la evaporación del disolvente contenido en el tubo de salida. El vacío se rompe después progresivamente mediante la arandela de control.

10 La última etapa para funcionalizar la microcolumna consiste en introducir la columna en un horno a 80 °C durante 2 horas para reticular la capa de PDMS depositada en las paredes.

15 La regulación de los parámetros ambientales que son la temperatura y el vacío aplicado a la microcolumna en los procesos de evaporación del disolvente son complicados de obtener. Efectivamente, una temperatura demasiado baja (inferior a 31 °C) no permite la evaporación del disolvente, mientras que una temperatura demasiado elevada (mayor de 35 °C, es decir aproximadamente la temperatura de ebullición del disolvente) conlleva una discontinuidad de la progresión del proceso de evaporación a través de la columna. Por tanto, se ha mantenido la selección de una temperatura de 33 °C, sin embargo, el proceso de evaporación sigue siendo sensible a la temperatura.

20 La utilización de un vacío controlado permite paliar el problema. Efectivamente, si encontrar la temperatura adecuada es algo complicado, una vez se ha estabilizado la temperatura de la microestructura, la gestión del vacío aplicado a la columna permite controlar la velocidad de evaporación del disolvente. Un aumento progresivo del vacío permite, por tanto, por una parte iniciar el proceso de evaporación (0,2 bares (20 kPa) en esta realización) y por otra parte controlar la velocidad (cuanto mayor es el vacío, más aumenta la velocidad de evaporación).

7.3.B Microestructura de concentración.

30 El desarrollo de los índices de contaminación fúngica ha permitido identificar el Tenax TA -Tx- como un adsorbente adecuado para atrapar las moléculas seleccionadas para la detección fúngica. Este material está disponible en forma de gránulos, cuyo tamaño se ha seleccionado mediante un tamiz para obtener diámetros comprendidos entre 50 y 100 µm.

35 Como el material está en forma de gránulos, estos se diluyen en un disolvente para poderse introducir en la microestructura mediante un émbolo de jeringa. El procedimiento de llenado de la microestructura de concentración es menos complejo que para la funcionalización de la microcolumna. Sin embargo, se prefiere una fase de optimización de la funcionalización de la microestructura por inserción de los gránulos de Tenax en el interior del dispositivo. Los parámetros de dilución y del caudal de inserción se deben definir especialmente para evitar riesgos de colmatación del canal de acceso a la estructura o de destrucción de la microestructura.

40 El disolvente retenido durante la funcionalización de la microestructura de concentración es etanol. Para el parámetro de dilución, se estima que la relación entre el volumen de Tenax y el volumen de etanol ($V_{\text{Tenax}}/V_{\text{Etanol}}$) está comprendida entre 1 y 2 %.

45 El proceso de llenado de la microestructura de concentración consiste por tanto en inyectar mediante el émbolo de jeringa los gránulos de Tenax diluidos en etanol. Un imán insertado en la jeringa acoplado al microagitador permite mantener en suspensión los gránulos en el disolvente. Esto permite paliar el problema de sedimentación de los gránulos de Tenax en el fondo de la jeringa. Los gránulos transportados por el disolvente se inyectan por tanto unos después de otros en la estructura. La microestructura, en posición vertical, permite que los granos se escurran por la estructura hacia la salida. La presencia de la rejilla constituye unos micropilares a la salida de la estructura que permite filtrar los gránulos.

50 La utilización de un émbolo de jeringa permite controlar el caudal de llenado y por tanto de regular la inyección de los gránulos en la estructura mediante el canal de acceso. Un caudal de llenado demasiado grande puede, sin embargo, llevar a la destrucción parcial de los muros que conforman los canales o incluso a la formación de una fisura en la cara posterior de la estructura.

55 Se ha mantenido la selección de un caudal de 250 µl.min⁻¹ para el llenado de la microestructura. Esto permite evitar, por una parte la colmatación del canal de acceso mediante los gránulos inyectados en la estructura, por otra parte, no someter a la microestructura a esfuerzos demasiado grandes, especialmente al finalizar el llenado de la estructura.

60 Una vez se ha llenado completamente la microestructura, esta se introduce en un horno a 100 °C durante 2 horas para eliminar las trazas residuales de disolvente, después se condiciona durante dos horas a 140 °C con un paso de aire filtrado a través de la estructura.

65

7.4 PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DEL MÓDULO DE DETECCIÓN

El sistema de adquisición de datos utilizado durante los ensayos de los captadores poliméricos conductores no permite su integración para la realización de una microcadena de análisis de los COV de origen fúngico. Desde este punto de vista, se ha realizado un módulo de detección basado en la matriz de polímeros que constituye el núcleo del sistema de adquisición. De este modo, el módulo de detección se compone de 4 pares de electrodos interdigitados para los depósitos de las capas de polímero, y de una cámara de acero inoxidable que permite el confinamiento de las capas de polímeros y el paso del aire.

7.4.A Electrodo interdigitados

La tarjeta utilizada anteriormente en el sistema de adquisición no permite realizar los depósitos de forma sencilla y precisa.

Por una parte, una configuración el método de depósito de los diferentes polímeros obligan a depositar el mismo polímero en todos los electrodos. Efectivamente, los depósitos sucesivos de otros polímeros o electrolitos así como el dopaje químico (vapor de yodo) alteran los depósitos anteriores y no permiten, por tanto, incluir el mecanismo de interacción solamente entre el COV y el polímero. Por otra parte, la configuración de los electrodos utilizados no permite un control de la zona de depósito del polímero entre los dos electrodos.

De este modo, se han desarrollado "chips" independientes formados por un solo par de electrodos interdigitados para paliar estos inconvenientes. Como para la tarjeta anterior, los electrodos se fabrican de oro con una capa de agarre de cromo. El procedimiento de realización se presenta en la Figura 6.

Etapas D1: Limpieza de la oblea

La limpieza es idéntica a la utilizada para la realización de los módulos anteriores.

Etapas D2: Depósito de las capas de cromo y de oro

Para la realización de los electrodos, el procedimiento consiste en depositar sucesivamente de forma homogénea la capa de agarre de cromo con un espesor de 500 Å (duración del depósito 1 min 15 s), después la capa de oro con un espesor de 10 000 Å (duración del depósito 10 min). Los depósitos se realizan mediante pulverización catódica a temperatura ambiente (24 °C) en un plasma de argón.

Las etapas siguientes consisten en definir las zonas de grabación para la realización de los motivos. Estas etapas implican por tanto una fase de fotolitografía UV clásica seguida de grabado por vía húmeda de las capas de cromo y de oro.

Etapas D3 y D4: definición de las zonas de grabado

Una vez depositadas las capas, el procedimiento consiste en realizar una etapa de fotolitografía clásica que permita realizar zonas interdigitadas.

La etapa D3 consiste por tanto en depositar una capa de resina fotosensible (resina positiva PFR 7 790) mediante un torno. El espesor deseado es de 1,2 µm (velocidad de rotación de 4.500 rev.min⁻¹, aceleración de 2 000 rev.min⁻² durante 30 s). El recocido de la resina se realiza en la placa calefactora ("hot plate") a 110 °C durante 3 min. La etapa de fotolitografía se realiza después con un tiempo de iluminación de la resina fijado a 10 s y una potencia de lámpara de 345 W. Se muestra en la Figura 7 una imagen de la máscara utilizada durante la iluminación. En esta Figura se han representado, de izquierda a derecha, un conjunto de chips, después un chip, y finalmente un electrodo interdigitado.

Las características geométricas seleccionadas para la realización de los chips que incluyen un par de electrodos interdigitados se recogen en la tabla 10.

Tabla 10: Características geométricas (en µm) de los electrodos

Picado		Contacto			Electrodos interdigitados			
longitud	anchura	longitud	anchura	paso	longitud	anchura	paso	número
26000	5080	12000	1580	2540	2500	60	240	13

La etapa D4 consiste a continuación en revelar la resina, formando de este modo los motivos grabados posteriormente. Así, la oblea se sumerge en el baño de revelador (PRD 238) durante 1 min 10 s. La oblea revelada se lava a continuación con agua desionizada durante 3 min y se seca antes del segundo recocido después del revelado, lo que permite endurecer completamente la resina. Esta etapa de recocido se realiza en una estufa a 100 °C durante 15 min. La oblea se limpia después con un plasma O₂ para eliminar los restos de resina (especialmente el fondo de los agujeros grabados) tras el revelado y para mejorar la nitidez de los agujeros de la

resina.

Etapa D5: Depósito de las capas de cromo y de oro

- 5 Los grabados de oro y después de cromo se realizan en soluciones químicas compuestas por ácidos. Las soluciones se mantienen a una temperatura de 30 °C.

10 El primer baño se realiza en una solución que permite el grabado de la capa de oro. El control del grabado se realiza visualmente hasta la eliminación completa de la capa de oro en las zonas delimitadas por la resina. La oblea se aclara después en agua desionizada.

15 El segundo baño se realiza en una solución que permite el grabado de la capa de cromo. El control del grabado se realiza visualmente hasta la eliminación completa de la capa de cromo en las zonas delimitadas por la resina. La oblea se aclara después en agua desionizada.

A continuación se realiza un tercer baño muy rápido para la grabación de oro y de cromo en la interfase entre ambas capas. La oblea se aclara después en agua desionizada.

20 Etapa D6: supresión de la capa de resina

Tras el grabado de las capas, la oblea se sumerge en acetona para suprimir la capa de resina remanente, y después la oblea se pasa al recipiente de lavado.

25 Una vez ha finalizado el procedimiento de fabricación de las tarjetas, se deposita de nuevo una capa de resina de 3 µm de grosor sobre la totalidad de la superficie de la oblea para evitar depósitos de partículas sobre los electrodos durante el recorte de las diferentes tarjetas presentes en la oblea. A continuación, la resina se somete a recocido a 110 °C 1 min 30 s en la placa calefactora. Antes de utilizar las tarjetas para funcionalizarlas con un polímero conductor, un baño en acetona permite eliminar la capa de protección de resina.

30 7.4.B Cámara de confinamiento

35 Como en el caso del sistema de prueba, la utilización de los captadores poliméricos implica preferentemente el desarrollo de una cámara que permite el confinamiento de las capas sensibles para exponerlas únicamente a las muestras de aire que circula por el sistema. La selección del acero inoxidable como material para la realización de esta cámara y el uso de una junta de teflón (PTFE) permite limitar la generación de un ruido de fondo, ya que el acero inoxidable y el teflón son materiales no emisores en las condiciones experimentales de esta realización.

40 La cámara de confinamiento se divide, por ejemplo, en dos partes. Una parte zócalo en la que se labran cuatro surcos que permiten la inserción de los electrodos. Una zona de apoyo permite colocar la zona de depósito del polímero presente sobre el electrodo enfrente de los "volúmenes" de confinamiento presentes en la parte de la tapa.

45 La parte de la tapa está constituida, por tanto, por cuatro volúmenes de confinamiento enlazados entre sí mediante un canal. Estos volúmenes de confinamiento permiten por tanto englobar únicamente la zona de depósito de los polímeros y limitar de esta forma la dilución de las muestras en volúmenes demasiado grandes. Para garantizar la estanqueidad entre el electrodo y los volúmenes de confinamiento, se inserta una junta de teflón en una muesca entre ambos elementos. La junta tiene, por tanto, cuatro aberturas que permiten exponer las muestras de aire presentes en los volúmenes de confinamiento a las capas sensibles de los electrodos.

50 Finalmente, la circulación de las muestras de aire está garantizada a la entrada y a la salida de la cámara en la parte de la tapa mediante el NanoPort.

55 Las dimensiones y la separación entre cada captador se han definido para poder utilizar un conector instalable en tarjeta con un paso de 2,54 mm. Este conector permite por tanto realizar el enlace entre los captadores y una tarjeta de tratamiento de la información.

7.4.C Tratamiento de la información

60 Los captadores funcionalizados con un polímero conductor se colocan en la cámara de confinamiento para poderla utilizar como módulo de detección del sistema de análisis. El principio de funcionamiento de estos captadores se basa en la variación de la conductividad del polímero inducida por la adsorción de compuestos gaseosos en su superficie. Esta adsorción depende de la afinidad del compuesto por el sitio activo presente en el polímero.

65 Para convertir esta variación de conductividad en una señal que se pueda medir, el captador se coloca en un circuito que permite medir una variación de la resistencia eléctrica denominado "Puente de Wheatstone" -P Wh-. El principio de este circuito consiste en equilibrar las dos ramas del puente colocando el captador en una de estas dos ramas. Las variaciones en la resistividad del captador generan un desequilibrio y la aparición de una tensión entre ambas

ramas del puente (véase el esquema de las Figuras 10A y 10B).

En este circuito, dR representa la variación de resistividad del captador durante la adsorción de compuestos gaseosos en su superficie. El valor de la tensión de salida V_{S1} viene definido por los elementos del circuito y vale:

$$V_{S1} = \frac{VCC}{2} \frac{dR}{R}$$

En la que VCC es la tensión aplicada al circuito Puente de Wheatstone -P Wh-.

10 Cuando todas las resistencias son iguales ($dR = 0$), el valor de V_{S1} es igual a 0. Cuando la resistividad del captador varía ($dR \neq 0$), entonces V_{S1} es la imagen de esta variación y se puede amplificar mediante un circuito amplificador basado en un amplificador operacional -Ampli 1- (véase el esquema de la Figura 10A).

Este circuito permite amplificar la tensión comprendida entre V_a y V_b (es decir V_{S1}) en función del valor de las resistencias que componen el circuito:

$$V_s = (V_a - V_b)G$$

y

$$G = 4 + \frac{60000}{R_1}$$

20 donde $R_3 = 30 \text{ k}\Omega$ y $R_4 = 10 \text{ k}\Omega$

La tensión de salida del circuito representa las variaciones en la resistividad del captador es, entonces:

$$V_s = V_{S1} G = \frac{dR VCC}{R} \left(4 + \frac{60000}{R_1} \right)$$

25 Desde este punto de vista, se ha desarrollado una tarjeta que permite tratar las informaciones transmitidas por los captadores. Consiste en asociar a cada captador un puente de Wheatstone para convertir la variación de resistividad en tensión, y un circuito amplificador -Ampli 1- (Figura 10A). De forma alternativa, el circuito de amplificación -Ampli 2- de la Figura 10B se puede utilizar sin salirse del marco de la invención.

30 El esquema del circuito desarrollado con Cadence Allegro Design Entry representa uno de los cuatro circuitos utilizados para el tratamiento de cada uno de los captadores. Un terminal agrupa las señales de medida de los diferentes captadores y permite la conexión con un nudo de medición para permitir al usuario recuperar las informaciones transmitidas. Las referencias Cx (Figura 13) designan los terminales de conexión de la tarjeta de tratamiento y de la tarjeta de control.

40 El conjunto de los cuatro circuitos y el terminal conforman por tanto una tarjeta de tratamiento de las señales de los diferentes captadores. Este conjunto se puede integrar a continuación mediante la herramienta Cadence Allegro PCB Design para desarrollar la tarjeta. Esta herramienta permite la colocación y el enrutamiento entre los diferentes componentes de la tarjeta integrando todos los enlaces definidos con Cadence Allegro Design Entry. Así, se puede realizar la tarjeta de tratamiento de las señales transmitidas por los captadores.

7.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS MÓDULOS

45 7.5.A Módulo de concentración de la muestra

En referencia a la Figura 8, el atrapamiento y la desorción de 8 trazadores se validaron mediante cromatografía clásica. Los 8 trazadores se descubrieron en ambientes contaminados por mohos, pero las concentraciones observadas son más bajas.

50 Los picos de la Figura 8 son los siguientes:

c: metilfurano	d: 2-metil-1-butanol;	d': 3-metil-1-butanol;
e: 4-heptanona;	f: 3-heptanol;	g: metoxibenceno;
h: α -pineno;	i: 1-octen-3-ol.	

7.5.B Módulo de separación de la muestra

El módulo de separación también se ha validado mediante cromatografía y espectrometría de masas. El cromatograma obtenido a partir de los 8 trazadores se muestra en la Figura 9.

5 La microcolumna ensayada permite la separación de 7 trazadores de los 8 ensayados: 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol, que son isómeros, se eluyen conjuntamente.

10 El conjunto de estos ensayos también ha permitido encontrar las condiciones más adaptadas para la separación de los trazadores (isoterma a 40 °C y caudal de helio a 0,5 ml.min⁻¹) y reducir en gran medida el tiempo de análisis (10 min aproximadamente para la microcolumnas comparado con 1 h 30 s para una columna convencional). De este modo, estos ensayos han permitido validar el módulo de separación mostrando la obtención de tiempos de retención diferentes para 11 de los trazadores, lo que permite el cálculo del índice de contaminación fúngica.

15 7.5.C Módulo de detección

Se han realizado ensayos sobre polipirrol/octanosulfonato de sodio (0,3 M) y PEDOT-PSS. Las dos capas sensibles se expusieron a diferentes compuestos orgánicos volátiles (COV). Estos ensayos se realizaron con los circuitos de las Figuras 10A y 10B.

20 En el ensayo presentado en la Figura 10C, los 2 polímeros conductores electrónicos se expusieron a 8 COV obtenidos a partir del índice de contaminación fúngica en agua destilada (l) y etanol (m). De manera general, las referencias CH1 a CH4 designan diferentes ensayos.

25 Se observaron diferencias fraccionadas de resistencia negativas para seis de los COV (alfa-pineno, anisol (j), 1-octen-3-ol, 2-metilfurano, 3-heptanol (k)), etanol y agua. Sin embargo, se observaron diferencias fraccionadas de resistencia positivas para dos de los COV, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol. estas respuestas son análogas para estos 2 COV isómeros, que son alcoholes primarios. Cuando los polímeros se exponen a etanol, que es un alcohol primario, se observó una diferencia fraccionada de resistencia negativas. Esto se explica porque contienen agua.

30 Para comprobar la selectividad para alcoholes primarios, las dos capas sensibles se expusieron a continuación a una serie de alcoholes primarios, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-butanol (n), 1-pentanol (o) y 1-hexanol (p), a dos alcanos, heptano (q) y octano (s), así como a 3-heptanol (r), 1-octen-3-ol y 4-heptanona. Se observaron diferencias fraccionadas de resistencia positivas para los alcoholes primarios. Sin embargo, se observaron diferencias fraccionadas de resistencia negativas para el resto de los COV. Los resultados se muestran en la Figura 10D. En esta Figura, las referencias CH1 y CH3 designan ensayos con PEDOT/PSS, y las referencias CH2 et CH4, los ensayos con OSS (0,3 M).

40 El PEDOT-PSS se expuso posteriormente a una serie de alcoholes primarios, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-butanol, 1-pentanol y 1-hexanol, a tres alcanos, pentano, heptano y octano. Los resultados se muestran en la Figura 10E.

Durante la exposición a alcanos, se observaron diferencias fraccionadas de resistencia negativas.

45 Esta capa sensible se expuso a continuación a tres alcoholes primarios con diferentes sobrecargas. Los resultados se muestran en la Figura 10F.

50 De las Figuras 10C a 10F se puede concluir que cuando un alcohol primario queda sobrecargado, su diferencia fraccionada de resistencia disminuye con respecto al alcohol no sobrecargado.

55 Los polímeros conductores permiten superar los límites (modularidad, especificidad para compuestos polares, consumo energético...) óxidos metálicos o materiales compuestos. Sus composiciones químicas son parecidas a los de los COV, lo que induce interacciones físicas entre el polímero y el COV. Además, sus estructuras se pueden modificar, lo que permite crear materiales con selectividades definidas para dirigirse a los COV diana.

EJEMPLO 7: INTEGRACIÓN Y CONTROL DEL SISTEMA

8. INTERFAZ DE CONTROL DEL SISTEMA DE ANÁLISIS

60 8.1 ARQUITECTURA DEL SISTEMA DE ANÁLISIS

8.1.A Principio del sistema de análisis

65 El esquema del principio del sistema se presenta en la Figura 11 y se compone, por tanto, de tres módulos (el módulo de preconcentración, el módulo de separación y el módulo de detección), de una bomba P y de 3 electroválvulas E1, E2, E3.

La bomba P seleccionada es, por ejemplo, una bomba excéntrica de membrana, comercializada por ScharzerPrecision con la referencia SP 725 EC. La bomba funciona con corriente continua entre 0 et 24 V. Las características de la bomba se han seleccionado en función de la pérdida de carga ocasionada por el uso de microcanales, y está comprendida entre 1 y 2 bares (100 a 200 kPa).

5 Durante la fase de concentración, la bomba permite la toma de la muestra mediante una circulación de aire a través del módulo. De este modo, mediante el procedimiento de acumulación de moléculas, tras la concentración, las moléculas incluidas en la muestra de aire a analizar se retienen en la microestructura. Durante la fase de análisis, a la entrada del sistema, un filtro (carbón activo) permite por asociación con la bomba, una circulación de aire limpio a través del sistema, sirviendo por tanto de gas portador.

15 Las electroválvulas permiten seleccionar la dirección del flujo de aire durante las etapas del análisis. Elementos calefactores asociados a un regulador de temperatura también están integrados en el sistema para permitir el calentamiento de las microestructuras de concentración y separación para permitir la liberación de las moléculas atrapadas.

Las electroválvulas utilizadas en el sistema son válvulas electromagnéticas miniaturizadas desarrolladas por Lee Company.

20 En lo que respecta a los elementos calefactores utilizados en los módulos de concentración y de separación, se seleccionan los recalentadores RC de mica fabricados por la empresa MINCO.

De modo ilustrativo, las características de los elementos utilizados en cada una de las dos microestructuras se recogen en la tabla 11.

25

Tabla 11: Características de los recalentadores de mica

Recalentador concentrador			
Dimensiones (mm)	Espesor (mm)	Resistencia (Ohmios)	Superficie eficaz (cm ²)
25,4 x 101,6	0,5	21,2	16,13

Recalentador columna			
Dimensiones (mm)	Espesor (mm)	Resistencia (Ohmios)	Superficie eficaz (cm ²)
50,8 x 50,8	0,5	23,2	18,06

30 El sistema se controla mediante una tarjeta de control -C Com que permite, por una parte gestionar los controles de las electroválvulas, los reguladores de temperatura y de la bomba, por otra parte, recuperar las informaciones transmitidas por los captadores mediante una tarjeta de tratamiento -C Tr-.

8.1.B Descripción de las etapas de análisis

35 El análisis de una muestra se descompone, por tanto, en dos etapas principales idénticas a las de un sistema clásico de cromatografía de gases, es decir, la concentración de la muestra y su posterior análisis mediante separación. La utilización de bombas y de electroválvulas permite dirigir el flujo de aire a través de los módulos por cambio en su estado. Una ilustración preferida del procedimiento presentado en la Figura 12 asocia los estados posibles de los diferentes elementos que componen el sistema en función de la etapa de análisis realizada. Se pueden definir por tanto cuatro situaciones representativas de la etapa del análisis: "inactivo" 10, "concentración" 20, "análisis molécula" 40 y "limpieza captadores" 30.

Un estado "inactivo" 10 del sistema corresponde al estado del sistema al principio y al fin de las etapas de análisis.

45 Un estado "concentración" 20 corresponde a la primera etapa que consiste en tomar una muestra del aire a analizar a través de la microestructura de concentración, lo que permite por tanto la concentración de la muestra.

Los estados "análisis molécula" 40 y "limpieza captadores" 30 corresponden a los dos estados tomados por el sistema en función de la presencia o ausencia de una molécula de interés.

50 El resto de las referencias de la Figura 14 son las siguientes:

- | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| V: Verdadero; | F: Falso; | O: Sí; |
| N: No; | 138: Inicio; | 14: ¿Inic?; |
| 11: ¿Selección etapa?; | 21: ¿t=t _{concen} ?; | 23: ¿Análisis?; |
| 31: ¿t=t _{molécul} ?; | 32: ¿t=t _{análisis} ?; | 41: ¿t=t _{exno} ?; |
| 42: análisis terminado; | 12: parada sistema; | 13A: Fin. |

55

El sistema permite la separación de las moléculas de la muestra con un tiempo de retención propio de las distintas moléculas. A la salida del módulo de separación, si el tiempo de análisis corresponde al tiempo de retención de una de las moléculas de interés, el sistema pasa al estado "análisis molécula" durante varios segundos para dirigir las moléculas hacia el módulo de detección. Fuera del tiempo de paso de una molécula a analizar, el sistema se mantiene en estado "limpieza captadores", lo que permite de este modo una circulación de aire limpio (filtrado con carbón activo) hacia el módulo de detección.

La tabla 12 define los estados de los distintos elementos del sistema en función de la etapa de análisis realizada. El estado de la bomba (P) está representado por un estado "Conectado" y un estado "Desconectado" cuando se encuentran en estado de arranque o parada, respectivamente. Las resistencias de calentamiento, denominadas RC1 para el módulo de concentración y RC2 para el módulo de separación, también están representadas por un estado "Conectado" y un estado "Desconectado" cuando se encuentran alimentadas o no alimentadas, respectivamente. Finalmente, las electroválvulas (numeradas de 1 a 3 en la Figura 10) se representan por un estado "a" o un estado "b" en función de la dirección del flujo de aire seleccionada.

Tabla 12: Estados de los elementos del sistema en función de la etapa de análisis

Estado del sistema	Válvula			Bomba	Resistencias de calentamiento	
	n°1	n°2	n°3		RC1	RC2
Inactivo	b	b	b	Desconectado	Desconectado	Desconectado
Concentración	a	a	b	Conectado	Desconectado	Desconectado
Limpieza captadores	b	b	b	Conectado	Conectado	Conectado
Análisis molécula	b	b	a	Conectado	Conectado	Conectado

8.1.C Descripción de los elementos que constituyen el prototipo

El sistema puede utilizar microelementos tales como las bombas P, las resistencias de calentamiento RC y las electroválvulas E. Cuando se desea obtener un sistema lo más compacto posible, estos elementos se seleccionan con una saturación mínima en función de su comportamiento para responder a las limitaciones impuestas por el sistema. Estos elementos están comercialmente disponibles de diversos especialistas.

Estos elementos se componen de un elemento laminar grabado situado entre dos capas de mica con un espesor de 0,5 mm. Estas películas pueden alcanzar rápidamente temperaturas elevadas (de hasta 600 °C) con una temperatura homogénea sobre la superficie de la película. Las microestructuras a calentar se ponen preferentemente en contacto con el recalentador entre dos capas de aislante (papel cerámico de 3,2 mm de espesor) y que se sujeta mecánicamente entre dos placas de aluminio.

Un sistema de regulación de la temperatura permite controlar la temperatura aplicada a las microestructuras. Estas válvulas de tres vías funcionan usando un solenoide que permite un bloqueo magnético de la válvula hacia uno de los dos puertos de entrada/salida. Las dimensiones de estas electroválvulas están pensadas para obtener un volumen interno bajo (72 µl) para limitar los volúmenes muertos.

8.2 HERRAMIENTAS DE CONTROL DEL SISTEMA

8.2.A Generación de señales de control

Como puede verse en la Figura 13, el funcionamiento del dispositivo está controlado mediante una tarjeta de control C. Com. asociada a una tarjeta de tratamiento por medio de un nudo de medición No.

la tarjeta de control recibe informaciones de los captadores y las transmite por medio de un circuito de tipo puente de Wheatstone Pwh asociado a un circuito amplificador Ampli previsto en el presente documento en la tarjeta de tratamiento.

Una tarjeta demultiplexora Dmx está prevista en la tarjeta de control, asociada a relés de control de las electroválvulas (com EV), resistencias de calentamiento (com RC), y un puente en H de control de la bomba (H). Esta tarjeta Dmx puede generar diferentes señales de control a partir de niveles lógicos aplicados a cada una de las entradas numéricas del nudo de medición. La tarjeta de control comprende preferentemente un convertidor de tensión conv entre el nudo No y la tarjeta Dmx.

Una configuración de ese tipo permite gestionar el estado de los distintos elementos del sistema para poderlos controlar mediante un ordenador.

El nudo de medición permite transmitir las informaciones sobre el estado del sistema enviadas por el usuario. El nudo de medición ofrece en el presente documento 4 entradas analógicas 4A ±10 V y 4 entradas digitales 4N bidireccionales. La tarjeta de control está diseñada, por tanto, para poder generar diferentes estados del sistema

mediante los 4 bits de las entradas digitales 4N (DIO 0 a DIO 3) del nudo de medición configuradas en modo escritura. Las informaciones transmitidas por los captadores del módulo de detección se dirigen al usuario usando las 4 entradas analógicas del nudo de medición.

- 5 El esquema presentado en la Figura 13 representa la parte de generación de las señales de control utilizadas en el diseño de la tarjeta de control.

Las señales de control generan, por tanto, tensiones que permiten validar la aplicación de una tensión de control de los distintos elementos mediante la utilización de enlaces -Com-. Estos componentes funcionan, por tanto, como interruptores controlados por las señales de la tarjeta de demultiplexado.

10 Como las electroválvulas están controladas por la polaridad de la tensión aplicada, se utilizan preferentemente dos conexiones para controlarlas, una conexión para generar una polaridad positiva, la otra para generar una polaridad negativa. Durante la decodificación mediante la tarjeta Dmx, se prefiere, por tanto, el uso de 2 señales de control complementarias para cada una de las electroválvulas (es decir, 8 señales).

15 El puente en H -H com P- se prefiere para el control de las bombas de salida ya que pueden utilizar corrientes mayores que en el caso de las electroválvulas.

20 8.2.C Diseño de la tarjeta

La alimentación y la regulación de la tensión de los elementos componentes de la tarjeta se realiza de forma clásica. Este aspecto se ilustra en la referencia Alim.

- 25 La tarjeta de control desarrollada en el presente documento es una tarjeta de doble cara que agrupa las diferentes partes desarrolladas anteriormente.

A partir de las 4 entradas digitales del nudo de medición (bus de control), la tarjeta Dmx permite, por tanto, generar hasta 16 señales de control (bus de datos) tras el demultiplexado. Esto permite también controlar hasta 4 bombas, 4 electroválvulas y 2 resistencias de calentamiento. Así, se puede programar una tabla de decodificación en la tarjeta Dmx en función de los distintos valores que puede tomar el bus de control.

30 La tabla de decodificación se compone por tanto simplemente del bus de control de 4 bits (DIO 0, DIO 1, DIO2 y DIO 3) y del bus de datos compuesto por ejemplo, de 8 señales para el control de 4 electroválvulas (6 señales usadas para 3 electroválvulas), 6 señales para el control de 4 bombas (2 señales usadas para 1 bomba) y 2 señales para el control de dos resistencias de calentamiento (Figura 11).

8.3 INTERFAZ DEL USUARIO

- 40 La programación de la tarjeta de demultiplexado permite definir el ritmo del análisis mediante un cambio de estado del sistema actuando sobre el valor del bus de control compuesto por las 4 entradas digitales del sistema, y permitir una visualización gráfica del estado de los distintos elementos del sistema, estando controlado el comportamiento físico mediante la tarjeta de control.

45 El organigrama se organiza alrededor de los 4 estados posibles del sistema ("inactivo" 10, "concentración" 20, "análisis molécula" 40 y "limpieza captadores" 30) anteriormente descritos y generados mediante los dos bits de entrada digitales DIO 0 y DIO 1. En las "subrutinas" correspondientes a cada uno de estos estados, se realizan dos acciones: el estado de las entradas numéricas del bus de control se transmite al nudo de medición y los valores correspondientes al estado de los elementos del sistema se vinculan a los objetos gráficos que los representan. El procedimiento y el organigrama se detallan adicionalmente en el apartado 8.3.B siguiente.

50 Como las entradas digitales DIO 2 y DIO 3 no se utilizan para definir un estado del sistema, permiten controlar la regulación de temperatura de la microcolumna y la puesta en estado de reposo de las señales de control de las electroválvulas.

55 Las resistencias de calentamiento se utilizan durante la fase de análisis para liberar las moléculas atrapadas en el módulo de preconcentración y para regular la temperatura del módulo de separación. También, si el calentamiento del módulo de preconcentración no requiere una regulación controlada, debiéndose realizar esto lo más rápidamente posible, la regulación de la temperatura del módulo de separación puede afectar al tiempo de retención de las moléculas. Como la entrada digital DIO 2 no se utiliza para definir una de las fases de análisis del sistema, se utiliza para controlar la velocidad de calentamiento del módulo de separación en modo todo o nada. Los cambios de estado de la entrada DIO2, y por tanto del control de calentamiento del módulo se definen mediante una señal cuadrada cuya relación cíclica permite crear virtualmente una rampa de temperatura controlada.

- 65 El control de una electroválvula se realiza mediante el uso de dos conexiones complementarias para poder generar un estado de control según la conexión activada. Se prefiere un impulso de control para cambiar el estado de cada

una de las electroválvulas en función de la polaridad aplicada a las entradas de control.

Cuando el sistema cambia de estado, una de las conexiones se activa para aplicar una polaridad a la entrada de control de cada una de las electroválvulas.

5 De este modo, la tabla 13 presenta la tabla de control definida para controlar el conjunto de los elementos del sistema en función de las etapas del análisis.

Tabla 13: Tabla de control del sistema

Bus de control				Estado del sistema	Válvula			Bomba	Resistencias de calentamiento	
DIO 0	DIO 1	DIO 2	DIO 3		nº1	nº2	nº3		RC1	RC2
0	0	0	0	Inactivo	-12V	-12V	-12V	Desconectado	Desconectado	Desconectado
1	0	0	0	Concentración	+12V	+12V	-12V	Conectado	Desconectado	Desconectado
0	1	0	0	Limpieza captadores	-12V	-12V	-12V	Conectado	Conectado	X
1	1	0	0	Análisis molécula	-12V	-12V	+12V	Conectado	Conectado	X
X	X	0	X	Control de calentamiento R2	X	X	X	X	X	Desconectado
X	X	1	X		X	X	X	X	X	Conectado
X	X	X	0	Reposo control electroválvula	+/-12V	+/-12V	+/-12V	X	X	X
X	X	X	1		0V	0V	0V	X	X	X

* una X corresponde a un estado cualquiera de la señal

10 8.3.B Diseño de la interfaz de usuario

El estado de los elementos del sistema (válvulas, bombas y resistencias de calentamiento) en función de las diferentes etapas se recoge en la tabla 13. De este modo, los objetos gráficos de visualización de estos elementos se ven afectados por los valores binarios, lo que permite observar su evolución durante las diferentes fases del análisis.

[Los diferentes parámetros de entrada del sistema que aparecen en el organigrama permiten definir el ritmo de las etapas del análisis.

20 Así, los dos primeros parámetros se refieren al tiempo para la toma de muestra (t_{concen}) durante la fase de concentración de la muestra y el tiempo necesario para el análisis de la muestra ($t_{análisis}$). El usuario puede regular estos dos parámetros mediante botones de control en la interfaz del usuario.

25 El parámetro siguiente se refiere a la gestión del sistema durante el análisis de la muestra. En efecto, durante dicha fase, el sistema se puede encontrar en estos dos estados, el estado de "limpieza de los captadores" y el estado de análisis de las moléculas". Durante la fase de inicio, el sistema permite definir el número de moléculas que se tendrán que analizar asociándoles sus tiempos de retención ($t_{molécul}$) y un tiempo de exposición (t_{expo}), es decir, el tiempo en el que el sistema puede enviar las moléculas retenidas hacia el módulo de detección.

30 Estos datos se recogen en una tabla, y la comparación entre el cronómetro asociado al tiempo de análisis de la muestra y los tiempos de retención de las moléculas, permite que el sistema pase al estado "análisis molécula" durante el tiempo de exposición asociado a la molécula.

35 9 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE ANÁLISIS

9.1 Caracterización de los caudales

40 La bomba permite obtener caudales relativamente altos cuando funciona a vacío. Se observa la inducción de un nivel por el uso de los microcanales para una tensión de alimentación superior a 8 V. El caudal de toma de muestra máximo es, por tanto, 7 ml/min. La tensión de alimentación conservada es 12 V que también permite al sistema conservar un caudal de toma de muestra idéntico en caso de pérdidas de carga suplementarias originadas, por ejemplo, por la toma de muestras de partículas.

45 9.2. Caracterización de las rampas de temperatura

También se realizó una caracterización de las rampas de temperatura para cada una de las microestructuras de concentración y de separación. La temperatura máxima ajustada según el punto de consigna de los reguladores es de 140 °C.

50 En lo que respecta a la microestructura de concentración, esta temperatura de consigna debe obtenerse, preferentemente, lo más rápidamente posible para liberar las moléculas retenidas con un retraso de tiempo lo más

corto posible. Se ha realizado por tanto una caracterización de las rampas de temperatura obtenidas para las diferentes tensiones de alimentación, y por tanto de la potencia inyectada a la resistencia de calentamiento.

5 Para obtener la rampa de temperatura más rápida posible en este primer prototipo, la tensión de alimentación seleccionada es 20 V. Como la resistencia de calentamiento utilizada en la microestructura de concentración tiene una resistencia nominal de 21,2 Ω , la corriente consumida por una tensión de 20 V es de aproximadamente 0,94 A, es decir, una potencia consumida de 18,8 W.

10 De este modo, el sistema se ha diseñado para poder controlar la velocidad de calentamiento del módulo de separación creando una rampa de temperatura mediante una alimentación del regulador en modo todo o nada.

Por este motivo, una de las entradas numéricas (DIO 2) permite controlar directamente la conexión de control de la resistencia de calentamiento de la microcolumna (RC2).

15 Los ensayos realizados durante la caracterización de la microcolumna han mostrado que una temperatura de 40 °C es suficiente para separar las moléculas de interés. El valor de la relación cíclica se fija, entonces, en el 10 %.

20 Para permitir la liberación de las moléculas que necesitan una temperatura más elevada y permitir de esta forma la limpieza de la microcolumna, esta debe alcanzar la temperatura de consigna máxima.

Como la resistencia de calentamiento utilizada en la microestructura de separación tiene una resistencia nominal de 23,2 Ω , la corriente consumida por una tensión de 20 V es de aproximadamente 0,86 A, es decir una potencia consumida de 17,2 W cuando está activado el control del calentamiento.

25 Se pueden abordar numerosas combinaciones sin salirse del marco de la invención: el experto en la materia seleccionará una u otra en función de las limitaciones económicas, ergonómicas, dimensionales u otras que deba respetar. Por ejemplo, el experto en la materia podrá configurar un microcontrolador en lugar de la tarjeta de control y/o la tarjeta de tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior, que comprende:

- 5 - un módulo de preconcentración (MC);
 - un módulo de separación (MS) que comprende una microcolumna cromatográfica corriente abajo del módulo de preconcentración (MC); y
 - un módulo de detección (MD) que comprende una matriz de captadores corriente abajo del módulo de separación (MS),
 10 - unos medios de generación de flujo, preferentemente al menos una bomba (P),

comprendiendo el dispositivo al menos una primera electroválvula (E3) corriente arriba del módulo de detección (MD) **caracterizada por que** la primera electroválvula está situada entre el módulo de separación (MS) y el módulo de detección (MD), permitiendo así bien dirigir un flujo que comprende moléculas diana hacia el módulo de detección (MD), o bien dirigir un flujo filtrado por un primer medio de filtración (Tx1) que permite una limpieza del módulo de detección (MD) cuando el flujo no comprende las moléculas diana.

2. Dispositivo de detección de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** está configurado de manera que un mismo flujo se dirige bien hacia el módulo de detección (MD) cuando comprende moléculas diana, o bien se dirige hacia el primer medio de filtración (Tx1) cuando no comprende moléculas diana.

3. Dispositivo de detección de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** comprende además al menos una segunda electroválvula (E2) corriente arriba del módulo de separación que permite dirigir un flujo bien hacia el módulo de separación (MS) cuando el flujo comprende moléculas diana o cuando el flujo está filtrado mediante un medio de filtración (Tx2), bien hacia el exterior cuando el flujo no comprende moléculas diana.

4. Dispositivo de detección de acuerdo con la reivindicación 3 **caracterizado por que** dicha segunda electroválvula está situada entre el módulo de concentración (MC) y el módulo de separación (MS).

5. Dispositivo de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** comprende además al menos una tercera electroválvula (E1) corriente arriba del módulo de concentración (MC) que permite bien dirigir un flujo de toma de muestra hacia el módulo de concentración (MC), bien dirigir un flujo filtrado por un medio de filtración (Tx2) que permite una limpieza del módulo de concentración cuando el flujo con contiene moléculas diana.

6. Dispositivo de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** al menos uno de los medios de filtración comprende un polímero adsorbente, preferentemente basado en 2,6-difenileno.

7. Dispositivo de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** los módulos de concentración (MC) y/o de separación (MS) comprenden un material que puede adsorber dichas moléculas diana asociado a un medio de desorción correspondiente.

8. Dispositivo de detección de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** el material que puede adsorber dichas moléculas diana es un polímero adsorbente preferentemente de bolas de polímero preferentemente basado en óxido de 2,6-difenileno, en el caso del módulo de concentración y en dimetilpolisiloxano (PDMS) en el caso del módulo de separación, y el medio de desorción comprende resistencias de calentamiento instaladas en dichos módulos de concentración y/o de separación.

9. Dispositivo de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** comprende además una interfaz de control que comprende una tarjeta de control (C. Com) que permite controlar, preferentemente de forma automática, al menos una de dichas electroválvulas, un medio de elución, en especial resistencias de calentamiento, y un medio de generación de flujo en especial la bomba.

10. Dispositivo de detección de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** la interfaz de control está conectada al módulo de detección preferentemente mediante una tarjeta de tratamiento (C. Tr), de forma que reciba los datos de esta.

11. Dispositivo de detección de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** la tarjeta de control y el módulo de detección están configurados para medir una diferencia de resistividad entre el flujo que comprende las moléculas diana y el flujo filtrado.

12. Dispositivo de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** el módulo de detección comprende un polímero conductor seleccionado entre el grupo que comprende PEDOT-PSS, bifluoreno dibromado, polipirrol dopado con octanosulfonato, polipirrol dopado con perclorato de litio o cualquier otro derivado de polipirrol, poliofenol o polianilina.

13. Dispositivo de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizado por que** dicha interfaz de control comprende una tarjeta de control configurada para controlar, preferentemente de forma automática, dichas electroválvulas (E1, E2, E3), para realizar al menos uno entre:

- 5 - bien dirigir un flujo que comprende moléculas diana hacia el módulo de detección, o bien dirigir un flujo filtrado por un primer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de detección cuando el flujo no comprende las moléculas diana,
- dirigir un flujo bien hacia el módulo de separación cuando el flujo comprende moléculas diana o cuando el flujo está filtrado mediante un segundo medio de filtración, bien hacia el exterior cuando el flujo no incluye moléculas diana,
- 10 - bien dirigir un flujo de toma de muestra hacia el módulo de concentración, o bien dirigir un flujo filtrado por un tercer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de concentración cuando el flujo no comprende las moléculas diana.

15 14. Dispositivo de detección de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado por que** dicha interfaz de control comprende una tarjeta de control configurada para controlar además, preferentemente de forma automática, los medios de generación de flujo especialmente la al menos una bomba.

20 15. Dispositivo de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 o 14, **caracterizado por que** dicha interfaz de control comprende una tarjeta de control configurada para controlar además, preferentemente de forma automática, los medios de elución especialmente las resistencias de calentamiento de manera de desorba las moléculas diana.

25 16. Procedimiento de detección de una contaminación fúngica en un ambiente interior a partir de un dispositivo de detección que comprende:

- un módulo de preconcentración;
- un módulo de separación que comprende una microcolumna cromatográfica corriente abajo del módulo de preconcentración y
- 30 - un módulo de detección que comprende una matriz de captadores corriente abajo del módulo de separación,
- medios de generación de flujo preferentemente una bomba,

comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 35 - concentración (20), en la que las moléculas diana quedan retenidas en el módulo de preconcentración preferentemente durante un tiempo de concentración,
- limpieza de captadores (30), en la que un flujo filtrado hace atravesar medio de desorción a través de al menos uno entre el módulo de preconcentración, el módulo de separación y el módulo de detección,
- 40 - análisis (40), en el que las moléculas diana pasan al módulo de detección, preferentemente durante un tiempo de análisis.

45 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado por que** comprende al menos una etapa inactiva (12, 13, 10) antes y/o después de dichas etapas de concentración y de análisis, en la que están inactivados al menos los medios de generación de flujo, aplicándose preferentemente las etapas del procedimiento de forma continua de manera que detecten una contaminación fúngica en un ambiente interior.

50 18. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 16 o 17, **caracterizado por que** comprende las etapas para controlar, preferentemente de forma automática, al menos una electroválvula, para realizar al menos una entre las acciones de:

- bien dirigir un flujo que comprende moléculas diana hacia el módulo de detección, o bien dirigir un flujo filtrado por un primer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de detección cuando el flujo no comprende las moléculas diana,
- 55 - dirigir un flujo bien hacia el módulo de separación cuando el flujo comprende moléculas diana o cuando el flujo está filtrado mediante un segundo medio de filtración, bien hacia el exterior cuando el flujo no comprende moléculas diana,
- bien dirigir un flujo de toma de muestra hacia el módulo de concentración, o bien dirigir un flujo filtrado por un tercer medio de filtración que permite una limpieza del módulo de concentración cuando el flujo no comprende las moléculas diana.

60 19. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizado por que** comprende además etapas para controlar, preferentemente de forma automática, el medio de generación de flujo especialmente la bomba, de forma que realice dichas direcciones de flujo.

65 20. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 16 a 19, **caracterizado por que** comprende además etapas para controlar, preferentemente de forma automática, los medios de elución especialmente las resistencias

de calentamiento de manera de desorba las moléculas diana.

21. Producto de programa informático que se puede cargar en la memoria de una unidad de control que comprende partes de un código informático para realizar el procedimiento de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 16 a 20 cuando se realiza mediante una unidad de control.

22. Dispositivo de detección de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 a 15 que comprende un producto de programa informático de acuerdo con la reivindicación 21 en dicha interfaz de control.

10

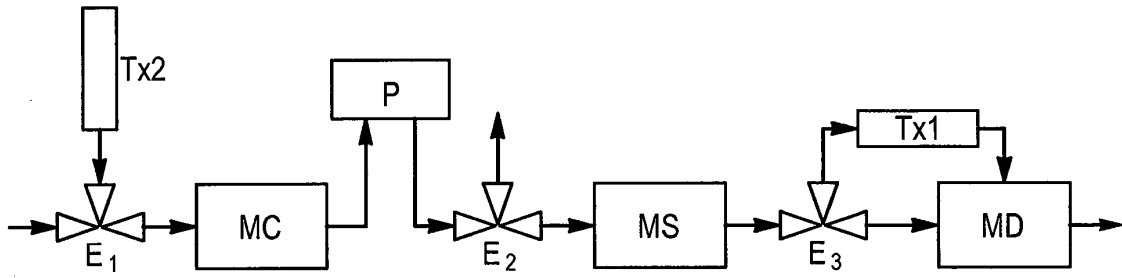


FIG. 1

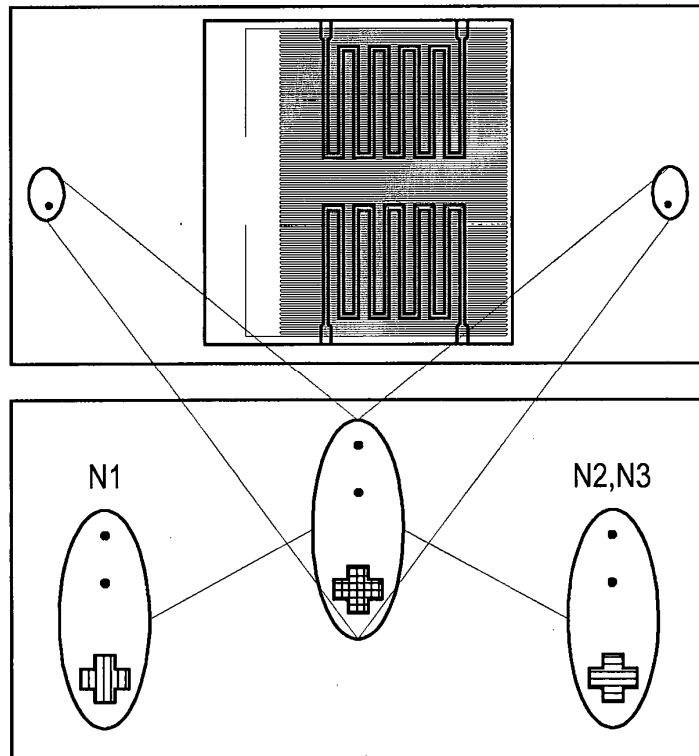


FIG. 2

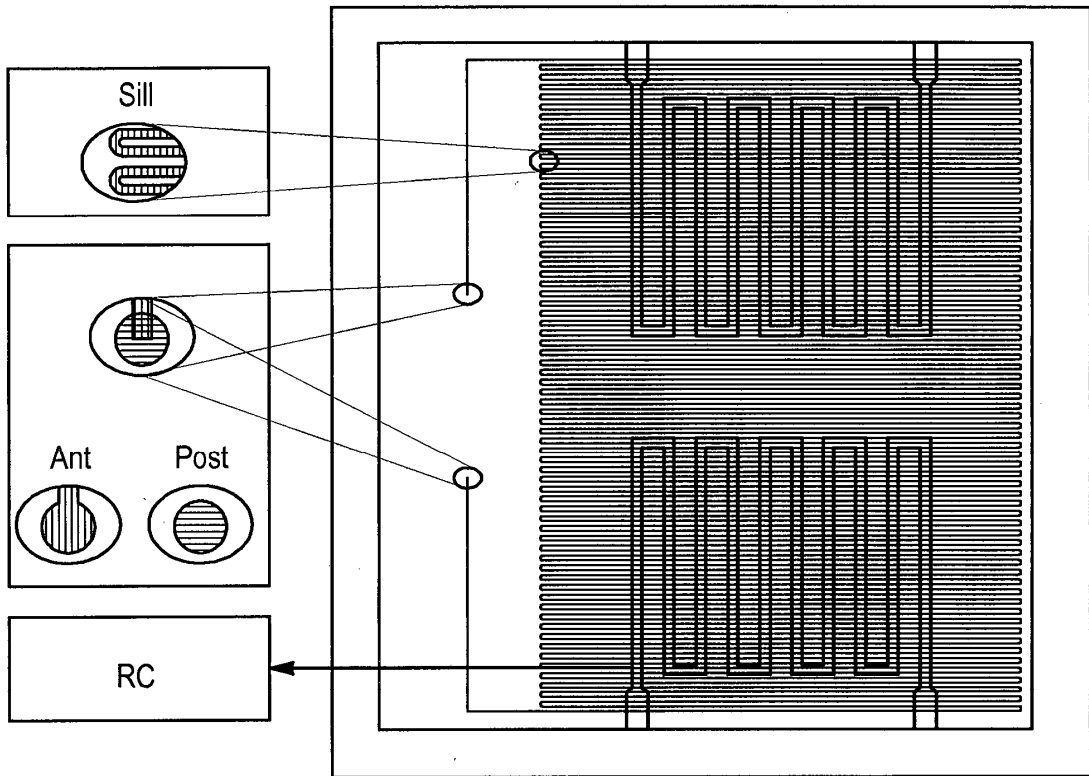


FIG. 3

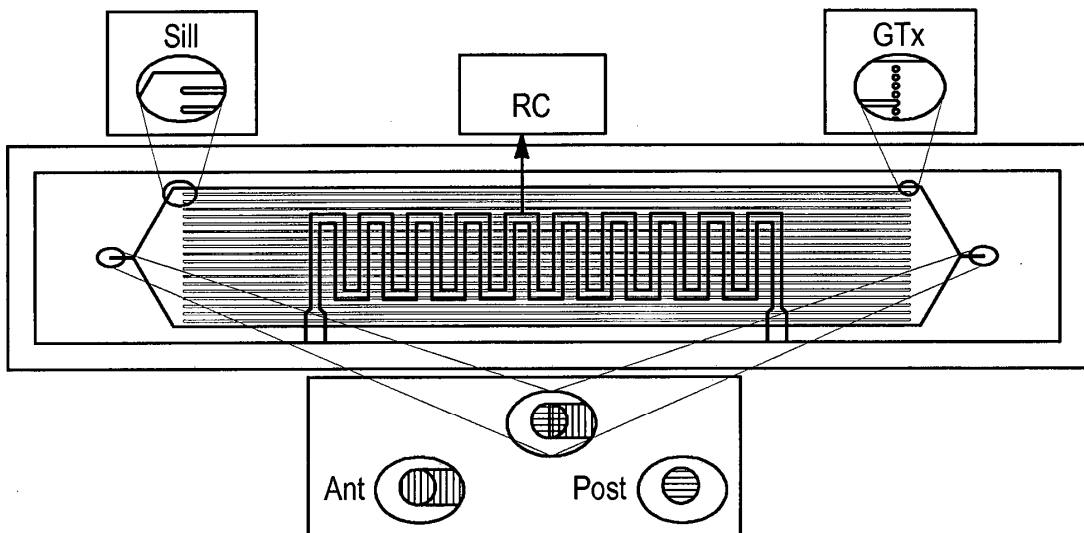


FIG. 4

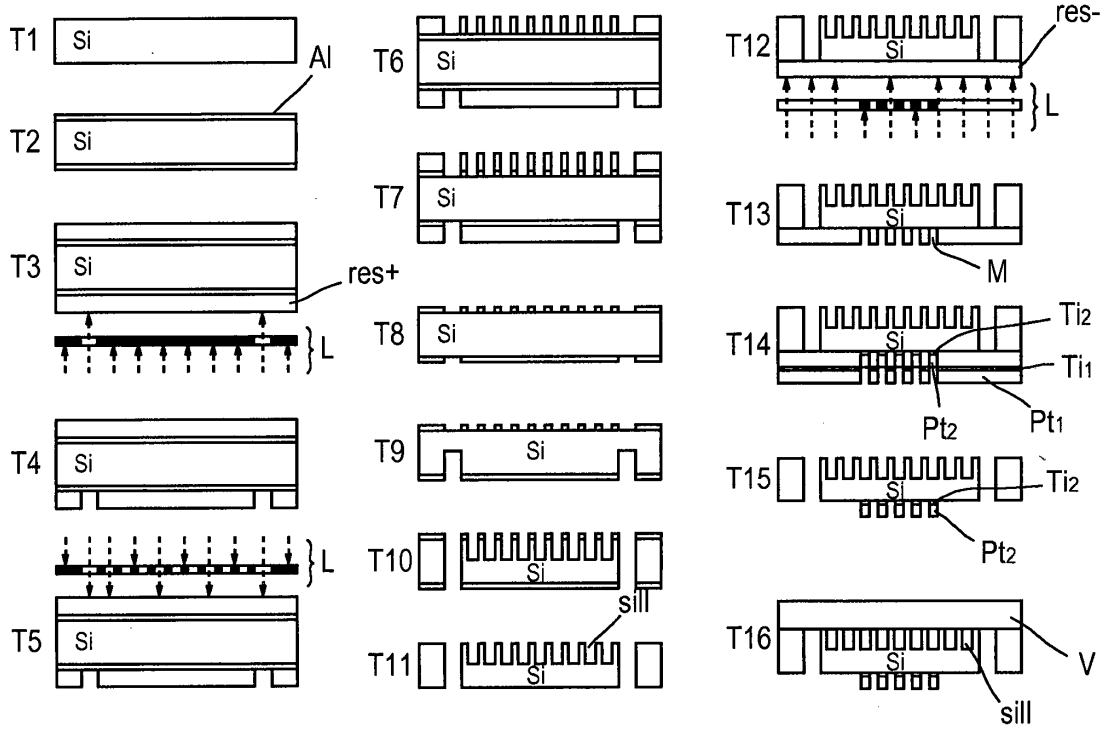


FIG. 5

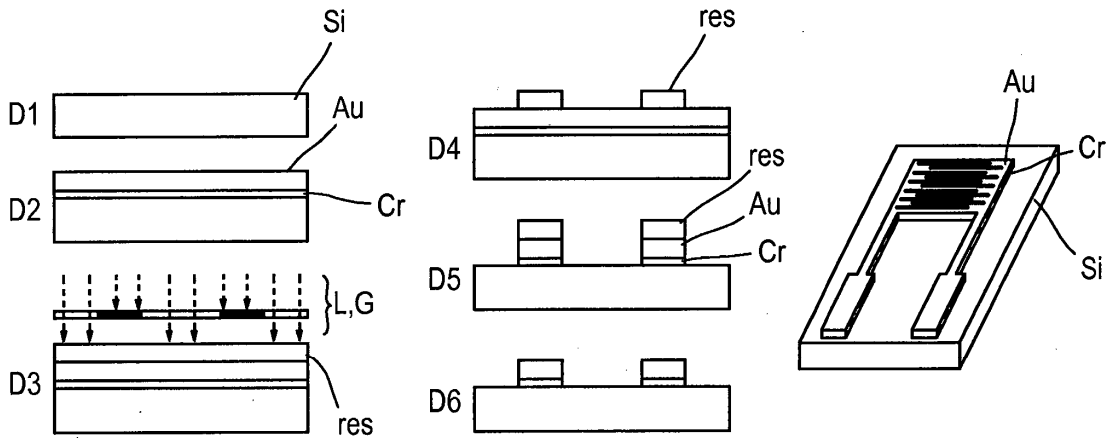


FIG. 6

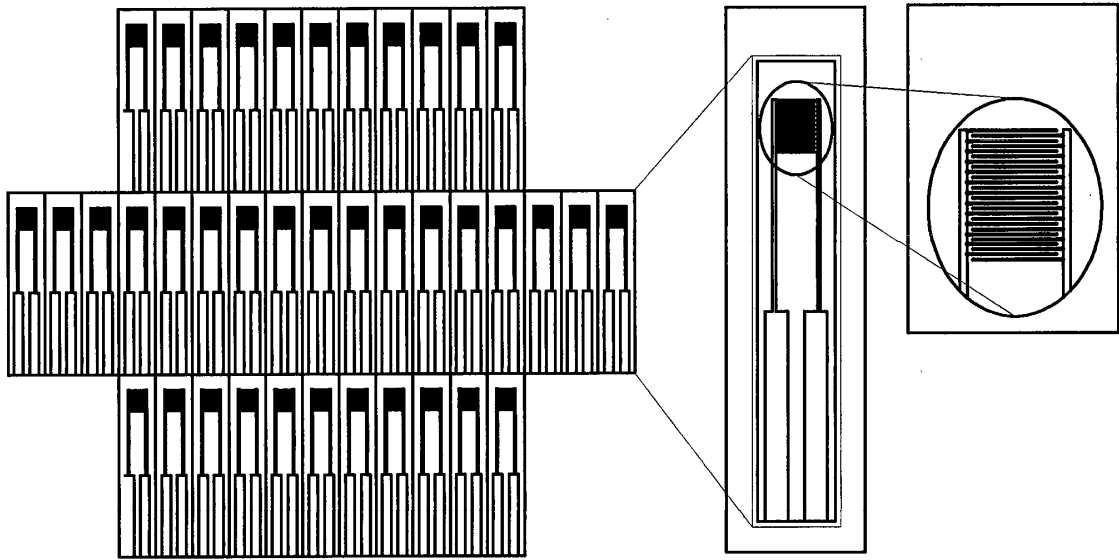


FIG. 7

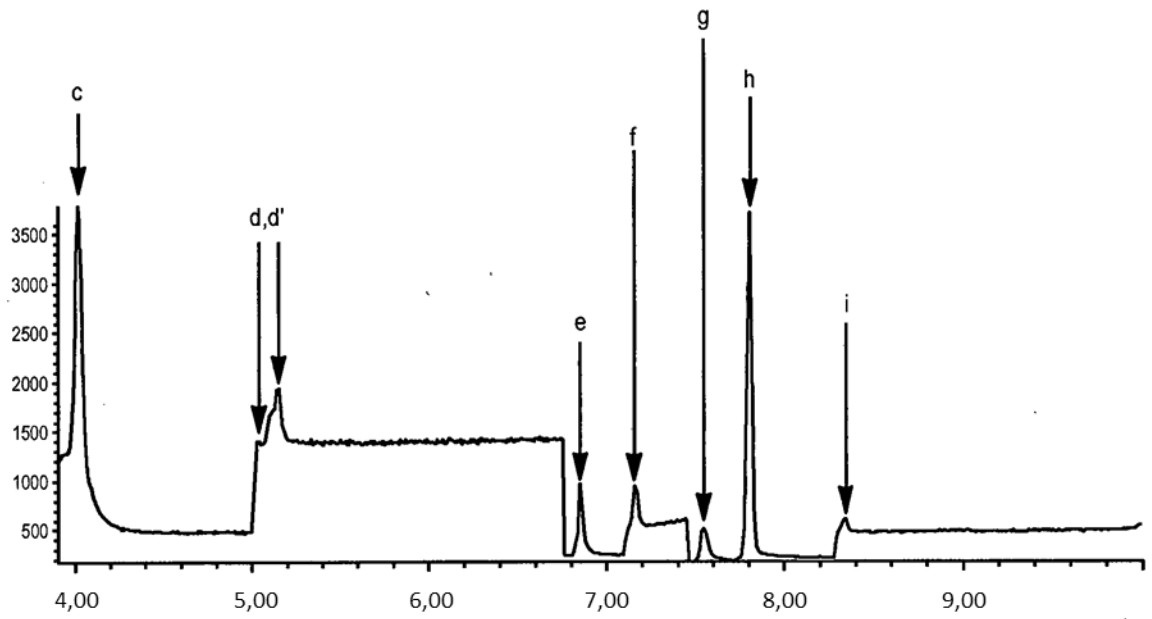


FIG. 8

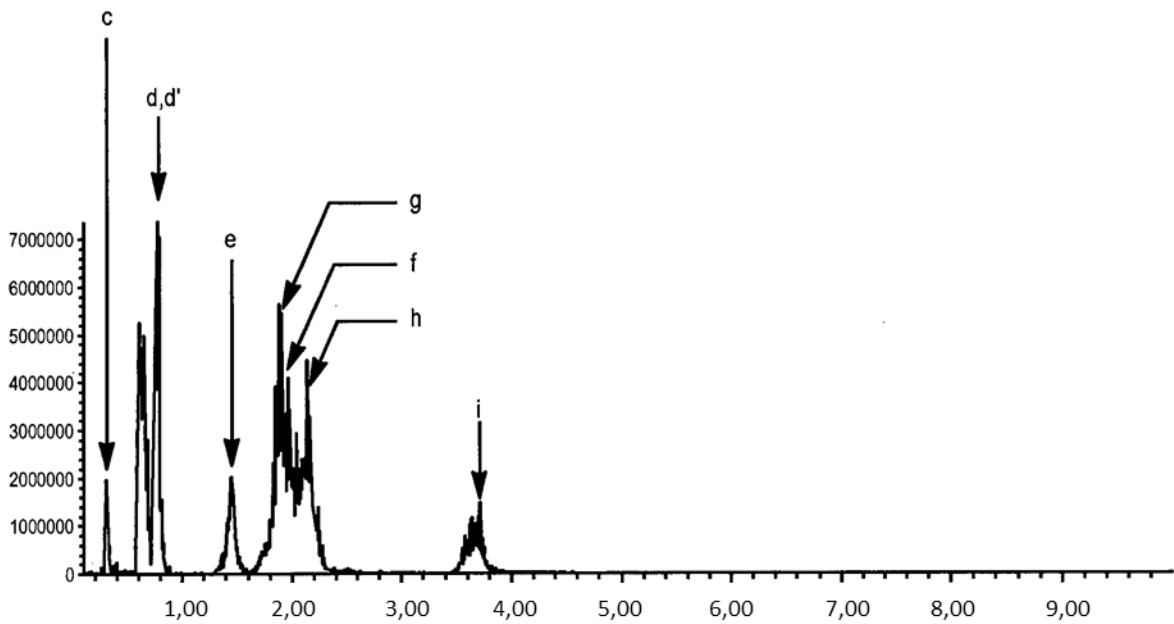


FIG. 9

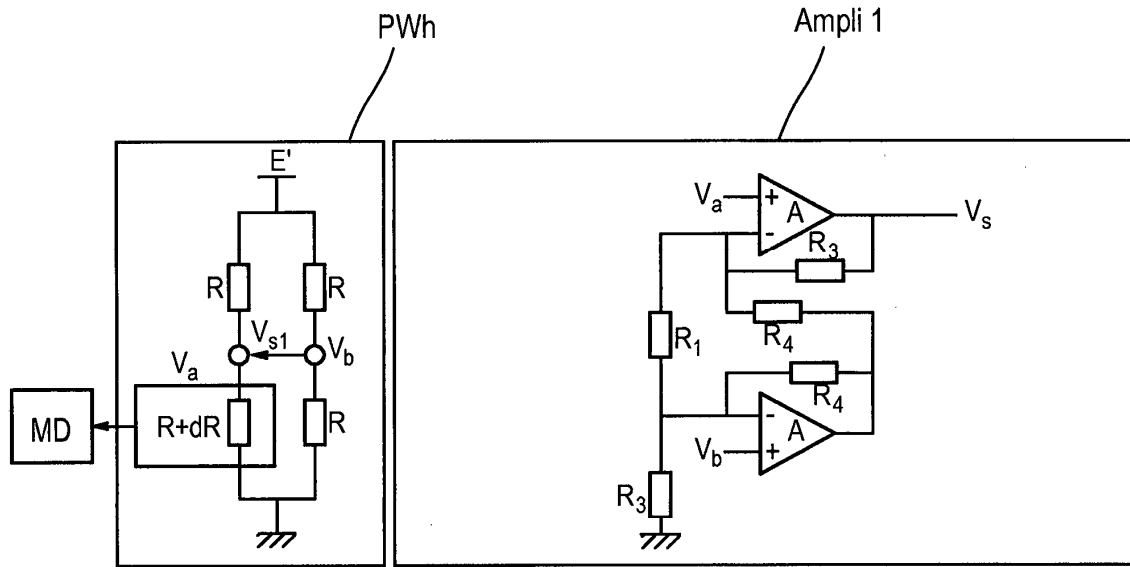


FIG. 10A

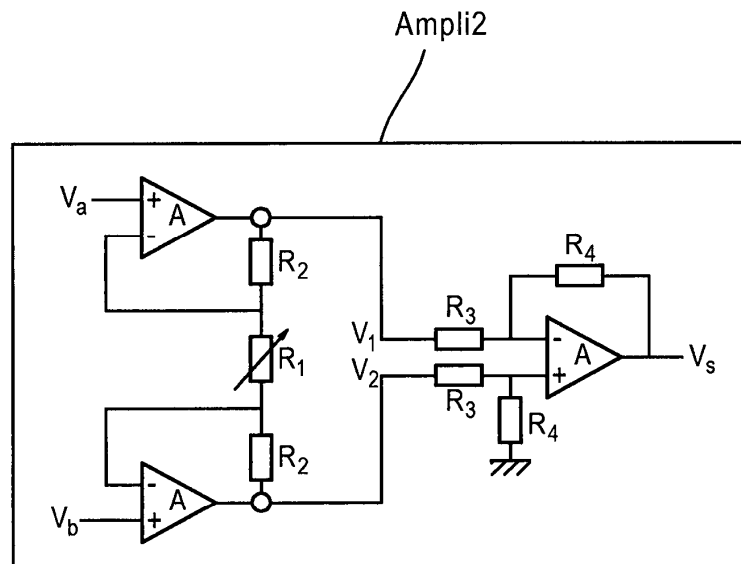


FIG. 10B

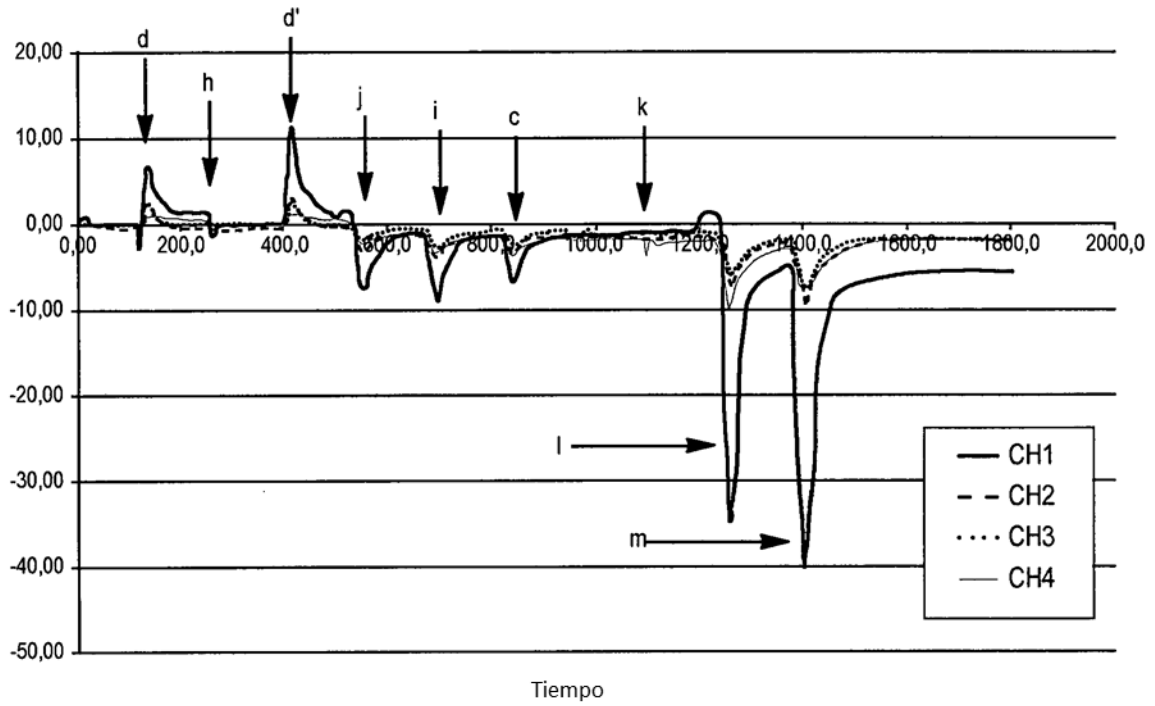


FIG. 10C

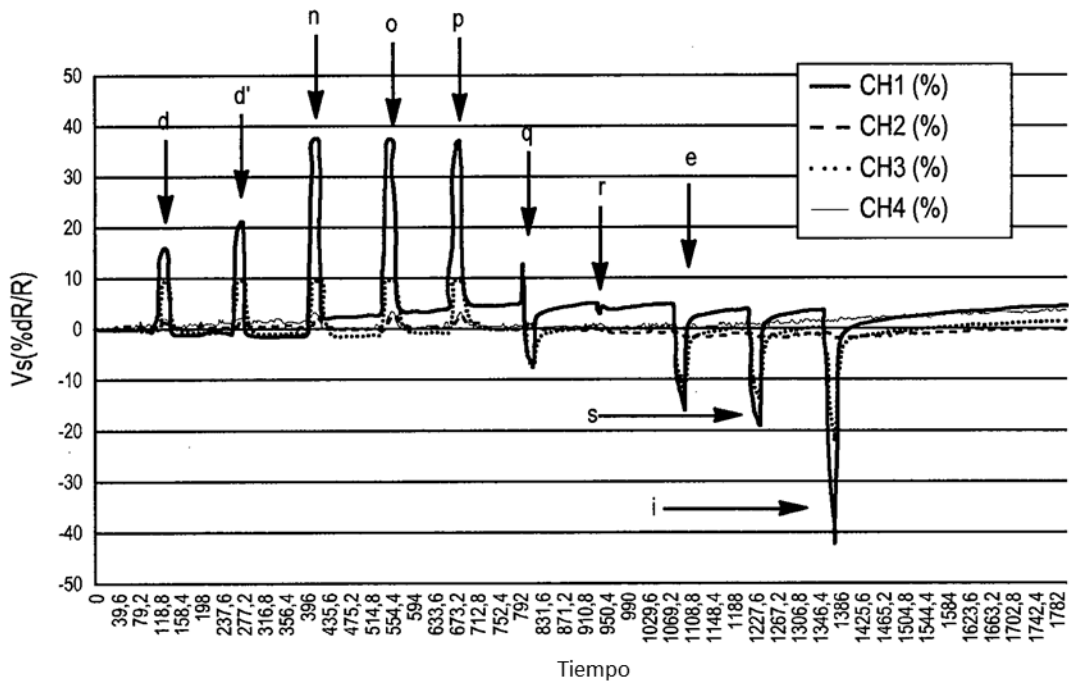


FIG. 10D

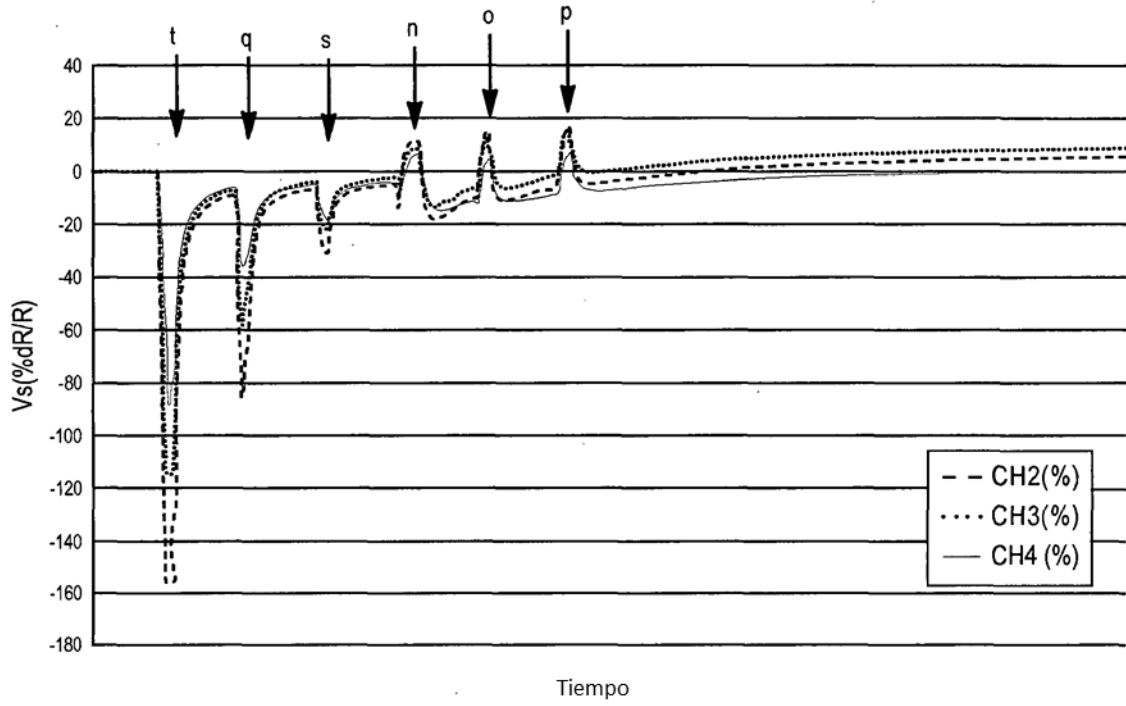


FIG. 10E

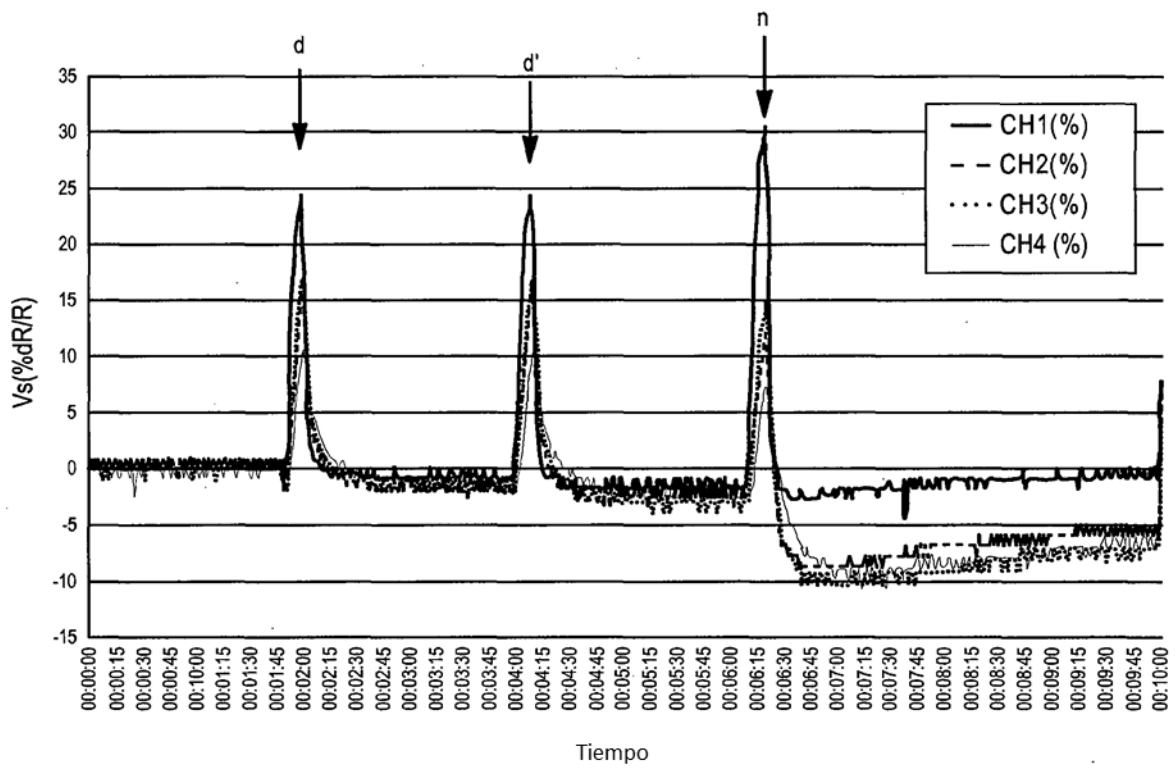


FIG. 10F

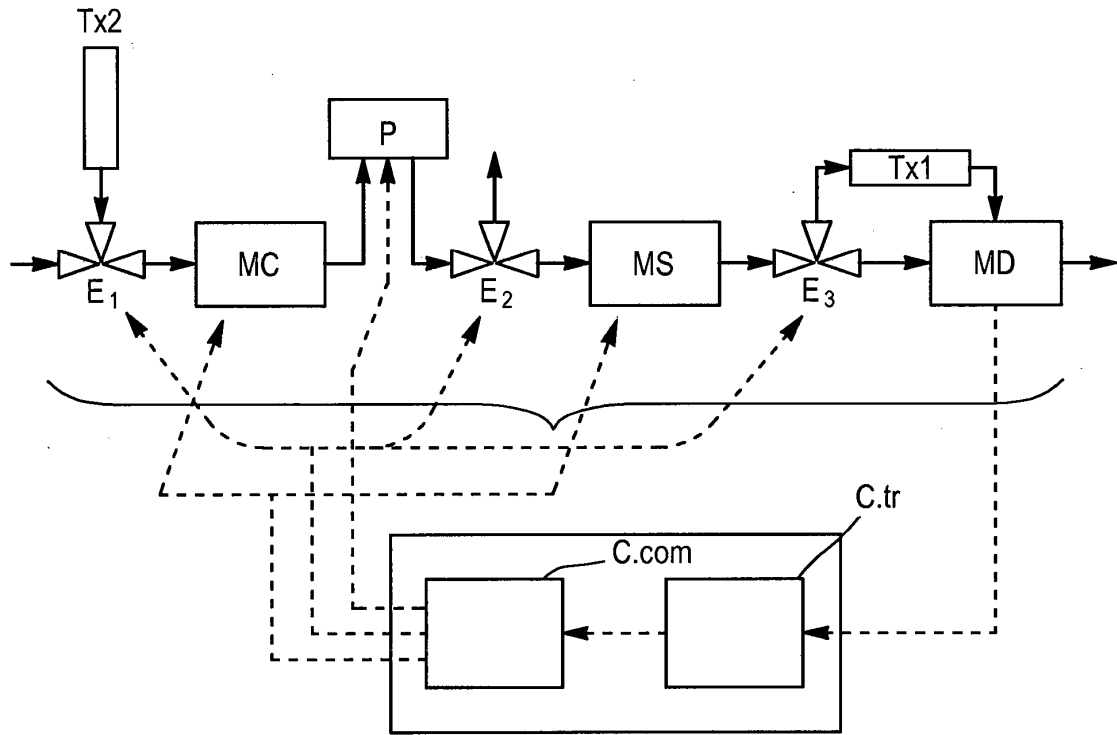


FIG. 11

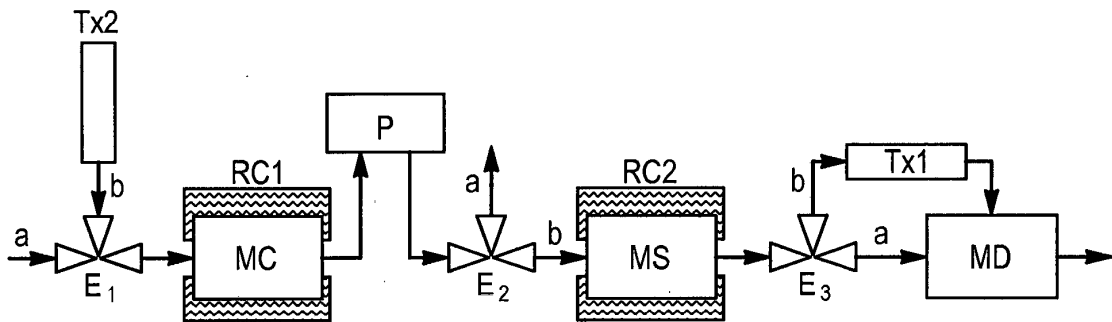


FIG. 12

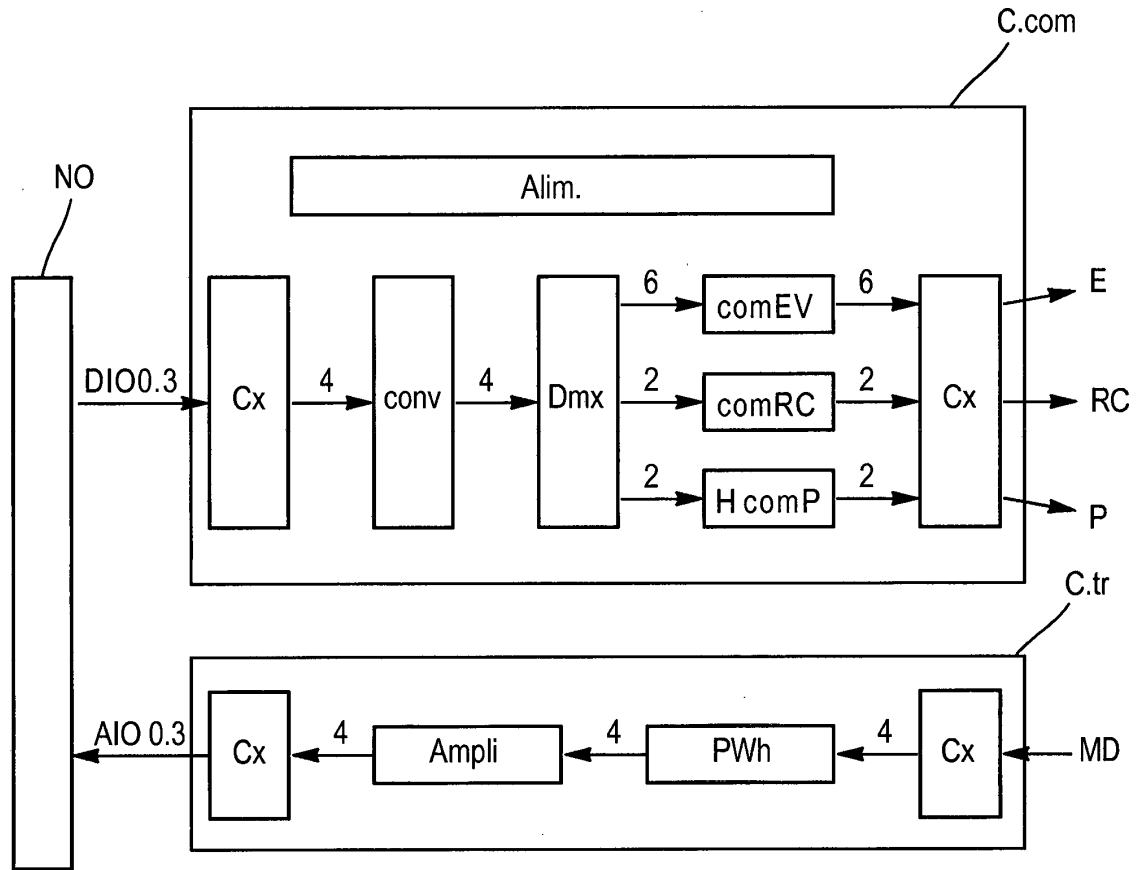


FIG. 13

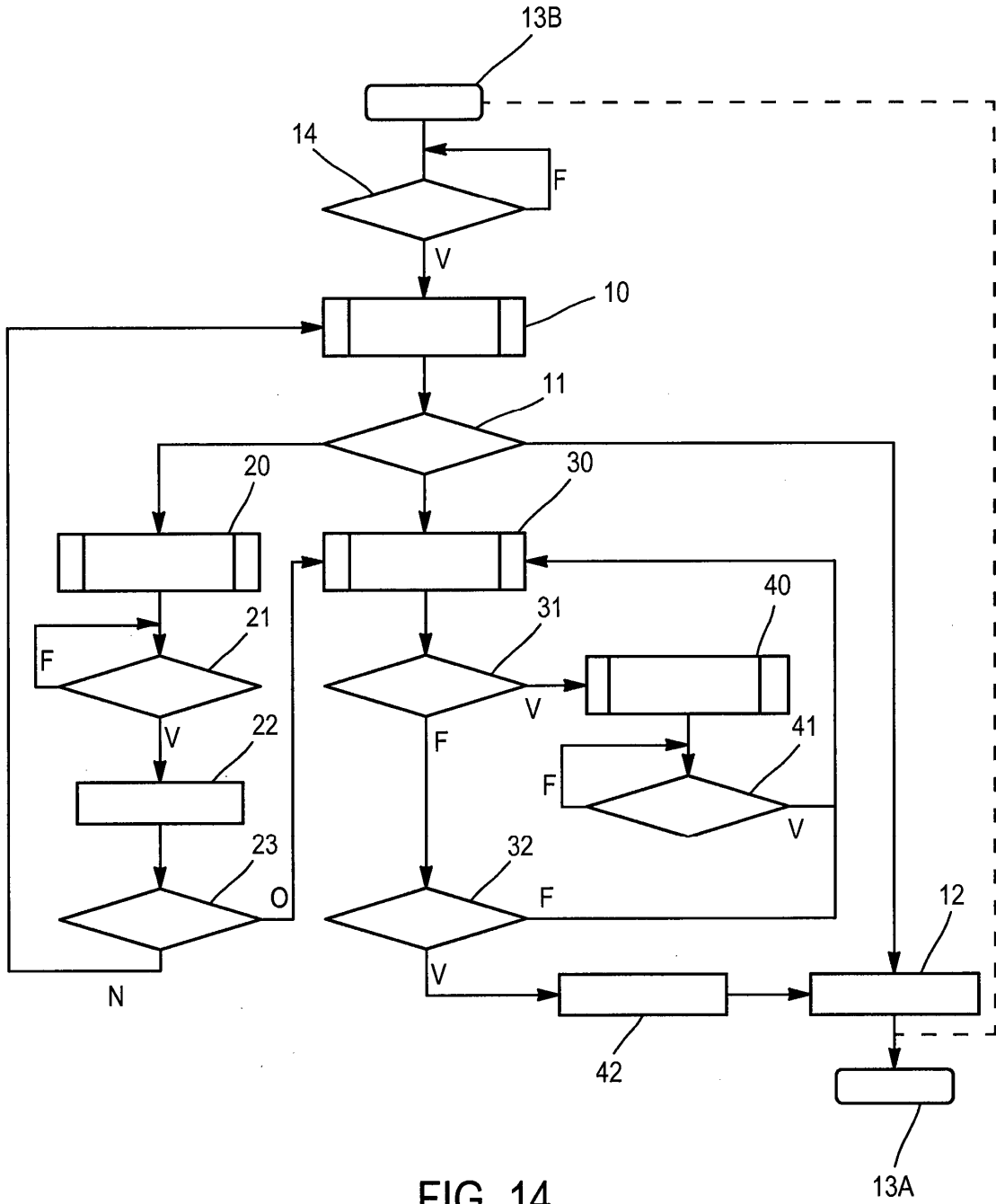


FIG. 14