



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño



**ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES DE UN SISTEMA DE
MEDICIÓN PARA LA APLICACIÓN EN BIOSENSORES
CONSTRUIDOS CON QCM**

TESIS PRESENTADA POR

Heriberto Magallanes Medina

PARA OBTENER EL GRADO DE

BIOINGENIERO

Director: Dr. Fabian Natanael Murrieta Rico

Ensenada, México, octubre de 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES DE UN SISTEMA DE MEDICIÓN PARA LA
APLICACIÓN EN BIOSENSORES CONSTRUIDOS CON QCM**

TESIS


PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO


PRESENTA:

HERIBERTO MAGALLANES MEDINA


Aprobada por:




Dr. Fabián Natanael Murrieta Rico
Director



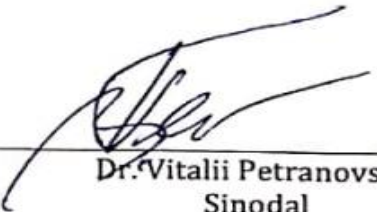
Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Codirector



Dr. Rubén César Villarreal Sánchez
Sinodal



Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Sinodal



Dr. Vitalii Petranovskii
Sinodal

Agradecimientos

A mi familia

Estoy inmensamente agradecido con ustedes, en especial con mis padres Rosa Ma. Medina Velásquez y Saturnino Magallanes Alcalá, no podría estar más bendecido por tenerlos. Les doy las gracias por su apoyo incondicional, por tanto, amor y por guiarme a lo largo de mi vida hacia el éxito de mi carrera. Gracias por tantos recuerdos tan hermosos y por aquellas inolvidables enseñanzas.

A mi esposa, Andrea Díaz García

Siendo la mayor motivación en mi vida encaminada al éxito, fuiste el componente perfecto como para lograr alcanzar esta afortunada y muy merecida victoria en la vida, el poder haber concluido esta tesis con éxito; estoy agradecido por haberte preocupado por mí a cada momento y también por siempre querer lo mejor para mi futuro.

Agradezco mucho tu apoyo, no solo al estar presente en el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida. Eres quien me motiva e inspira a ser mejor.

Al Dr. Fabian Natanael Murrieta Rico y al Dr. Priscy A. Luque Morales, que sin ustedes no tendría ese empujón que me llevo a realizar mi labor de tesis, gracias por permitirme ser parte de sus trabajos, por asesorarme y por darme tantas oportunidades de aprender, conocer, crecer y autocorregirme. Gracias a su apoyo he crecido tanto en lo académico como en otros aspectos.

Agradezco también el financiamiento que hizo posible este trabajo bajo el proyecto UNAM PAPIIT IN107817.

Al comité, gracias por su gran labor y sus enseñanzas. Ustedes como parte de mi alma mater, han nutrido mi formación como ingeniero y ser humano.

“Honor a quien honor merece”

Resumen

Entre los biosensores que existen, se tienen aquellos que poseen mayor sensibilidad y alcance, en cuanto a posibles soluciones se refiere. Las microbalanzas de cuarzo nos brindan estas características, debido a las propiedades del material se cuenta con esta hipersensibilidad a los componentes que les rodean; gracias a materiales como la zeolita se pueden detectar mediante una capa sensible enfermedades como la diabetes o gases de efecto invernadero como el gas metano, donde se lleva a cabo un análisis cuantitativo o cualitativo del proceso; para ello, el dispositivo es modificado depositando sobre su superficie la zeolita en polvo (misma que fue sintetizada y caracterizada por EDS, SEM y XRD para comprobar su autenticidad). Como parte del desarrollo del proyecto, se realizan análisis experimentales para medir en forma continua las variaciones de frecuencia generadas por una microbalanza de cuarzo bajo variaciones de temperatura.

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	IV
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	IX
1. Introducción	1
1.1 Usos e importancia de los biosensores.....	1
1.1.1 Que es una QCM.....	1
1.1.2 Características de un biosensor.....	2
1.1.3 Una QCM está hecha de material piezoeléctrico	2
1.2 La ecuación de Sauerbrey	5
1.2.1 QCM como biosensores.....	6
1.2.2 El problema de medición de cambios de frecuencia	8
1.3 Justificación.....	10
1.4 Planteamiento del problema	10
1.5 Objetivos.....	10
1.5.1 Objetivo general.....	10
1.5.2 Objetivos específicos.....	10
1.6 Hipótesis.....	10
2. Un sistema de medición para las QCM	10
2.1 Metodología.....	11
2.2 Desarrollo de Síntesis	12

2.2.1 Técnicas de caracterización.....	15
2.2.1.1 Difracción de rayos X.....	15
2.2.1.2 Microscopio Electrónico de Barrido.....	18
2.2.1.3 Espectroscopia por dispersión de Energía de Rayos X.....	20
2.3 Caracterización.....	23
2.4 Diseño experimental.....	28
2.2.1 Desarrollo del sistema de instrumentación	31
3. Resultados y discusiones	37
3.1 Análisis experimental del proyecto.....	37
3.2 Análisis estadístico de los datos.....	38
4. Conclusión del proyecto	46
Referencias	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema del modo de propagación de una onda de corte.....	3
2. Esquema de una QCM, donde se muestran los electrodos para ambas caras del disco de cuarzo.....	3
3. Dimensiones de la QCM, con milímetros como unidad.....	4
4. Cristal de cuarzo, cortes AT (a) y BT (b)	5
5. Esquema de una medición de frecuencia en una QCM.	7
6. Materiales para el proceso de síntesis de la zeolita.	13
7. Fragmentos de cuarzo contenidos dentro de una botella de polipropileno.	14
8. Sistema de medición de frecuencia.....	15
9. Difracción de rayos X.....	16
10. Principio de funcionamiento del XRD.....	17
11. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de ZnS y CdS.	18
12. Tricomas de hojas del genero Gnaphalium sp. Obtenida con el microscopio electrónico de barrido.	19
13. Sistema integral de microscopía electrónica (SEM) y haz de iones enfocados (FIB) modelo JEOL JIB-4500.	20
14. Interacción de los electrones con la materia.	21
15. Cómo se producen algunos de los rayos-X más usuales.	23
16. Morfología de la superficie de una QCM-A.....	24
17. Análisis sobre la superficie limpia de una QCM, zeolita A (LTA) en polvo y QCM modificada con zeolita por EDS.	25
18. Análisis de zeolita en polvo por XRD.....	26

19. Elementos de un sistema de medición durante el experimento.....	26
20. Señal de la temperatura constante sobre la QCM-A.....	27
21. Variaciones de frecuencia durante los procesos de adsorción y desorción.....	28
22. Procedimiento de conexión eléctrica de la microbalanza de cuarzo: a) realizando pruebas de funcionamiento sobre el proyecto, b) Señal eléctrica en la salida del resonador con una QCM conectada.....	29
23. QCM conectada por medio de sujetadores especiales.....	30
24. Señal generada por la QCM mostrada en el osciloscopio.....	30
25. Esquema de un contador hecho con el componente 74LS161.....	32
26. Esquema de un contador hecho con compuertas AND.....	33
27. Diseño de PCB previo a su impresión.....	34
28. Diagrama de flujo, Diseño de PCB por PROTEUS 8.1.....	35
29. Diagrama de bloques del medidor de frecuencia.....	36
30. Partes del código de programación MATLAB para graficar las mediciones obtenidas.....	37
31. Proceso de medición de frecuencia generada por la microbalanza de cuarzo durante variaciones de temperatura.	38
32. Análisis estadístico de zona a: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.	41
33. Análisis estadístico de zona b: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.	42
34. Análisis estadístico de zona c: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.	43
35. Análisis estadístico de zona d: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.	44

36. Análisis estadístico de zona f: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.	45
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pagina
1. Datos relacionados al Análisis estadístico de frecuencias para las zonas a, b, c, d y e...	40
2. Datos relacionados al Análisis estadístico de temperaturas para las zonas a, b, c, d y e.....	40

Capítulo 1. Introducción

Los biosensores son dispositivos capaces de obtener información de aquello para lo que son fabricados. Su función se basa en la adsorción, son capaces de cuantificar el producto de una reacción química. Estos sirven para detectar o controlar variables físicas tales como la temperatura, densidad y presión; o también cuantificar compuestos como la glucosa en sangre [1], saturación de oxígeno en sangre, la inmunoglobulina E [2] e identificación de alimentos transgénicos [3], entre otras cosas.

1.1 Usos e importancia de los biosensores

Su importancia es alta, ya que es esencial para llevar a cabo muchos de los procesos industriales o particulares; por ejemplo, a un hospital le resulta muy importante el uso de biosensores para el diagnóstico y prevención de enfermedades, pues su impacto afecta tanto a la salud del paciente como a la comunidad que le rodea [4].

La detección de compuestos químicos específicos tiene distintas aplicaciones, como lo son el diagnóstico de enfermedades [1], la cuantificación de gases de efecto invernadero [5], la identificación de metales pesados en aguas residuales [6], entre otros. Los sistemas de detección son dispositivos costosos que por lo general solo están disponibles en empresas que se dedican a esta tarea. Una alternativa para estos sistemas de detección es la microbalanza de cristal de cuarzo o QCM (del inglés *Quartz Crystal Microbalance*).

1.1.1 Que es una QCM

Una QCM está construida con un disco de cuarzo al cual se le deposita metal en ambas caras, dicho metal funciona como electrodos para realizar una conexión eléctrica. Una QCM tienen una frecuencia propia la cual depende de sus propiedades físicas (de acuerdo al modelo Von Dyke [7]). Dicha frecuencia cambia cuando hay un depósito de masa sobre la superficie de la QCM. Considerando esto, al medir la variación de la frecuencia propia de la QCM es posible cuantificar la variación de masa sobre su superficie, de acuerdo a la ecuación de Sauerbrey [8]. Si la superficie de la QCM es funcional con un material (capa sensible) que interactúe con un compuesto químico de interés (analito), entonces la variación en frecuencia mostrada corresponderá solo a un analito específico.

Considerando el funcionamiento de la QCM y su capacidad de ser modificada para la detección de compuestos químicos específicos, en este trabajo se presenta el diseño, construcción y análisis experimental de un sistema de detección selectivo de compuestos químicos en fase líquida.

1.1.2 Características de un biosensor

La característica importante que separa a un biosensor de cualquier otro transductor es la especificidad que imparte debido a la incorporación de un material biológicamente activo sobre la superficie sensitiva [9]. Así, por ejemplo, por unir un antígeno o proteína sobre el dispositivo es posible detectar solo un analito en presencia de muchos otros, por lo que sería útil como una prueba de laboratorio clínico, monitoreos ambientales y procesos de control. El método de transducción depende del tipo de cambio fisicoquímico resultante del evento de detección [9]. Existen varios tipos de biosensores, como aquellos basados en masa (p.e. piezoeléctricos), electroquímicos (potenciométricos, amperométricos, etc.) y ópticos (fibra óptica, etc.). Los sensores piezoeléctricos son un tipo particular de biosensores, ya que estos poseen una alta sensibilidad al cambio de masa sobre la superficie y además la manera en que estos trabajan (detectan) cualitativamente o cuantitativamente es a través de un cambio de frecuencias que se da por medio de un cambio de masa sobre la superficie del sensor piezoeléctrico [10], [9], [11], [12].

Los primeros trabajos realizados en piezoelectricidad fueron hechos por Raleigh en 1885 [13], pero la primera investigación exhaustiva fue realizada por Jacques y Pierre Curie en 1880 [14]. El efecto piezoeléctrico se produce en cristales. Cuando se aplica presión al cristal, la red cristalina se deforma de tal manera que surge un momento dipolar en las moléculas del cristal. Muchos tipos de cristales presentan el efecto piezoeléctrico, pero las propiedades eléctricas, mecánicas y químicas del cuarzo lo convierten en el tipo de cristal más común usado en aplicaciones analíticas [15].

1.1.3 Una QCM está hecha de material piezoeléctrico

Los QCM más comunes son aquellos de corte AT y BT (International Crystal Manufacturing Co., Inc). Existe una relación entre el cambio de frecuencia y el cambio de masa, según

Sauerbrey, de la relación que existe puede determinarse la masa sobre la superficie de la QCM. La QCM tiene una sensibilidad tan alta, que va en el orden de Hz por nanogramo [8].

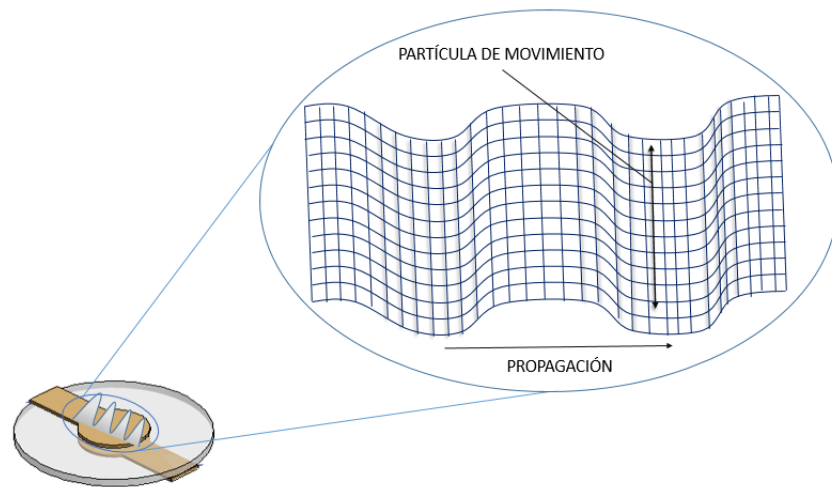


Figura 1. Esquema del modo de propagación de una onda de corte

Su función depende del elemento que se pretende analizar, por ejemplo. Para el caso de usar un líquido, la viscosidad es un factor que hay que considerar para evitar que este influya en el análisis de un compuesto o elemento determinado.

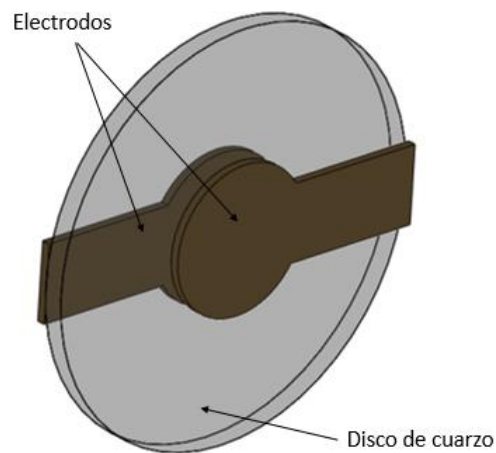


Figura 2. Esquema de una QCM, donde se muestran los electrodos para ambas caras del disco de cuarzo

Como se aprecia en la Fig. 2. La aplicación de un potencial eléctrico externo a un material piezoeléctrico produce una deformación sobre la QCM. Como la QCM está hecha de piezoeléctrico, un campo eléctrico oscilante aplicado a través del dispositivo induce una onda acústica que se propaga a través del cristal y alcanza una impedancia mínima cuando el grosor del dispositivo es un múltiplo de la mitad de la longitud de onda acústica. Una QCM es un dispositivo de modo de corte en el cual la onda acústica se propaga en una dirección perpendicular a la superficie del cristal, Fig. 1.

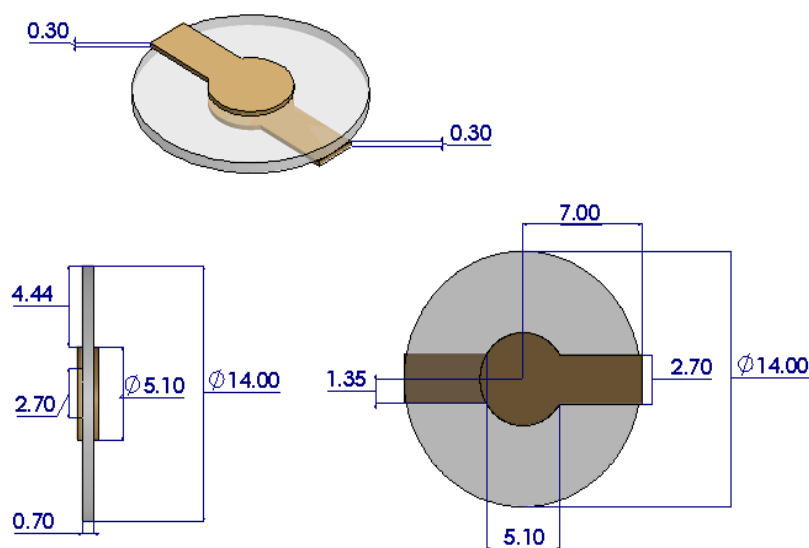


Figura 3. Dimensiones de la QCM, con milímetros como unidad

Tal como se muestra en la Fig. 3, se tienen las dimensiones de una QCM gracias a International Crystal Manufacturing Co. Con esto sabemos la relación que existe entre el tamaño del electrodo y de la superficie del cristal de cuarzo, frecuentemente el tamaño del electrodo es a 1/5 parte sobre la superficie del disco de cuarzo.

Volviendo a la Fig. 1, en general las ondas de corte son más lentas que las ondas longitudinales, pero tienen mayor amplitud que ellas y poseen mayor energía. El desplazamiento de las partículas durante el paso de la onda sobre la superficie puede ser en cualquier dirección perpendicular a la de propagación [16].

Para que esto suceda, la placa de cristal de cuarzo se debe cortar a una orientación específica con respecto a los ejes de cristal. Estos cortes provenientes de la familia de cortes en Y girados, los cortes AT y BT que se muestran en la Fig. 4 son representativos [17], [18].

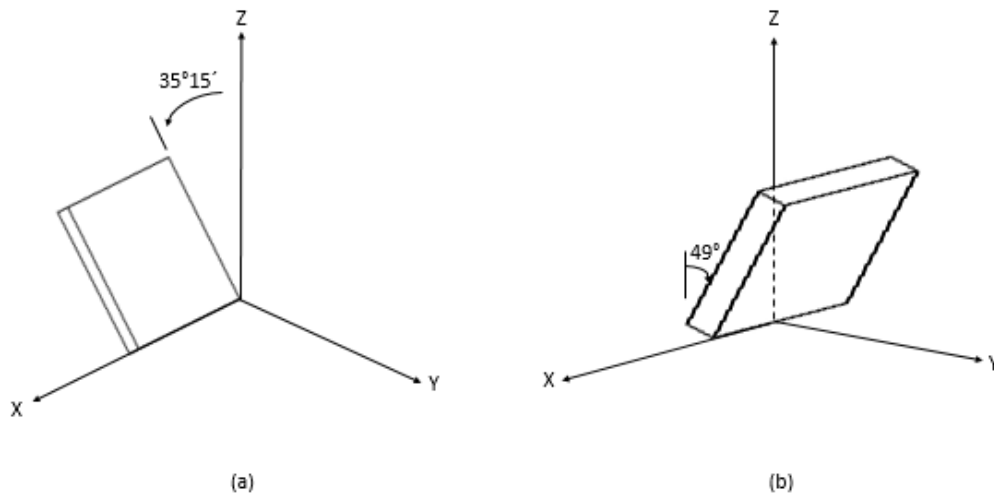


Figura 4. Cristal de cuarzo, cortes AT (a) y BT (b)

Solo el área central de la placa dice la oscilación. Por esta razón, los resortes de retención se pueden unir al borde de cristal de cuarzo, sin que la vibración se vea significativamente afectada [8].

1.2 La ecuación de *Sauerbrey*

La ecuación relaciona la variación de frecuencia de resonancia con el tamaño y grosor (entre otras características) de la microbalanza de cuarzo y con los cambios de masa que se generan en su superficie [19].

$$\Delta f = \frac{-2.3 \times 10^{-6} (F) (\Delta m)}{A} \quad (1)$$

Donde F [Hz] es la frecuencia natural de la microbalanza de cuarzo sin especie sobre la superficie, A [cm²] es el área sensible y Δm [g] corresponde a la masa que se deposita en el área sensible la cual provoca un cambio en la frecuencia de resonancia del resonador, esta variación se denota por Δf [Hz]. La frecuencia natural de resonancia, esto es sin masa agregada, está relacionada con el grosor de la microbalanza de cuarzo d [mm] y la constante de frecuencia N [kHz · mm], por medio de la expresión.

$$f = \frac{N}{d} \quad (2)$$

La Ec. 1 se utiliza habitualmente para la interpretación de los datos que proporciona la microbalanza. Esta ecuación se puede deducir a la siguiente expresión:

$$\Delta f = -Cf \cdot \varphi \quad (3)$$

Donde Cf [$\text{Hz} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$] es la sensibilidad de pesaje de capa diferencial y φ [$\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$] está definida como la asignación de masa sobre la superficie de la QCM [8].

1.2.1 QCM como biosensores

Los QCM tienen varias aplicaciones, que van desde algo de tamaño nanométrico a algo de tamaño micrométrico, entre sus aplicaciones están, el seguimiento de iones de metales pesados en soluciones acuosas, la identificación de alimentos transgénicos o un sensor a base de una QCM empleando una macromolécula de criptofano A para la adsorción de metano en el ambiente [6], [3], [5].

Para complementar, en relación a las aplicaciones, existe algo muy importante conocido como caracterización en las microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM) [20], [21], [22], [23], [24]. Y esto se refiere a una “evaluación” para las QCM, es decir, una caracterización de biosensores piezoeléctricos que vayan de acuerdo con el análisis de materiales líquidos, esto es, que cumpla con los requerimientos tales como frecuencias que maneja el sensor, electrodo que dispone, viscosidad, etc. Esto con la finalidad de garantizar la estabilidad de la oscilación al contacto con el medio externo y la sensibilidad que dispone.

Una QCM es un disco delgado hecho de piezoeléctrico. Como sensor, al conectarse a un circuito resonador este genera una frecuencia f_1 [Hz]; cuando una especie llega a ser adsorbida en la superficie de la QCM su frecuencia cambia a f_2 [Hz], la variación de f_1 a f_2 se conoce como un cambio de frecuencia Δf [Hz] y está dado por

$$\Delta f = f_2 - f_1. \quad (4)$$

Como el proceso de cambio de masa ocurre en la capa sensible en forma dinámica, es necesario obtener aproximaciones continuas a la frecuencia f_x generada por la microbalanza [Hz], en este caso el valor de f_x puede aproximarse a f_2 después de Δf o a f_1 antes de Δf .

Para la medición de frecuencias sobre la QCM, otras investigaciones reportan conectar la QCM a un circuito electrónico, donde la frecuencia de resonancia de este sea de aproximadamente 4.7 MHz. Luego las frecuencias de resonancia son medidas con un contador de frecuencia Iwatsu SC 7201. Los datos de los sensores se recogen por una computadora y la temperatura de los flujos es controlada. En este trabajo el valor del Δf está en función del tipo de zeolita (material que aumenta la especificidad del sensor) y el compuesto a detectar, el valor de Δf alcanza un valor máximo de 50 Hz [25].

Otras investigaciones como [26] y [27] utilizan equipos que miden las variaciones de frecuencia sobre las QCM con uso de QCA922 (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN) y 53131A (obtenido por Agilent) respectivamente.

Con uso de una QCM con corte AT y frecuencias de 7.995 MHz recubierta de electrodos de plata (obtenidos de International Crystal Manufacturing Co.) se realizaron experimentos para la formación de hidrogeles basados en aptasensores que detectan el virus de la influenza aviar [26]. El QCA922 es un instrumento desarrollado para la gravimetría piezoeléctrica, este cuenta con un soporte para microbalanza de cuarzo que va conectado al contador de frecuencias, Fig. 5; para analizar la información obtenida del QCA922 es necesario conectarlo a una computadora personal.

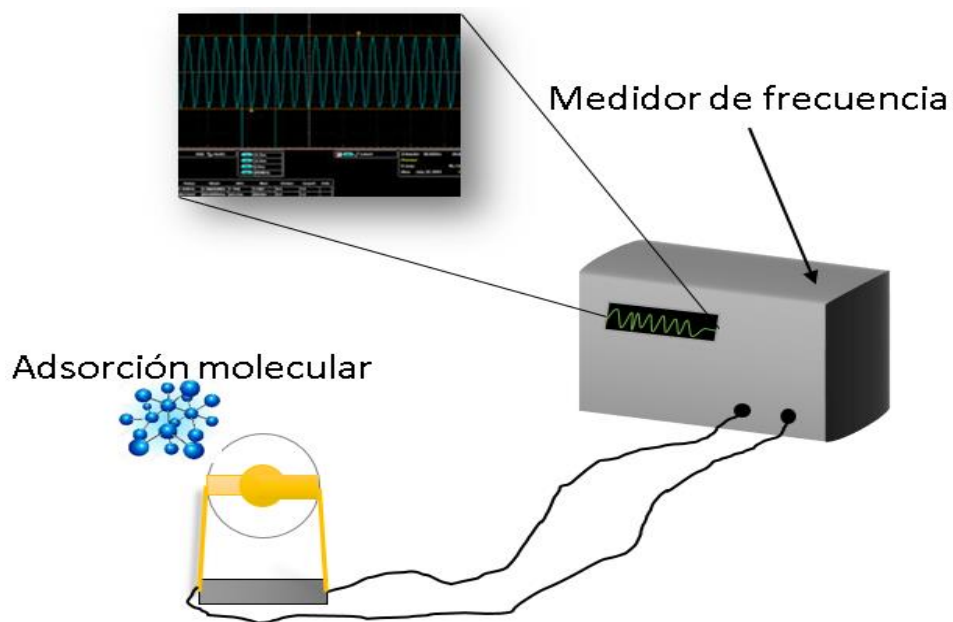


Figura 5. Esquema de una medición de frecuencia en una QCM.

Por otro lado, se desarrolla una sonda funcional a un biosensor de QCM basado en nanopartículas de oro para la amplificación y detección de *Bacillus anthracis* [27]. Donde se emplea una QCM de 6MHz corte AT (proveniente de Factory 707, china) recubiertos con cromo y oro en ambos lados conectado a un contador de frecuencias, 53131A (de Agilent). El 53131A es un instrumento que se conecta por medio de cables a los electrodos de la QCM, donde también el contador es conectado a una computadora para procesar los datos.

1.2.2 El problema de medición de cambios de frecuencia

Los sensores en el dominio de frecuencia o FDS (del inglés *Frequency Domain Sensor*) generan una señal con una frecuencia que depende del estímulo de entrada f_1 , esto implica que el cambio en el estímulo de entrada genera un cambio de frecuencia Δf desde un valor inicial medido f_{1x} a un valor posterior medido f_{2x} , por lo que la Ec. 4 se puede expresar como

$$\Delta f = f_{2x} - f_{1x} \quad (5)$$

Así que el cambio en el estímulo de entrada puede calcularse a partir de la medición de Δf . El problema de medir este cambio de frecuencia es que hay que medir diferentes valores de frecuencia durante el tiempo que el sensor es estimulado. Esto implica que si f_1 es medido cuando el sensor esta sin estimulo, la frecuencia medida (f_x) se aproxima a f_{1x} , por lo que $f_x \sim f_{1x}$. Por otra parte, cuando el sensor es estimulado, $f_x \sim f_{2x}$. Bajo esta consideración, se entiende que f_{2x} puede tomar cualquier valor posible en el intervalo de valores que puede generar el FDS. Dada la naturaleza del proceso de cambio de frecuencia, cada vez que se mida f_{2x} se debe de calcular Δf [28]. Estas mediciones continuas requieren, bajo métodos convencionales de medición [29], que se disponga del tiempo adecuado o suficiente para obtener la mejor aproximación al valor de frecuencia generado por el FDS, lo que requiere diferente tiempo para cada valor posible de f_{2x} . Esta última característica motiva el uso del principio de aproximaciones racionales, ya que el tiempo de medición en general, se reduce cuando se incrementa el valor de la frecuencia a estimar [30].

Debido a estas razones, en este trabajo propone emplear el principio de aproximaciones racionales [31] para lograr tener una mejor señal con respecto a las medidas obtenidas del sensor. El principio de aproximaciones racionales corresponde a una aproximación a la

frecuencia desconocida f_x cuando se conoce la coincidencia entre S_0 & S_x . S_0 corresponde a la señal de referencia y esta depende de la frecuencia conocida f_0 , S_x corresponde a la señal de con frecuencia desconocida, la cual depende de f_x .

En cada coincidencia se obtiene una aproximación a f_x con la ecuación.

$$f_x = f_0 \frac{P_n}{Q_n} \quad (6)$$

Donde P_n es el enésimo pulso en la S_x y Q_n es el enésimo pulso en la S_0 . En el proceso de aparición de coincidencias se observa la aparición de mediantas, la mejor aproximación al mensurando (f_x) se obtiene en la medianta m [32].

$$f_x = f_0 \frac{\sum_m P_n}{\sum_m Q_n} \quad (7)$$

La medianta m corresponde a una constante donde existe una relación entre P_1/Q_1 y P_2/Q_2 . Siendo las fracciones entre pulsos P_1/Q_1 y P_2/Q_2 , de manera independiente pueden estimar la frecuencia desconocida, como se muestra en [33]. Por otro lado, de acuerdo a [34], [35], si tenemos dos fracciones P_1/Q_1 , P_2/Q_2 , pueden formar una fracción media (medianta):

$$\frac{P_2}{Q_2} < \frac{P_1 + P_2}{Q_1 + Q_2} < \frac{P_1}{Q_1} \quad (8)$$

Se sabe que las fracciones medianta se encuentran entre sus aproximaciones (progenitores), es decir, para:

$$\frac{P_2}{Q_2} < \frac{P_1}{Q_1} \quad (9)$$

Por lo tanto, en este caso P_1/Q_1 y P_2/Q_2 son aproximados entre sí.

Este es un método para estimar la frecuencia deseada de una señal, con muchas ventajas sobre otros métodos de estimación de frecuencia [36] [29] [37]. Estas mejoras incluyen un tiempo de muestreo no fijo, insensibilidad a la fluctuación de fase y precisión limitada por la estabilidad de referencia [32] [38] [39] [28] [40]. La aplicación de dicha técnica se ha propuesto para varias tareas, como sensores para compuestos químicos [41] [30] o industria automotriz [39].

1.3 Justificación

El medir en forma continua las variaciones de frecuencia generadas por una microbalanza de cuarzo permite su aplicación en una amplia variedad de aplicaciones, donde la supervisión humana en forma detallada y por un tiempo prolongado, no es posible. Entre estas aplicaciones se tiene la contaminación de aguas subterráneas por metales pesados, detección y diagnóstico de enfermedades en humanos o sistemas para detección de compuestos peligrosos.

1.4 Planteamiento del problema

¿Cómo es posible cuantificar la variación de frecuencia generada por una QCM, en forma continua?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Desarrollo de un sistema de instrumentación para el análisis de datos experimentales en biosensores construidos con microbalanzas de cuarzo.

1.5.2 Objetivo específico

- Estudiar el efecto de la interacción de un material poroso sobre diferentes sustratos.
- Desarrollar un instrumento para medir las QCM
- Analizar el proceso de medición continua de las variaciones de frecuencia generadas por una QCM bajo estimulación.

1.6 Hipótesis

- H1: “Es posible cuantificar la variación de frecuencia generada por una QCM, en forma continua”
- H2: “La estabilidad de la QCM, al momento de medir su frecuencia, no se ve afectada por los cambios de temperatura”

Capítulo 2. Un sistema de medición para las QCM

2.1 Metodología

De acuerdo a los objetivos planteados, se describen las etapas que se presentan a continuación:

- Revisión bibliográfica. Etapa que corresponde a la recaudación de información para el estudio del comportamiento de una QCM en medios líquidos, las ecuaciones que describen su funcionamiento, sus características físicas, etc.
- Diseño de circuitos de instrumentación. Es la elaboración de circuitos previo a su impresión sobre una placa de cobre, para esto se hace uso de una herramienta de diseño como Proteus o Eagle para la generación de PCB (del inglés *Printed Circuit Board*). En esta etapa se lleva a cabo un “acomodo” que vuelva más simple el manejo del circuito a la hora de usar sus componentes.
- Desarrollo de circuitos impresos. Posterior al diseño de circuitos de instrumentación se realiza la impresión sobre una placa de cobre. Después se detalla la placa perforando, tratando cualquier imperfección e incluyendo sus componentes. Esta y la anterior etapa van de acuerdo al desarrollo de sistemas de instrumentación para la medición de una QCM.
- Programación de microcontroladores. A través de una herramienta de programación como Arduino, se desarrolla el código para un microcontrolador; esto con el objetivo de comunicar los circuitos de instrumentación (previamente descritos) con una computadora para la adquisición de datos.
- Integración de sistemas de instrumentación. En esta etapa se lleva a cabo la parte experimental donde una QCM está conectada a una computadora a través de circuitos elaborados, para obtener datos en función de la QCM. Aquí es donde se realizan las mediciones de diferentes elementos en un medio líquido.
- Análisis y discusión de resultados. En esta etapa se discuten los resultados y se lleva a cabo un análisis para su interpretación. Todos los datos que fueron capturados por el ordenador se grafican para entonces indagar sobre su comportamiento.
- Escritura de tesis y publicación de resultados. Esta etapa es donde se termina de complementar la tesis con: los resultados obtenidos del sistema de instrumentación,

su revisión bibliográfica y el análisis correspondiente a los datos adquiridos por el sistema de medición en medios líquidos donde se detectaron analitos de interés.

- Defensa de tesis. En esta etapa se hace manifiesto del análisis experimental y de los resultados obtenidos, además de exponer cada una de las partes que componen el sistema de medición.

2.2 Desarrollo de síntesis

El uso de zeolitas para el desarrollo de sensores ha sido ampliamente estudiado. Tienen diversas aplicaciones, como la detección de explosivos o el diagnóstico médico. Estos sensores funcionan debido a la interacción de la zeolita y un compuesto químico (que conducen al cambio de masa seguido de un cambio de frecuencia. Esto permite para detectar y cuantificar especies químicas, si un sensor se modifica con una zeolita que está sintonizada con el analito de interés El uso de detectores basados en zeolita se determina por la transducción causada por el elemento piezoeléctrico. En otras palabras, se transforma la interacción de analito zeolita en una señal eléctrica.

En este trabajo, presentamos un análisis experimental del funcionamiento de una microbalanza de cristal de cuarzo piezoeléctrico (sensor modificado con zeolita LTA). El sensor pudo controlar la masa de agua adsorbida / desorbida por la zeolita en la superficie del sensor. Este dispositivo estaba conectado a un convertidor de frecuencia a digital, y se obtuvieron datos durante un largo período de tiempo. El QCM modificado se colocó en un horno, donde las variaciones de temperatura se controlaron en el rango entre 30 y 100 °C Como resultado, se obtuvo un análisis del efecto de la temperatura y la masa en la frecuencia medida.

La zeolita LTA se sintetizó de acuerdo con la receta IZA [42]; este proceso se verificó a través de los métodos de caracterización de difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido (SEM), los cuales serán discutidos más adelante.

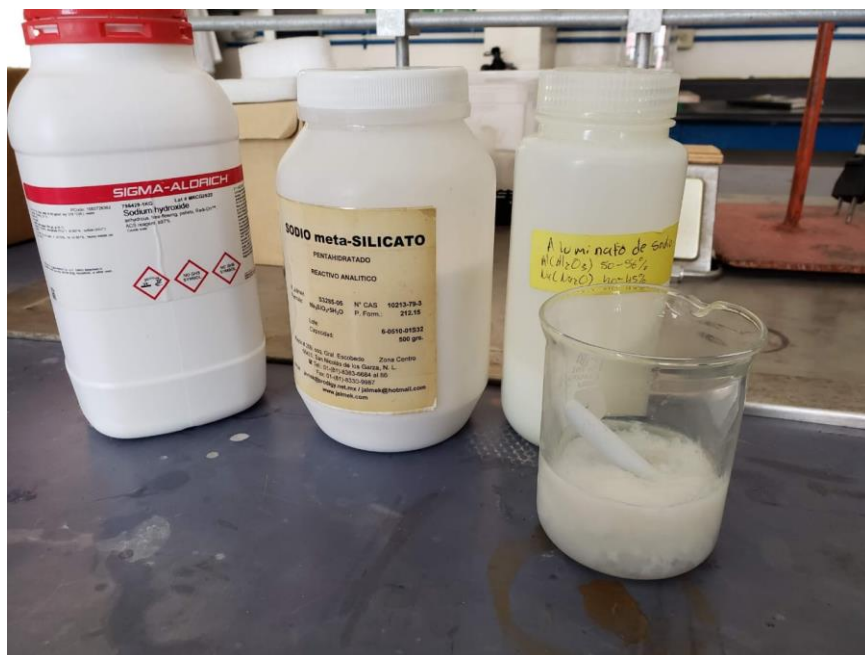


Figura 6. Materiales para el proceso de síntesis de la zeolita.

- Los materiales fuente para la síntesis, fueron agua desionizada, hidróxido de sodio, aluminato de sodio, metasilicato de sodio. Para este experimento, se adquirió un QCM de 6 MHz de corte AT de QuartzPro.
- La síntesis comienza mezclando 80 ml de agua y 0.723 g de hidróxido de sodio. Esta solución se dividió en dos volúmenes iguales.
- La primera mitad se mezcló con 8.258 g de aluminato de sodio. Esta mezcla se agitó hasta homogeneizar. La segunda mitad se mezcló con 15.48 g de metasilicato de sodio, y se agitó hasta que quedó transparente.
- Ambas soluciones se combinaron y se formó un gel espeso posteriormente, la mezcla se agitó hasta que se homogeneizó.
- En esta etapa, el QCM y el gel se combinaron dentro de una botella de polipropileno.
- El proceso de cristalización se realizó en un horno, donde la botella se colocó a 99 °C durante 4 horas.
- Posteriormente, se recuperó el polvo correspondiente al LTA tal como fue confirmado por los patrones XRD (Fig. 18), y la microbalanza de cuarzo modificada con zeolita, marcada como QCM A.

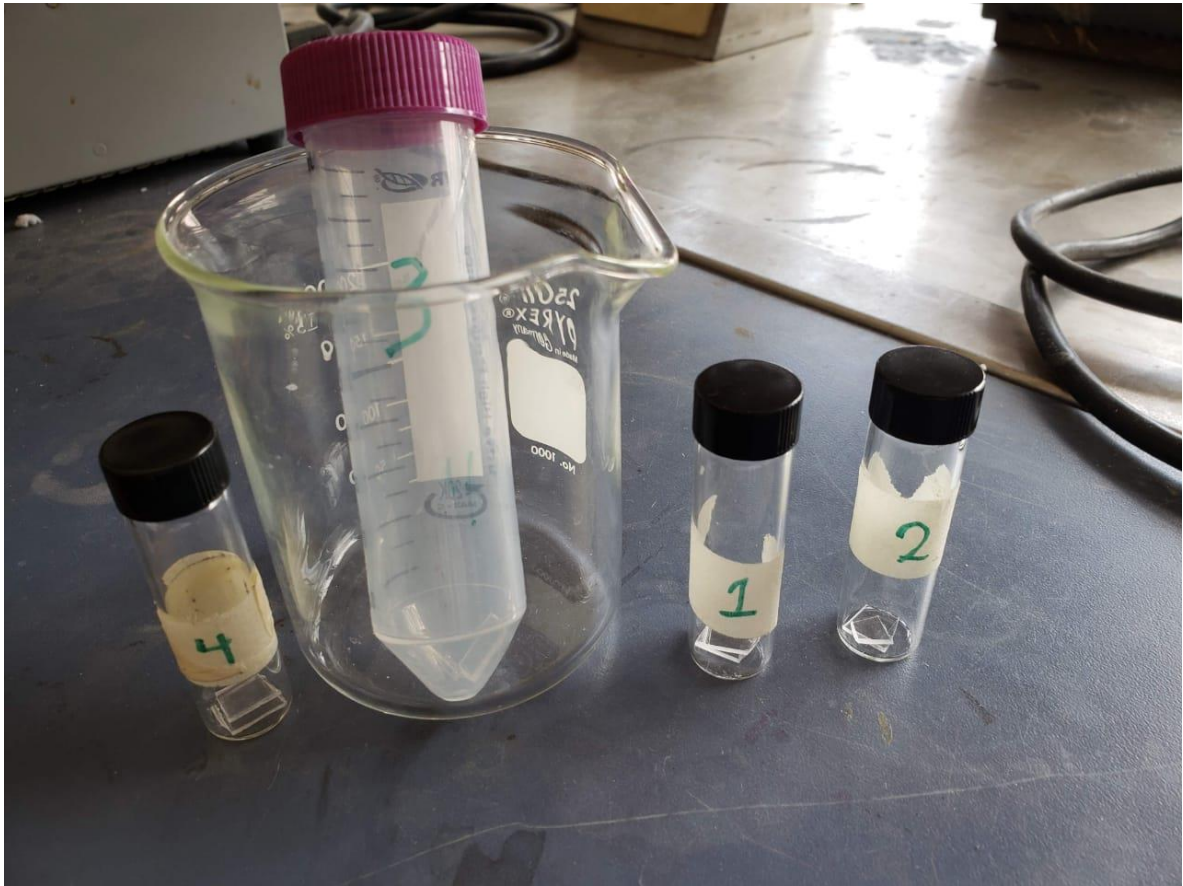


Figura 7. Fragmentos de cuarzo contenidos dentro de una botella de polipropileno.

En la Fig. 7 se aprecian varias muestras utilizadas dentro de la parte experimental, donde posteriormente el cuarzo fue modificado con zeolita sintetizada.

Pruebas de adsorción y desorción.

- Después de ser modificado, el QCM A se colocó en un horno, donde estaba bajo variaciones controladas de temperatura. Durante este procedimiento, se esperaba que desorbiera las moléculas de agua del material zeolítico en el QCM cuando la temperatura dentro del horno aumentaba, cuando la temperatura disminuía se esperaba que absorbiera agua ambiental en el material zeolítico.



Figura 8. Sistema de medición de frecuencia

La Fig. 8 muestra el sistema de medición con el que se obtuvieron los datos experimentales del presente capítulo, como se muestra en la figura, la QCM está conectada a un circuito el cual envía la información a la computadora a través de la herramienta de programación MATLAB R2018b.

2.2.1 Técnicas de caracterización

En adición a la síntesis de los materiales se realiza la caracterización del material utilizando SEM, EDS y XRD. Previo a los resultados obtenidos por caracterización de los materiales, se da una breve explicación de las técnicas de caracterización empleadas durante el análisis experimental.

2.2.1.1 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una técnica de caracterización para conocer las propiedades internas de las estructuras cristalinas de los materiales. Se basa en la generación de rayos X que inciden sobre la superficie de un material y la captación de rayos reflejados del material. Esta técnica es adecuada para la caracterización de materiales dado que su longitud de onda

es aproximada a la separación atómica de los elementos que conforman el material. La mayor parte de la información que poseemos de las estructuras internas cristalinas es mediante la técnica de XRD (del inglés *X Ray Diffraction*) [43].

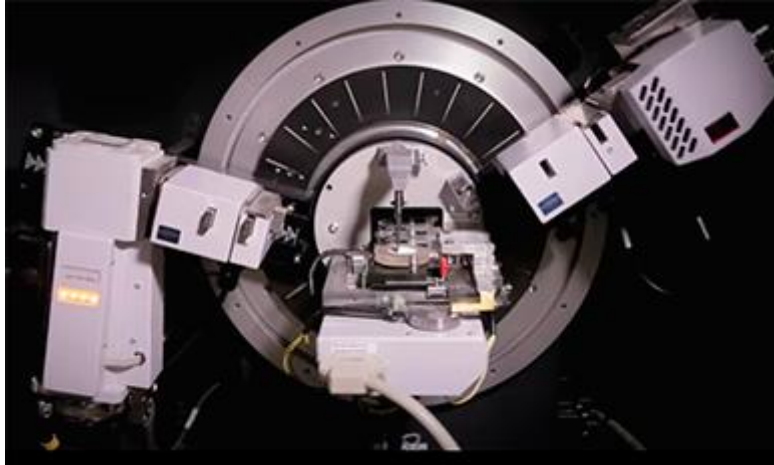


Figura 9. Difracción de rayos X

La Fig. 9 muestra el equipo que realiza la técnica de difracción de rayos X, método que permite identificar los minerales por su estructura cristalina [44].

Los rayos X interactúan con la materia a través de los electrones que la forman y que se están moviendo a velocidades mucho menores que la de la luz. Cuando la radiación electromagnética X alcanza un electrón cargado este se convierte en fuente de radiación electromagnética secundaria dispersada, por lo que, si se incide un haz de rayos X sobre un cristal, este choca con los átomos haciendo que los electrones que se encuentren en su trayectoria vibren con una frecuencia idéntica a la de la radiación incidente y actúan como fuentes secundarias de nuevos frentes de onda de rayos X con la misma longitud de onda y frecuencia [45] [46] [47].

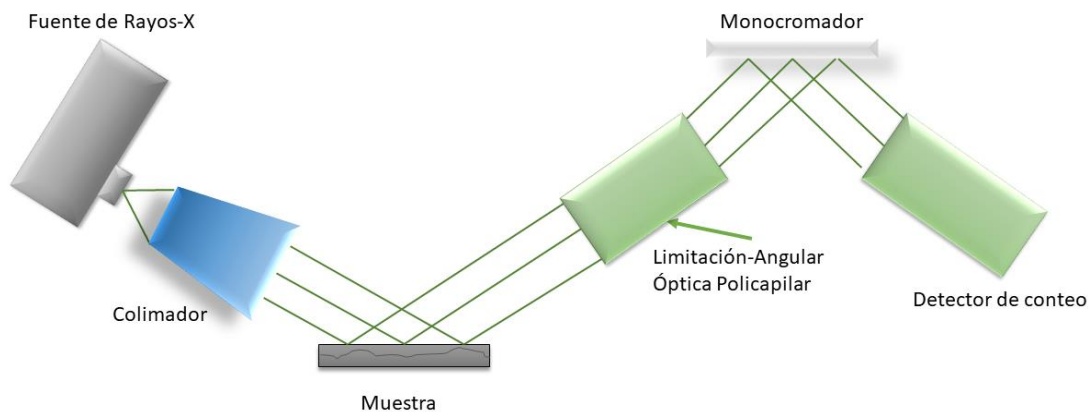


Figura 10. Principio de funcionamiento del XRD

El método se basa en el uso de una muestra de mineral o de roca que se prepara reduciéndola a polvo fino, y se extiende sobre un porta muestras, usando una pequeña cantidad de aglomerante adhesivo. El resultado de la pulverización es un número muy elevado de pequeños cristallitos, los cuales pueden reflejar los rayos X [44].

El instrumento está formado por una fuente de rayos X, un porta muestras montado sobre un goniómetro giratorio y un detector. El porta muestras, situado en posición, gira según la trayectoria de un haz colimado de rayos X, mientras que un detector de estos rayos, que se encuentra montado en un brazo, gira alrededor para captar las señales difractadas de los mismos.

Una vez que se obtiene el difractograma, el cual es un gráfico que en abscisas indica el ángulo de difracción y en ordenadas la intensidad correspondiente, y los datos de la muestra analizada, la identificación consiste en hallar en la base de datos el mineral cuyo difractograma corresponde [48] [49] [50].

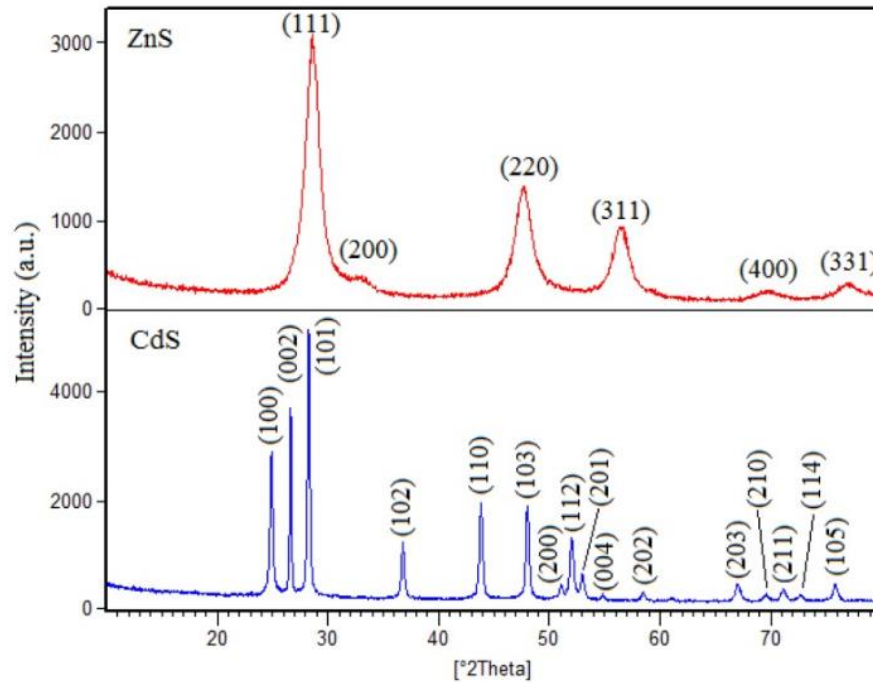


Figura 11. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de ZnS y CdS.

Siguiendo la Fig. 11. “Los resultados mostrados en el patrón de difracción muestran que se obtuvo con éxito una alta pureza de ZnS y CdS de tamaño nanométrico con estructuras cristalinas cúbicas y hexagonales, respectivamente” [51]. Lo anterior es posible gracias a que los minerales son cristalinos y la distribución regular en el espacio de sus componentes se describe por medio de las redes cristalinas, que manifiestan la repetición periódica de la celda mineral.

2.2.1.2 Microscopio Electrónico de Barrido

El Microscopio Electrónico de Barrido o SEM (del inglés *Scanning Electron Microscope*), es aquel que utiliza un haz de electrones en vez de un haz de luz para formar, visualizar y analizar una imagen. Tiene una gran profundidad de campo que permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. Permite analizar imágenes en alta resolución (de sólo nanómetros, $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) de forma que las características más ínfimas de la muestra pueden ser visualizadas con gran amplificación (hasta de 1 000 000 X). La preparación de las muestras es relativamente fácil [52].

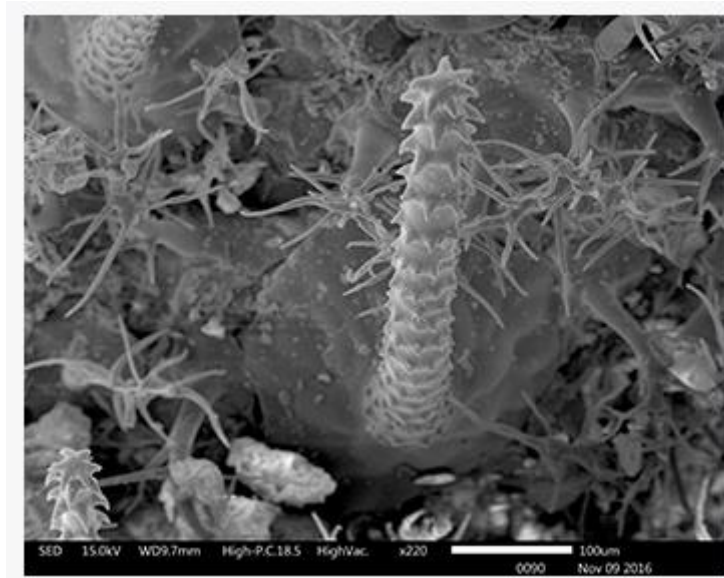


Figura 12. Tricomas de hojas del genero *Gnaphalium* sp. Obtenida con el microscopio electrónico de barrido.

Su versatilidad está dada en su alta resolución (de 20 a 50 Å) y apariencia tridimensional de las imágenes, producto de su gran profundidad de foco.

Estos microscopios trabajan con un haz de electrones para generar la imagen y en condiciones de alto vacío (10^{-6} torr), las partes esenciales del microscopio son: columna de electrones, consola de controles y sistema de adquisición de imágenes [53].

En la parte superior de la columna se encuentra el emisor de electrones, que genera un haz de electrones, éste es conducido y dirigido por lentes electromagnéticas. La técnica consiste en colocar la muestra en la cámara de vacío del SEM y retirar todo el aire que se encuentra dentro de ella. De manera inmediata se enciende el emisor de electrones para bombardear la muestra. Los electrones viajan a través del arreglo de lentes diseñados para obtener un haz convergente de electrones. Las bobinas ubicadas bajo el arreglo de lentes dirigen al haz de electrones de izquierda a derecha y de arriba a abajo de tal forma que se realiza un barrido en toda la superficie de la muestra que se encuentra en la base de la cámara de vacío. Los electrones que golpean la muestra salen difractados hacia el detector. Este último capta esa señal y la manda a un procesador donde se convierte en imagen [54] [55] [56] [57].



Figura 13. Sistema integral de microscopía electrónica (SEM) y haz de iones enfocados (FIB) modelo JEOL JIB-4500.

Se requieren dos condiciones para analizar muestras en un SEM: que se encuentren libres de humedad y sean conductoras. En estos microscopios las muestras no conductoras (orgánicas, biológicas, cerámicos, polímeros) necesitan una cubierta metálica para lograr su observación, generalmente una cubierta de oro, o con carbono cuando se quiere realizar análisis químico por EDS. Por otro lado, las muestras conductoras pueden ser revisadas sin ningún tipo de cubierta [58].

2.2.1.3 Espectroscopia por dispersión de Energía de Rayos X

El detector EDS (del inglés *Energy dispersive X-Ray Spectrometer*) convierte la energía individual de cada uno de los rayos x en una señal de voltaje proporcional a la energía de los rayos x. Esto ocurre en tres pasos. En el primero se convierte los rayos x en una carga debido a la ionización de los átomos en el cristal semiconductor. En el segundo paso la carga se convierte a una señal de voltaje mediante un preamplificador y finalmente la señal de voltaje entra a un procesador que realizará la medición, véase la Fig. 14 [43].

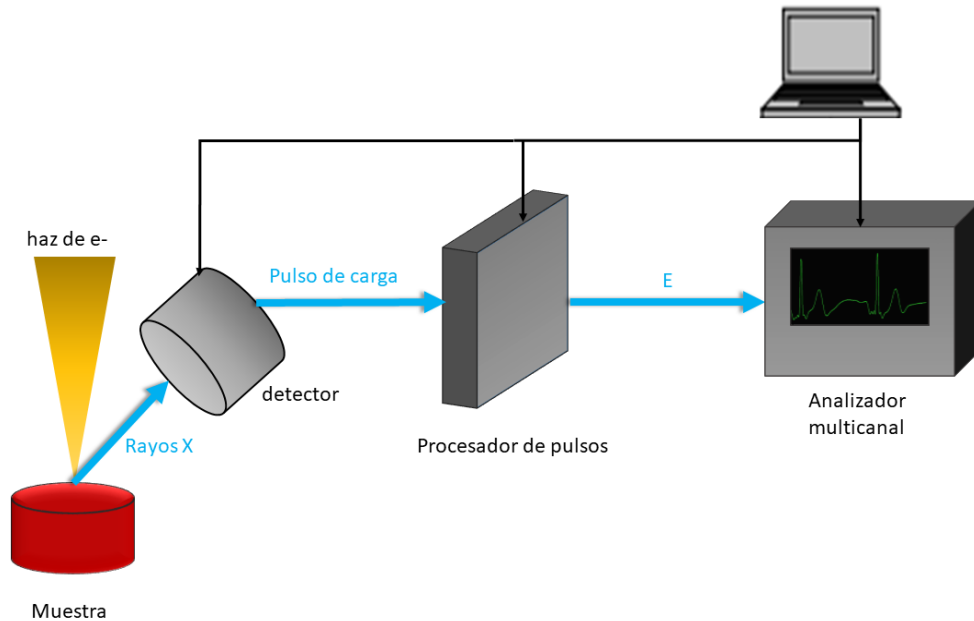


Figura 14. Interacción de los electrones con la materia.

Cuando un electrón a una determinada velocidad choca contra una muestra o compuesto, puede intimar con alguno de los electrones locales de los orbitales internos y acabar expulsándolo del átomo. Este electrón expulsado se le conoce como electrón secundario (el que lo ha expulsado es primario), y es fundamental en SEM. El electrón primario continúa su camino, pero algo distante y debilitado por el esfuerzo. El estudio de estos electrones endeble es la base de otra técnica de análisis cuyas siglas son EELS (Electron Energy Loss Spectrometry) [59]. Algunos picosegundos después de que el electrón secundario ha dejado una disponibilidad en el átomo (lo ha ionizado), otro de los electrones locales de algún orbital más externo se lanza a ocupar el lugar del excluido, más cerquita del núcleo. Ahora bien, esta reestructuración de plantilla deja al átomo con un sobrante de energía, que puede verse como el átomo produce un fotón de rayos X. Esto es, la base de la espectrometría por dispersión de energías de rayos X o XEDS (del inglés *X-Ray Energy Dispersive Spectrometry*). Sin embargo, puede encontrarse en diversos textos como EDS, EDX o XDS [60] [61].

La radiación realizada por este salto de electrones entre orbitales tiene una propiedad elemental para el tema que nos ocupa, y es que la energía de los fotones emitidos está directamente enlazada con el peso atómico del elemento emisor. Ya que la diferencia de energía entre orbitales incrementa según lo hace el peso atómico, debido principalmente al

incremento del nº de protones en el núcleo. De esta manera se puede asociar cada valor de energía emitida con un elemento de la tabla periódica, así que midiendo con un detector adecuado los fotones expulsados por la muestra se puede averiguar:

- a) por la energía de cada fotón, cual es el elemento que lo está realizando (análisis cualitativo).
- b) por el nº de fotones emitido de cada energía, la parte relativa de cada elemento (análisis cuantitativo).

Rayos-X característicos.

Como se ha visto, para generar un fotón de rayos-X se necesita expeler un electrón de alguno de los orbitales internos del átomo y que este hueco sea ocupado por alguno de los electrones de un orbital más externo. De cualquier modo, aunque antes se ha mencionado una energía característica para cada elemento atómico, la realidad es que se trata de un grupo de energías características para cada elemento. Si el electrón expulsado pertenecía al orbital K del átomo se consigue un rayo-X tipo “K”, pero si pertenecía al orbital L entonces será del tipo “L”, y asimismo los “M” se corresponden con el orbital M. Dentro de estos tipos generales existen subtipos. Si un electrón expulsado del orbital K es ocupado por un electrón del orbital L, tendremos un rayo-X tipo K_{α} , pero si es ocupado por un electrón del orbital M, entonces tendremos un rayo-X tipo K_{β} . Si un electrón expulsado del orbital L es ocupado por otro del orbital M, tendremos un rayo-X tipo L_{α} . A partir de aquí las cosas empiezan a complicarse un poco, ya que tenemos que considerar no sólo desde que suborbital procede el electrón sino también qué suborbital es el que “rellena”, ya que excepto en el orbital K, el resto se dividen en subniveles (3 para el L, 5 para el M, 7 para el N...). Así que, si un electrón expulsado del orbital K es ocupado por otro del orbital L3, tendríamos un rayo-X tipo $K_{\alpha 1}$, si es del orbital L2 sería del tipo $K_{\alpha 2}$, etc.

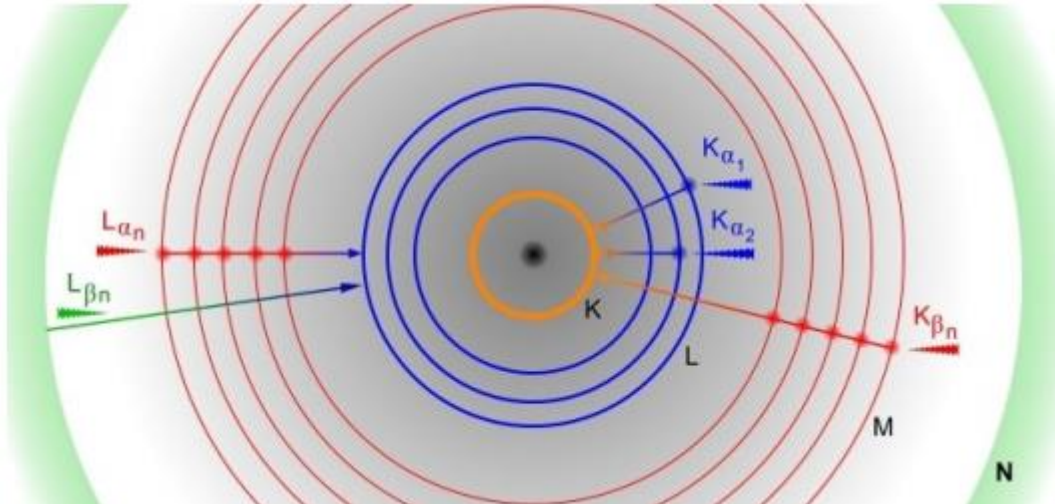


Figura 15. Cómo se producen algunos de los rayos-X más usuales.

Sin embargo, las diferencias energéticas entre suborbitales suelen ser tan pequeñas que no se tienen en cuenta, excepto para elementos pesados en los que el aumento del número de orbitales comienza a complicar el asunto. Atendiendo a su mayor intensidad y su mayor probabilidad de producirse, principalmente se tendrá en cuenta los rayos del tipo K y L (o L y M para los elementos de mayor número atómico) y los subtipos α y β [62].

2.3 Caracterización

- El QCM se analizó con un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JEOL JIB-4500 Dado que la cantidad de material zeolítico observable en el QCM es demasiado baja, solo se muestra un cristal representativo en la Fig. 16
- Resultados del análisis utilizando la espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) se presentan en la Fig. 17

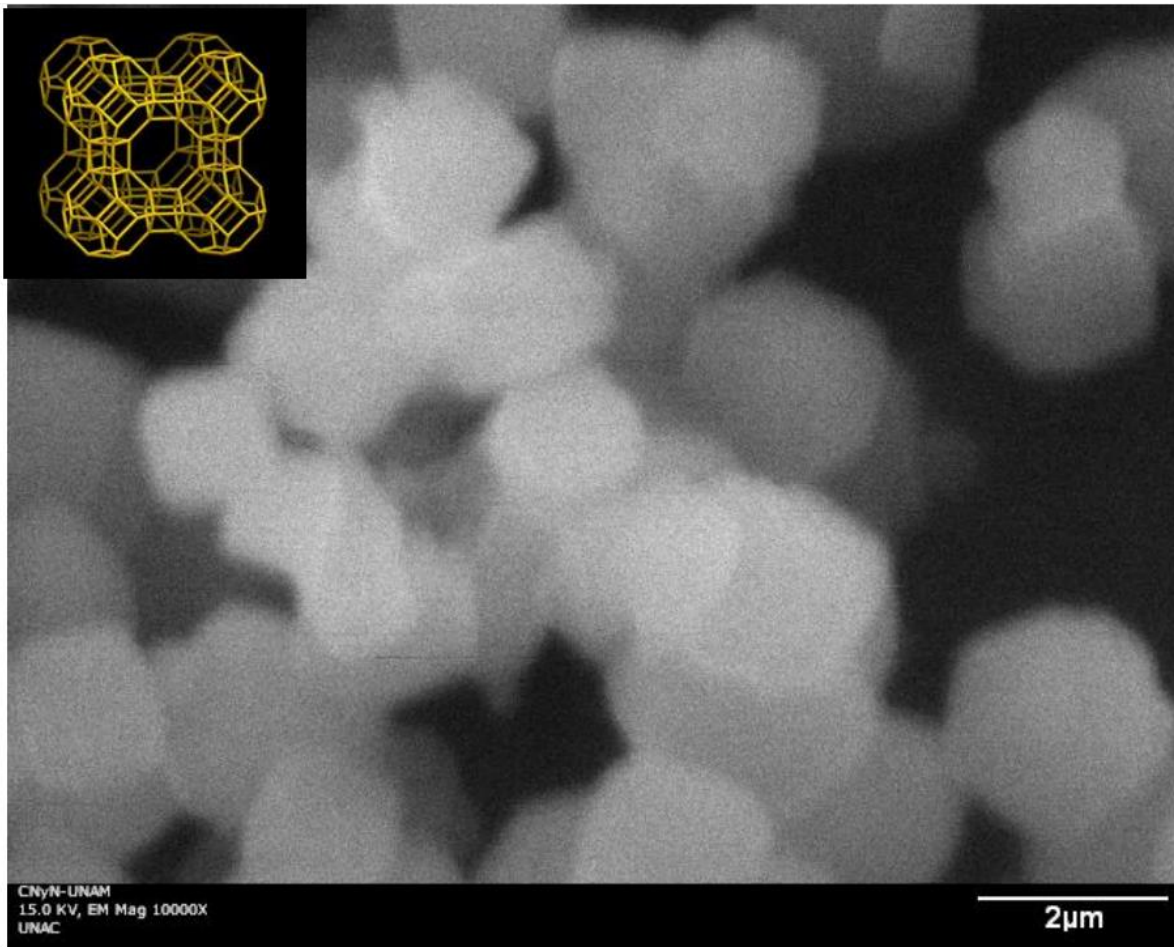


Figura 16. Morfología de la superficie de una QCM-A

- La composición elemental de QCM superficie de oro QCM-C (Au) y cuarzo QCM-C (SiO₂) se compara con el polvo de zeolita LTA A-P y la superficie QCM de oro QCM-A (Au) y cuarzo QCM-A (SiO₂)

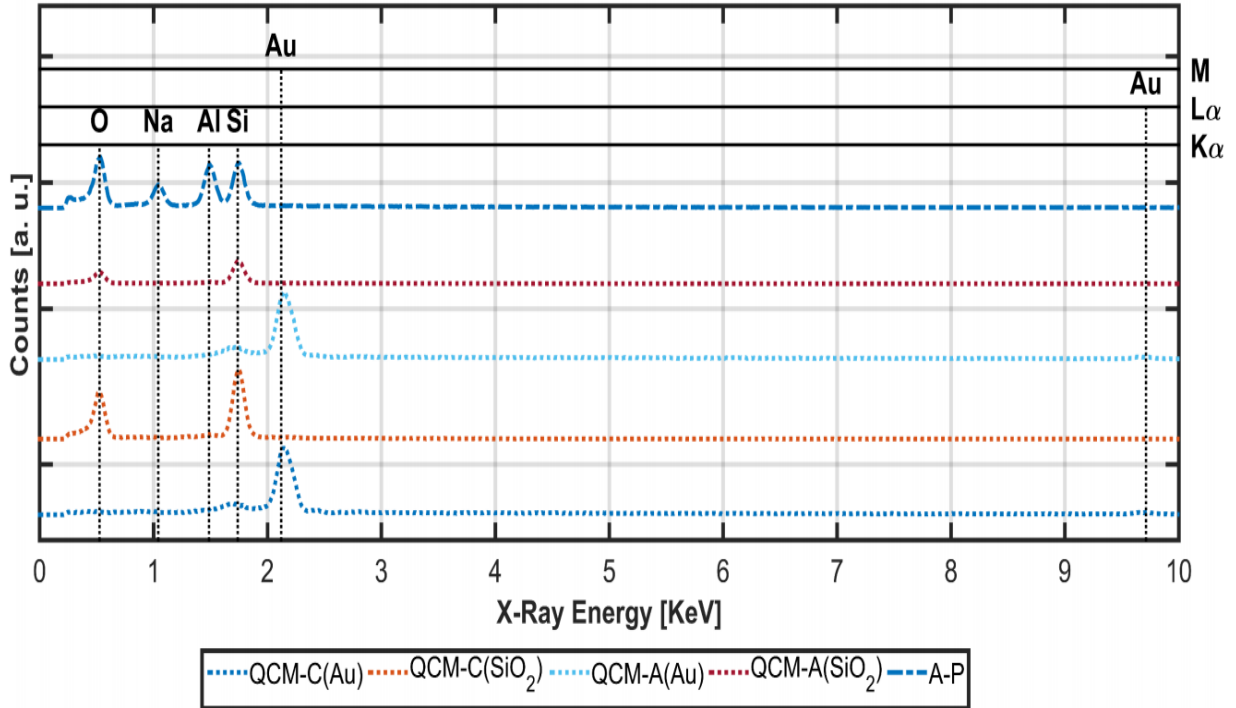


Figure 17. Análisis sobre la superficie limpia de una QCM, zeolita A (LTA) en polvo y QCM modificada con zeolita por EDS.

- Usando el equipo Philips X'pert MPD, el patrón de difracción de rayos X del polvo de zeolita como se obtiene La comparación entre XRD teórica y experimental se presenta en la Fig. 18

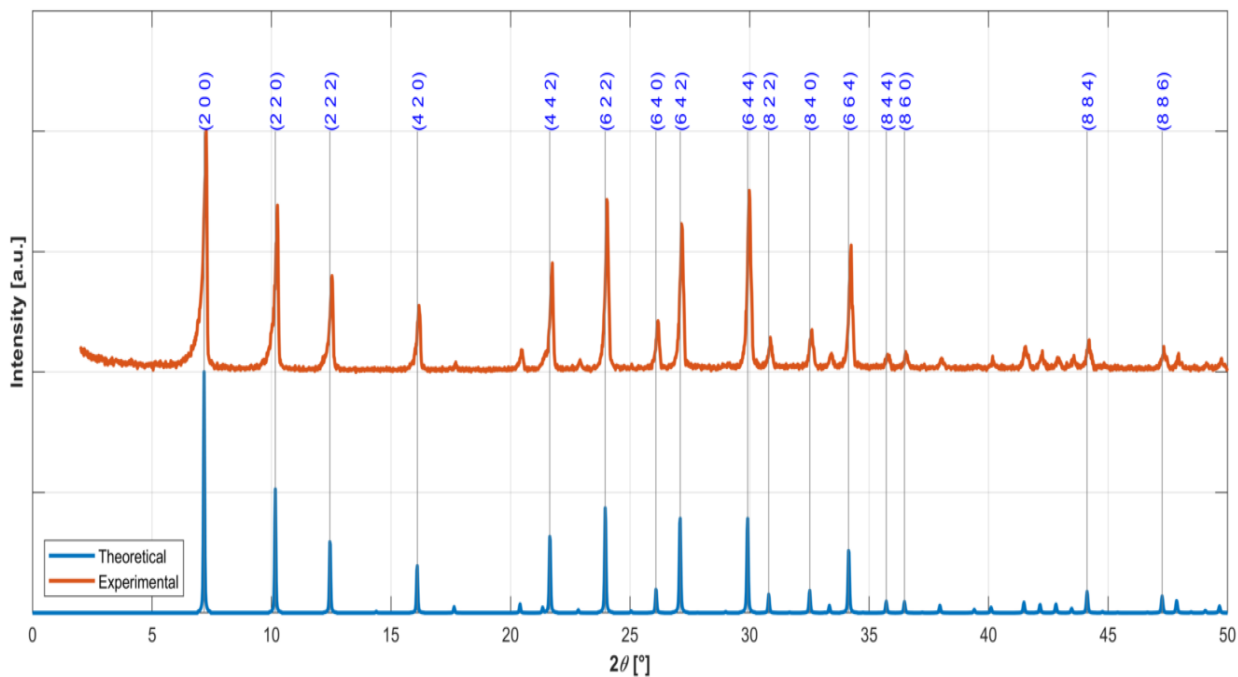


Figura 18. Análisis de zeolita en polvo por XRD

- El QCM se integró en un sistema de medición, donde las variaciones de frecuencia se registraron continuamente. Los elementos principales de dicho sistema se muestran en la Figura 19.

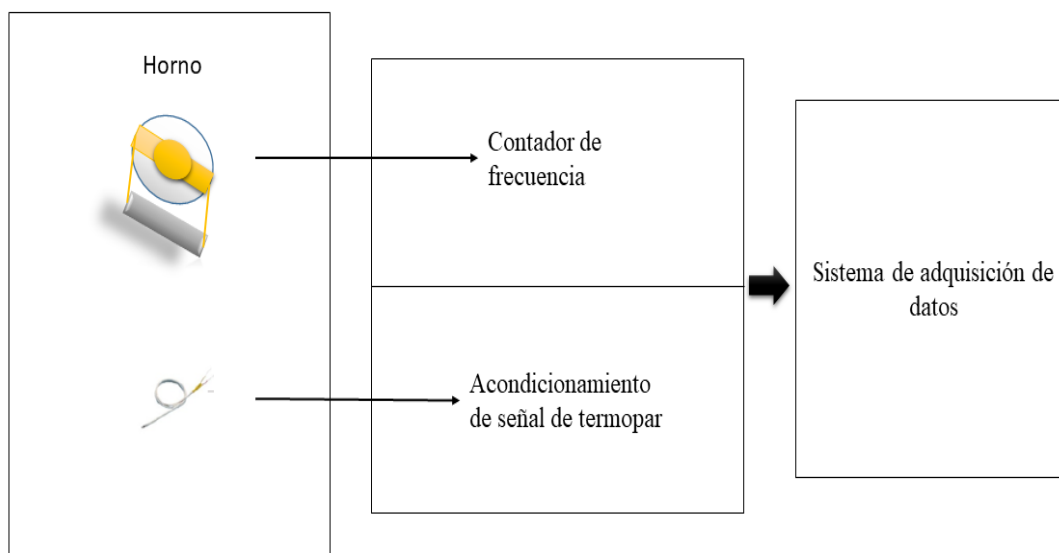


Figura 19. Elementos de un sistema de medición durante el experimento

- El contador de frecuencia implementa el principio de aproximaciones racionales [40], sus componentes principales se muestran en la Fig. 30.

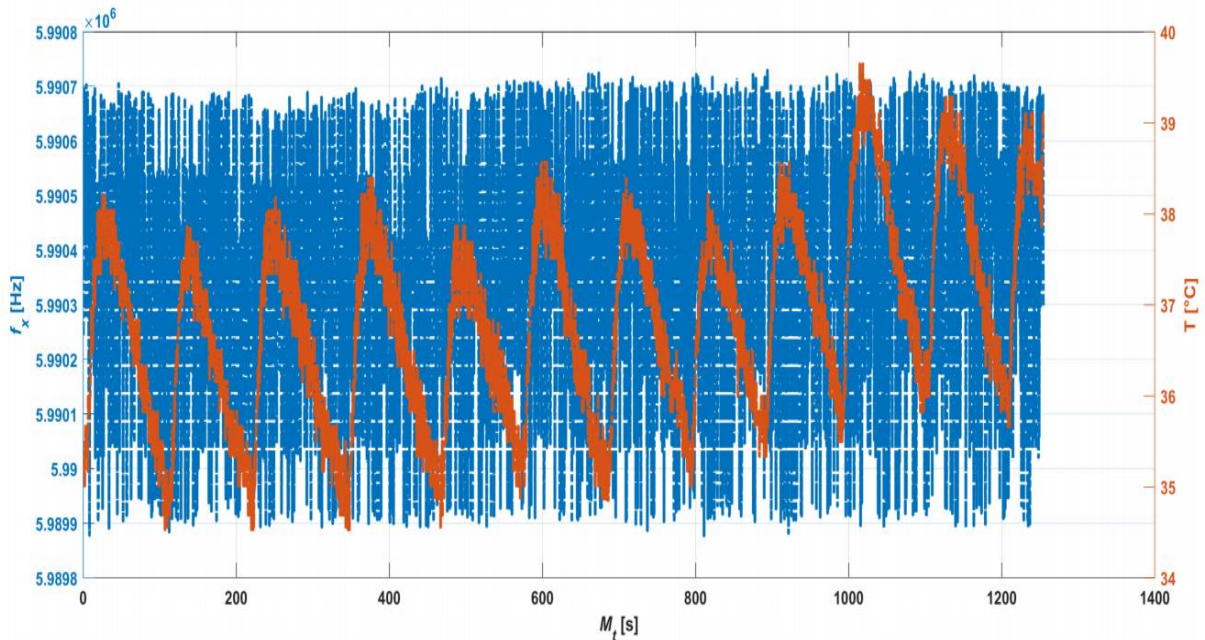


Figura 20. Señal de la temperatura constante sobre la QCM-A

- El QCM A y la señal de temperatura se muestran a temperatura constante, en la Fig. 20. En este caso, el valor de la frecuencia se mantiene entre 5.9899 y 5.9907 MHz, estos valores permiten calibrar el sistema de medición. La dependencia entre las variaciones de la frecuencia generada por el QCM y la temperatura se muestran en la Fig. 21. Dado que el QCM se modifica con un material capaz de adsorber agua, las variaciones de frecuencia están por encima de los valores típicos para los resonadores de cuarzo [63]. Esto permite concluir que las variaciones se deben a la adsorción / desorción de masa en la capa de zeolita.

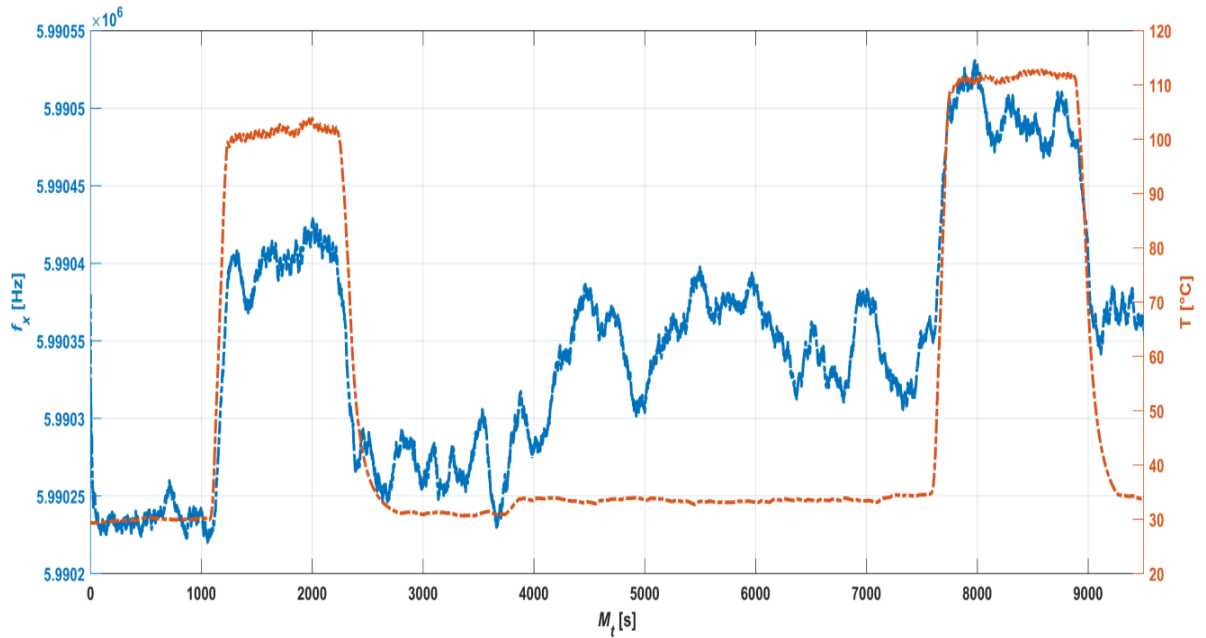
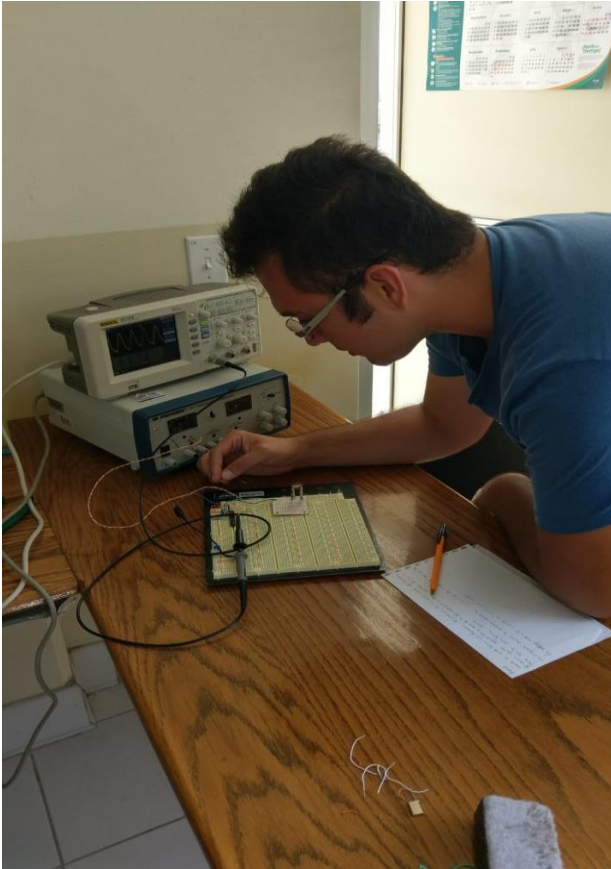


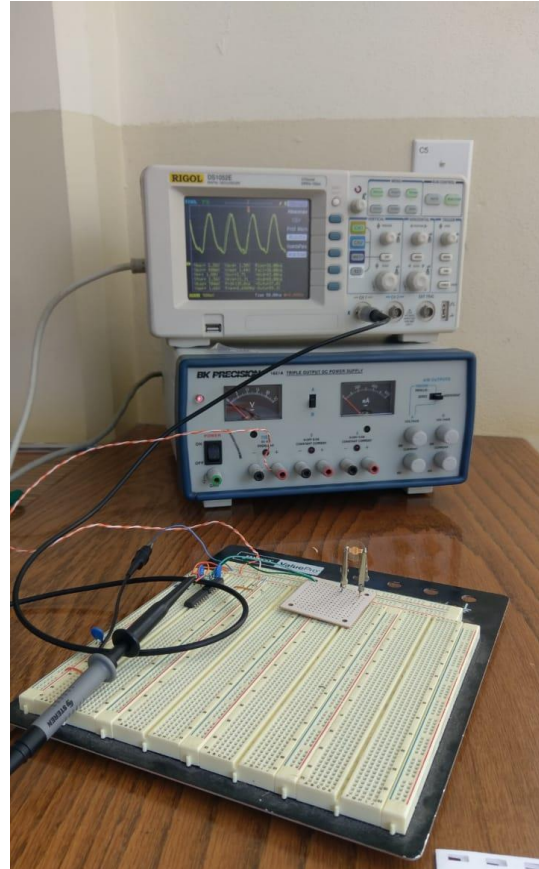
Figura 21. Variaciones de frecuencia durante los procesos de adsorción y desorción

2.4 Diseño experimental

Como parte experimental del proyecto, una QCM y un circuito resonador se conectaron a un protoboard. Se utilizó una fuente de 5 V de CD (corriente directa) y con un osciloscopio se observó la señal generada.



a



b

Figura 22. Procedimiento de conexión eléctrica de la microbalanza de cuarzo: a) realizando pruebas de funcionamiento sobre el proyecto, b) Señal eléctrica en la salida del resonador con una QCM conectada

Utilizando un sujetador especial, la QCM fue conectada a la base de pruebas (proto-board), en la Fig. 22 y 23 se muestra un ejemplo de cómo se conectaron los componentes; la señal obtenida durante la práctica se muestra en la Fig. 24.

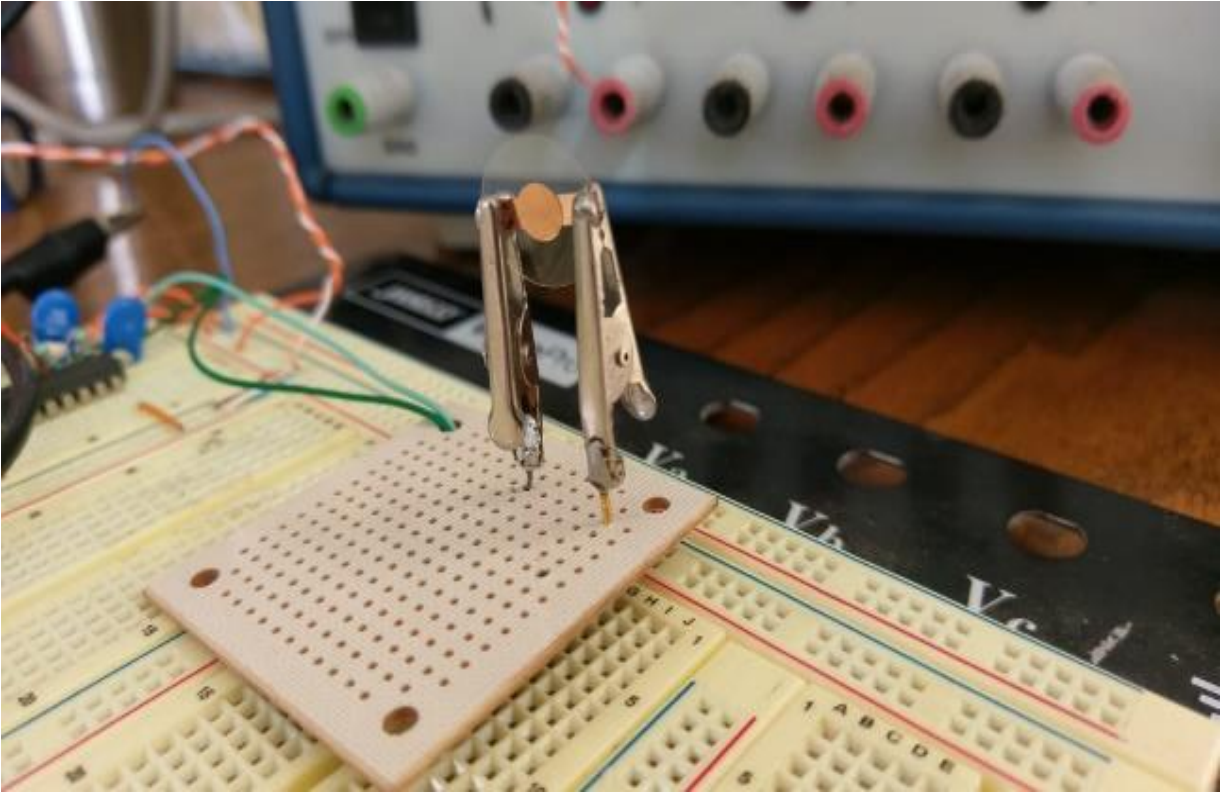


Figura 23. QCM conectada por medio de sujetadores especiales

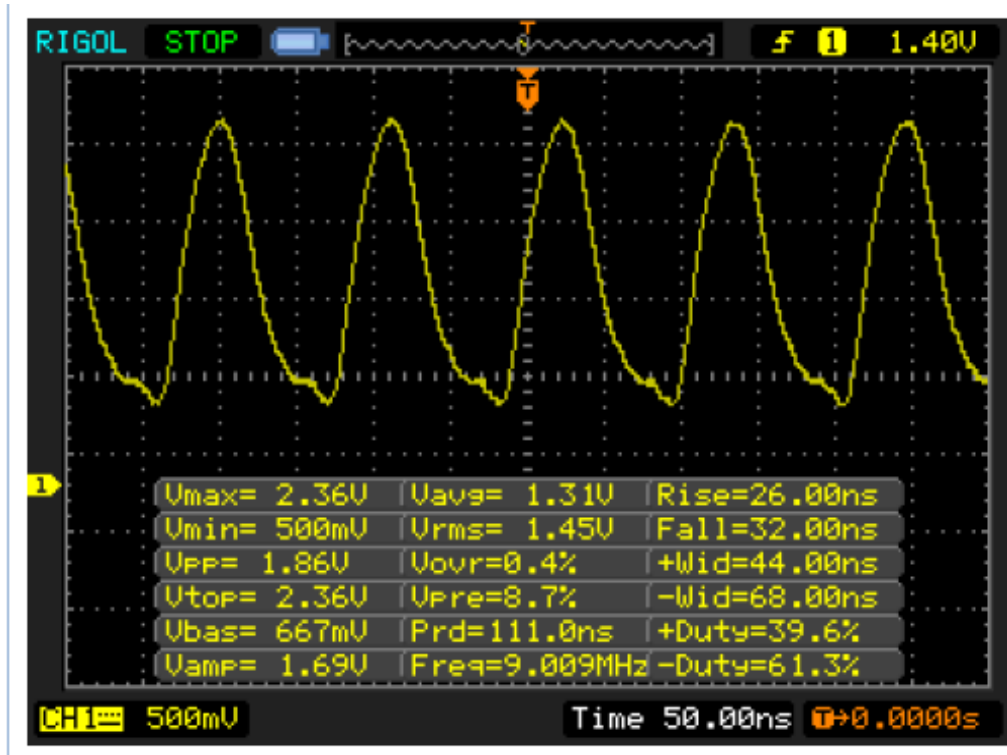


Figura 24. Señal generada por la QCM mostrada en el osciloscopio

En la Fig. 24 son mostrados los parametros electricos propios de la señal generada por la QCM. Se observa que la señal tiene una frecuencia de 9 MHz, lo cual es 1 MHz menor que el valor nominal. Esto se debe a las características del circuito TTL utilizado en el resonador.

Tambien se observa como el voltaje maximo es de 2.36 V y el voltaje minimo es de 500 mV. Esto significa que la señal generada en nivel bajo nunca no decrece a cero, mas bien es de 0.5 V, lo que generara una diferencia entre el valor maximo y minimo de 1.86 V, lo cual se comprueba al observar el valor del voltaje pico-pico (V_{pp}).

La señal generada puede ser utilizada con otros circuitos conectados en la salida del resonador mostrado.

Es necesario probar el sistema de medición con diferentes condiciones de operación, esto es, probar los límites de medición cuando se intenten detectar otras materias.

2.2.1 Desarrollo del sistema de instrumentación

Como parte del aporte al proyecto, se realizan dos circuitos para la generación del sistema de instrumentación con ayuda de una herramienta de simulación y diseño PROTEUS DESIGN SUITE 8.1 para elaborar PCB (del inglés *Printed Circuit Boards*) para la realización de un contador de frecuencia [64]. Entre los circuitos diseñados y generados se tienen: un contador hecho con el componente 74LS161 (Fig. 25) y uno con el 74LS393 (Fig. 26), los cuales pasaron por un periodo de simulación, desarrollo e impresión.

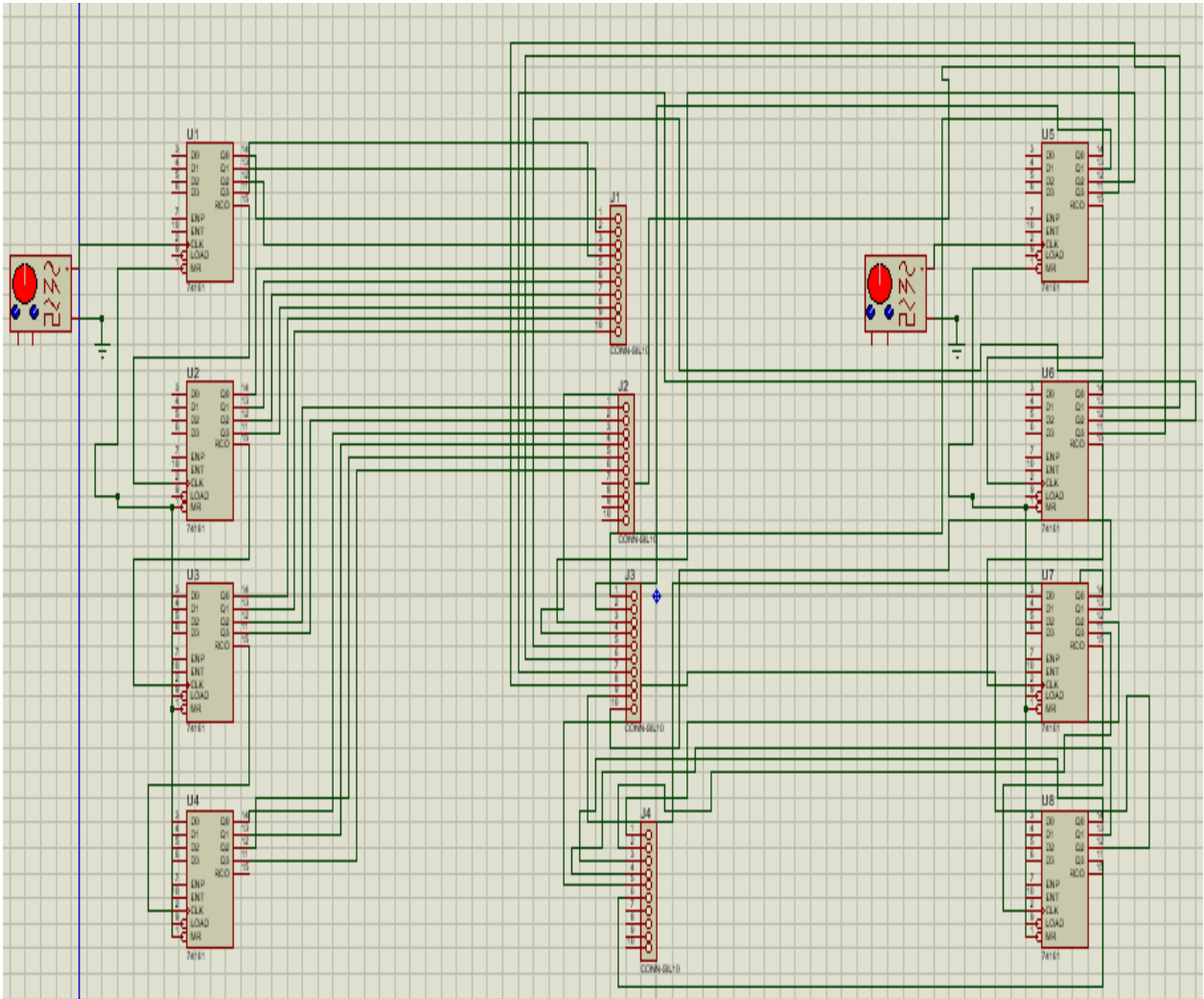


Figura 25. Esquema de un contador hecho con el componente 74LS161

Tal como se aprecia en la Fig. 25, se conectan entre si los contadores 74LS161, a través de las RCO los contadores cargaran sincrónicamente los datos de las entradas en los componentes para “encender” la transición del reloj. En este segmento se incluyen también “multipines” para la después hacer la conexión con otros circuitos en el sistema. Cada línea “verde” que se muestra en la Figura 25 representa un cable o pista que une un segmento de un componente con otro, de esta manera se hacen las conexiones entre los elementos que componen el circuito. Dentro de la Figura, se tienen además un par de osciladores que envían una señal conocida para llevar a cabo la simulación del circuito.

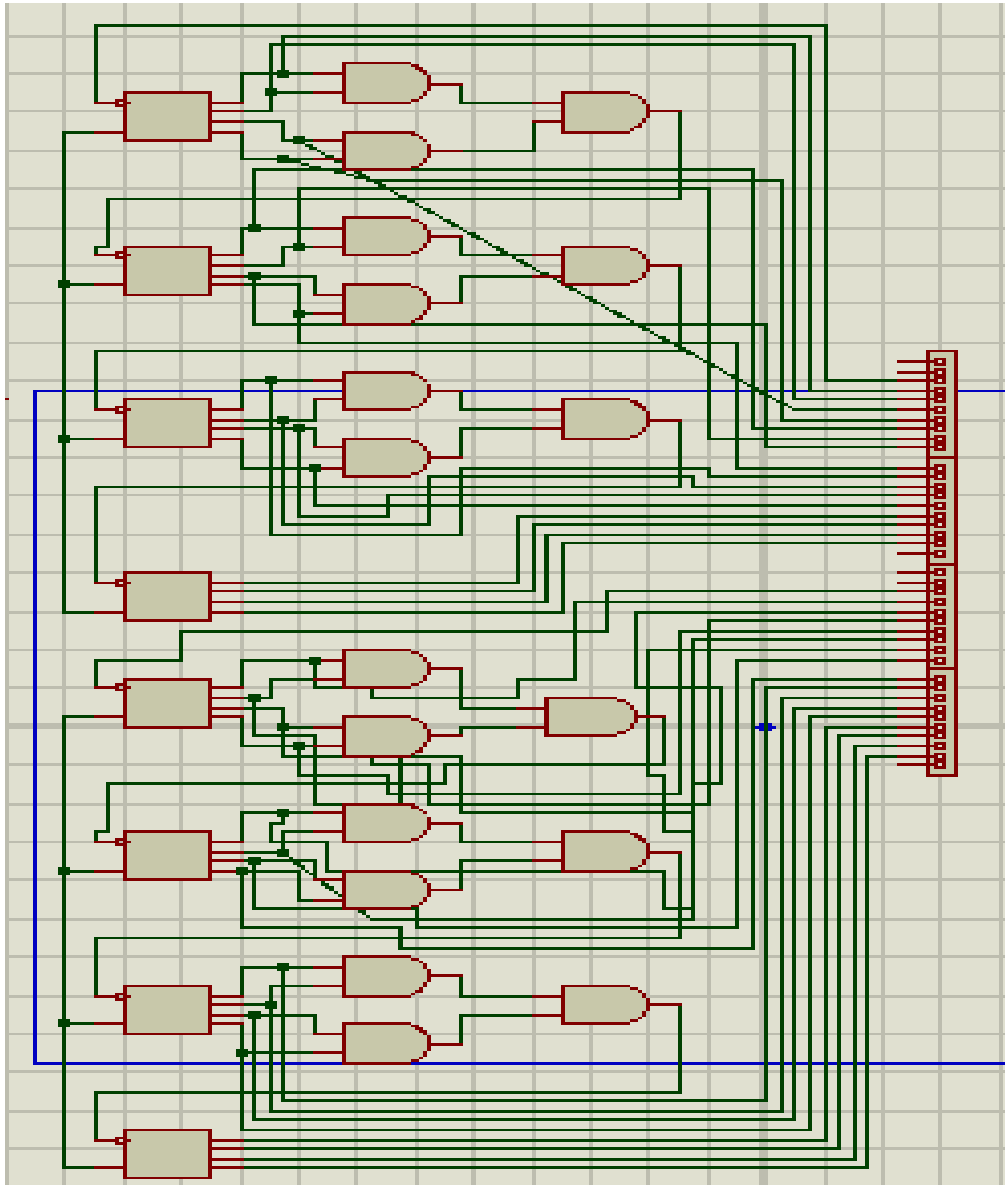


Figura 26. Esquema de un contador hecho con compuertas AND

En la Fig. 26 se tiene el circuito hecho con los contadores 74LS393, para cada uno de estos se conectan compuertas lógicas tipo “AND” con lo que se tendrán salidas de “1” solo cuando al momento de hacer comparaciones se logren coincidencias en “alto” de las salidas.

Su desarrollo en PROTEUS DESIGN SUITE 8.1 comprende de varias etapas (Fig. 28). Comenzando por la generación de un esquema del circuito donde se incluyen los componentes que conforman la PCB, posteriormente, se hace la simulación para comprobar

su función a través del programa. Por último, se diseña el PCB para su impresión (Fig. 29) con la finalidad de ir de acuerdo al tamaño de las conexiones (grosor de pines y cables) y a las dimensiones de la placa de cobre sobre la que se hace la impresión.

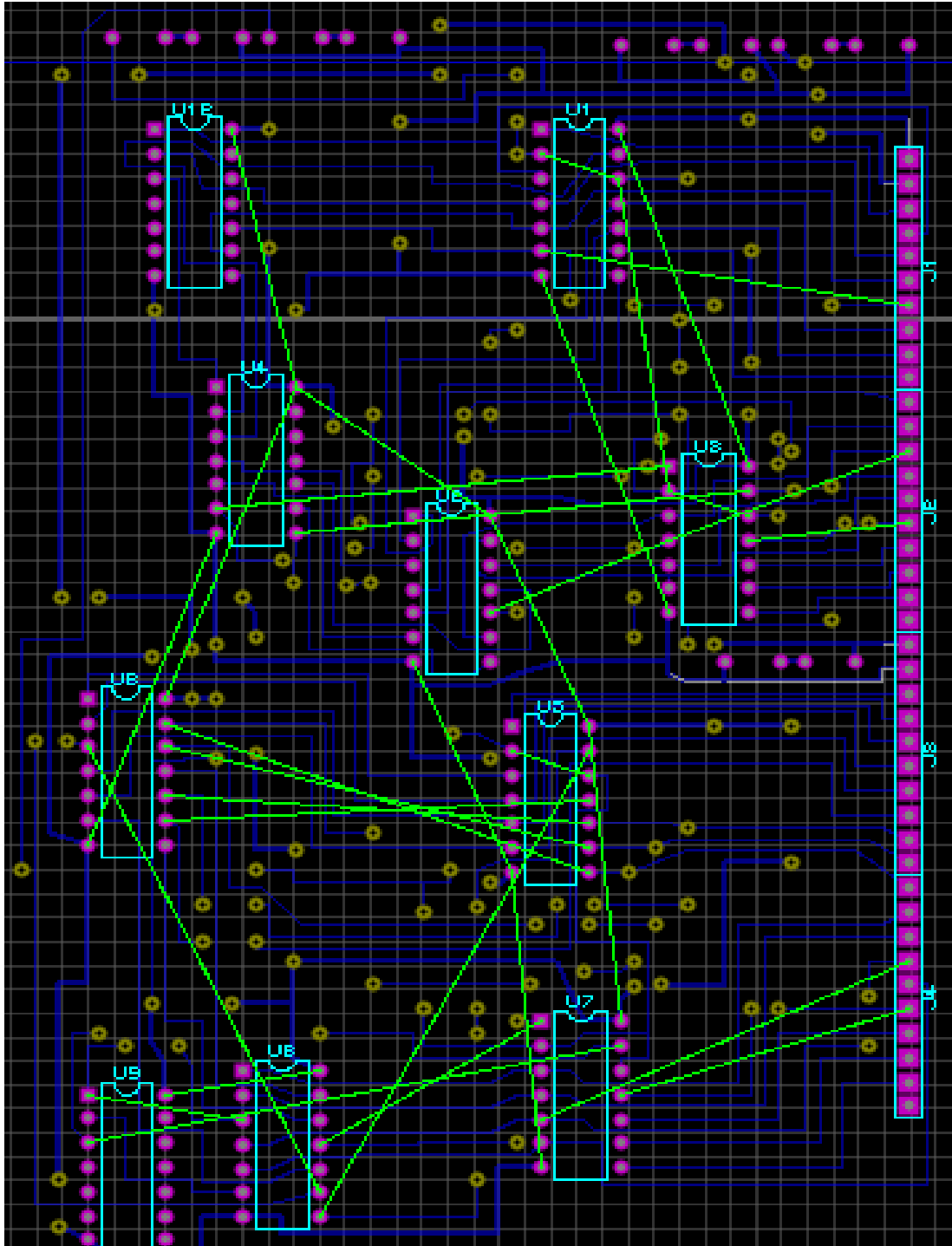


Figura 27. Diseño de PCB previo a su impresión

Siguiendo la Fig. 27, esta es la etapa donde se hace el pre-acomodo de los componentes previo al momento de su impresión; los círculos amarillos y morados representan los puntos donde se conectarán un cable o un pin del componente, para este caso se controlaron también el tamaño de estos puntos para evitar problemas al momento de incluir cada componente del circuito. El propio software tiene la función de realizar todas las conexiones posibles basadas en determinados patrones del programa, cuando el sistema no logra establecer conexión en algunas partes se tiene entonces una línea marcada de color verde.

Para la elaboración de PCB se requiere de varios pasos desde su diseño hasta la inclusión de sus componentes, por esto a continuación se explica a detalle mediante un diagrama de flujo sobre cómo generar PCB con la herramienta PROTEUS DESIGN SUITE 8.1.

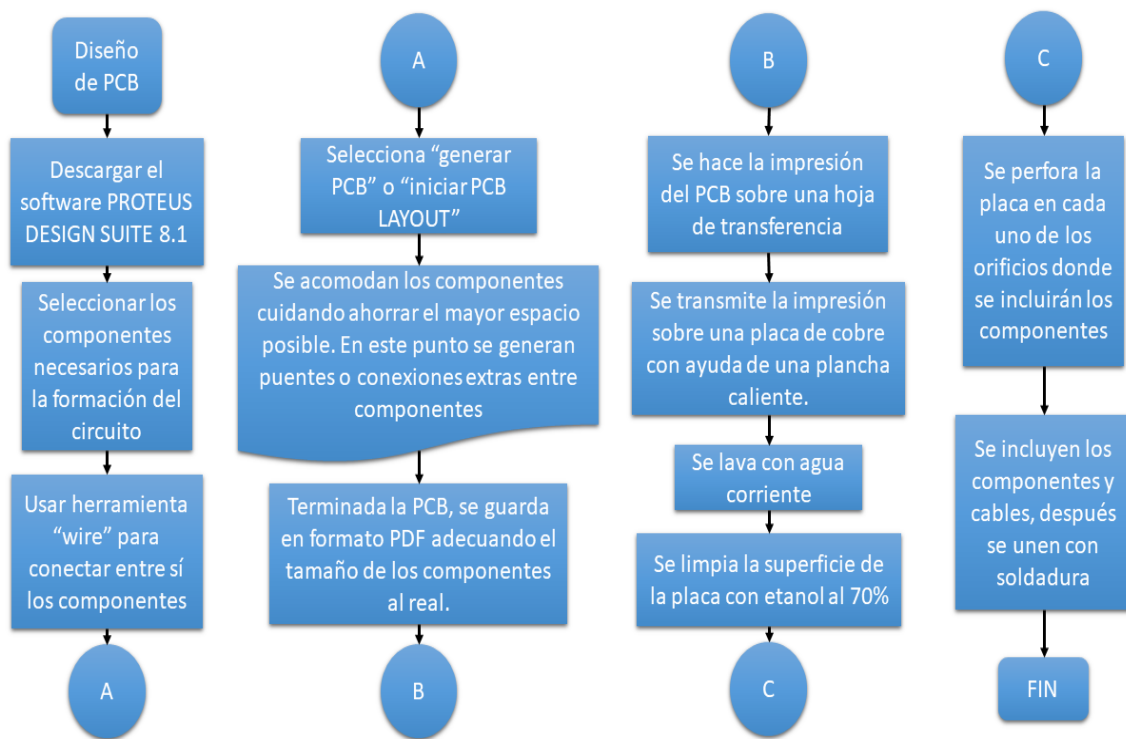


Figura 28. Diagrama de flujo, Diseño de PCB por PROTEUS 8.1

Siguiendo la figura anterior, detalles como no entrelazar las pistas que unen los componentes en el circuito y también cuidar su grosor son muy importantes para la generación de PCB, ya

que el no limpiar bien la superficie o hacer una buena impresión de tóner genera interferencia a la hora de querer conectar los componentes entre sí.

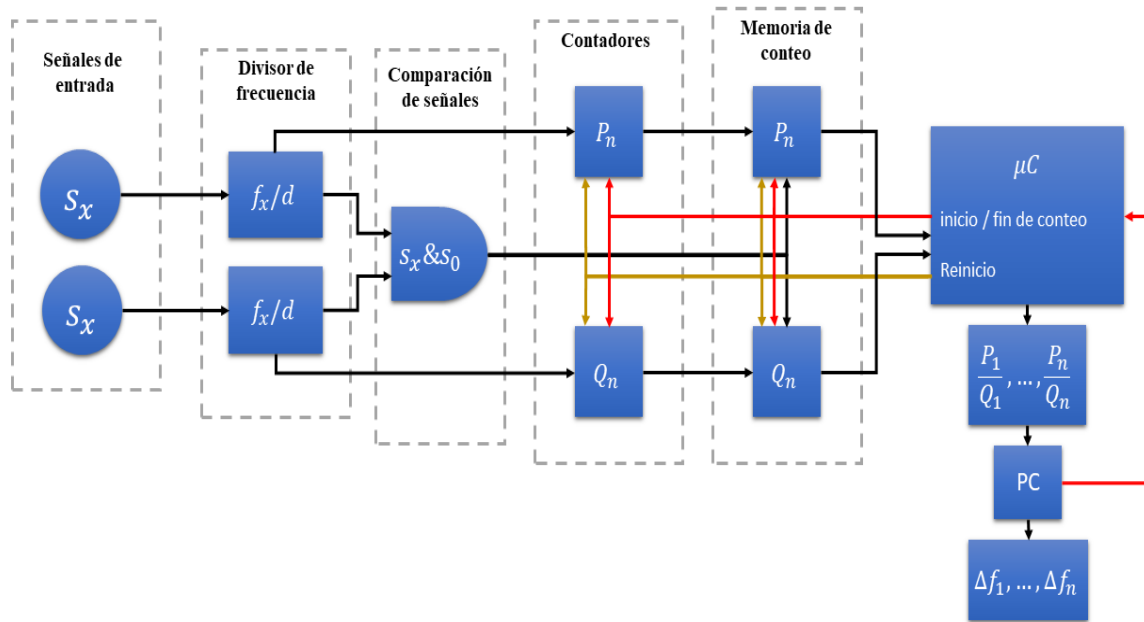


Figura 29. Diagrama de bloques del medidor de frecuencia

Siguiendo el diagrama de bloques del medidor de frecuencia, se explica a continuación los detalles de la Fig. 29.

Las señales de entrada son producidas por el sensor para el cual es de interés medir su cambio de frecuencia observado en el tiempo (S_x) y una señal de referencia generado por un oscilador con frecuencia conocida (S_0). Las señales de frecuencia entran a un divisor de frecuencia, donde la frecuencia de ambas señales es dividida por un número conocido. Después estas señales con frecuencia dividida entran a una compuerta lógica AND, donde si hay dos pulsos activos al mismo tiempo, generan un pulso de coincidencia en la salida de la compuerta. Este pulso estará en nivel alto, durante todo el tiempo que dure la coincidencia. Este proceso se mantiene siempre que el circuito donde este implementado el circuito este energizado y las señales de entrada sigan siendo generadas.

En general el funcionamiento del circuito se controla desde una computadora personal (PC), la cual controla el inicio y fin del proceso de medición. Es por esto, cuando la computadora

envía la señal de inicio de un proceso de medición, se genera una señal de “inicio de conteo” para el microcontrolador (μC). Esta señal de control activa los contadores y la memoria de conteo. Esto da lugar que cuando hay una coincidencia en la comparación de señales, después de la señal de inicio de conteo, el proceso de conteo de pulsos inicio. Cuando se detecta una coincidencia en el proceso de comparación de señales, los números de conteo en P_n y Q_n son almacenados en la memoria de conteo. Cuando las memorias de conteo están llenas, envían los datos al microcontrolador (μC). Cuando el microcontrolador recibe los datos detiene el proceso de conteo y envía los datos de las fracciones $P_1/Q_1, \dots, P_n/Q_n$ a la PC [25].

Capítulo 3. Resultados y discusiones

3.1 Análisis experimental del proyecto

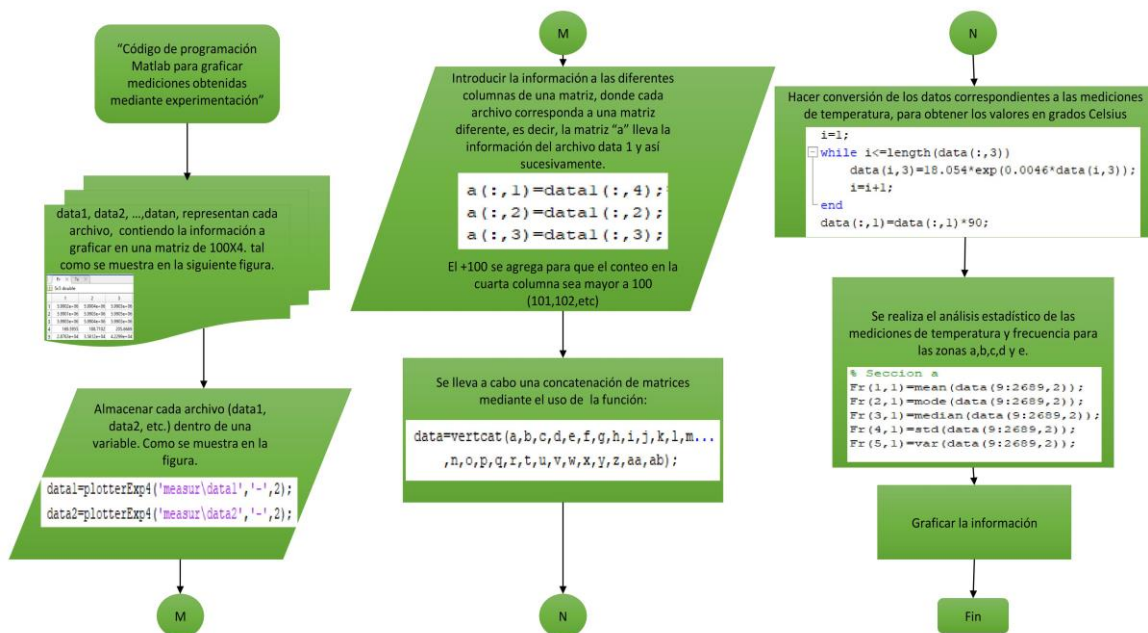


Figura 30. Partes del código de programación MATLAB para graficar las mediciones obtenidas.

A través de la herramienta de programación MATLAB R2018b se realiza el análisis estadístico de los datos obtenidos durante el proceso de medición. La Fig. 30 muestra el código de programación MATLAB por etapas, siguiendo de la siguiente manera:

1. Almacén de los datos sobre matrices de 100x4 generadas.
2. Asignación de cada columna de las matrices sobre un vector, representado por cada una de las letras del alfabeto. Ejemplo: matriz “data1” se dividió en los vectores: “a (: , 1)”, “a (: , 2)” y “a (: , 3)”
3. Concatenación de matrices, donde cada una de las matrices a, b, c, ..., n, se unen para formar una sola matriz de 11200x3.
4. Uso del ciclo “while” para la conversión de los datos de la columna 3 (medición de temperatura) a grados Celsius.
5. División de zonas (a, b, c, d y e). Donde cada una corresponde a un segmento del análisis de temperatura y frecuencia para el sistema de medición.
6. Generación de gráficas, donde se generan etiquetas y enmarcaciones para delimitar cada zona e información que corresponda a un análisis estadístico de los datos.

3.2 Análisis estadístico de los datos

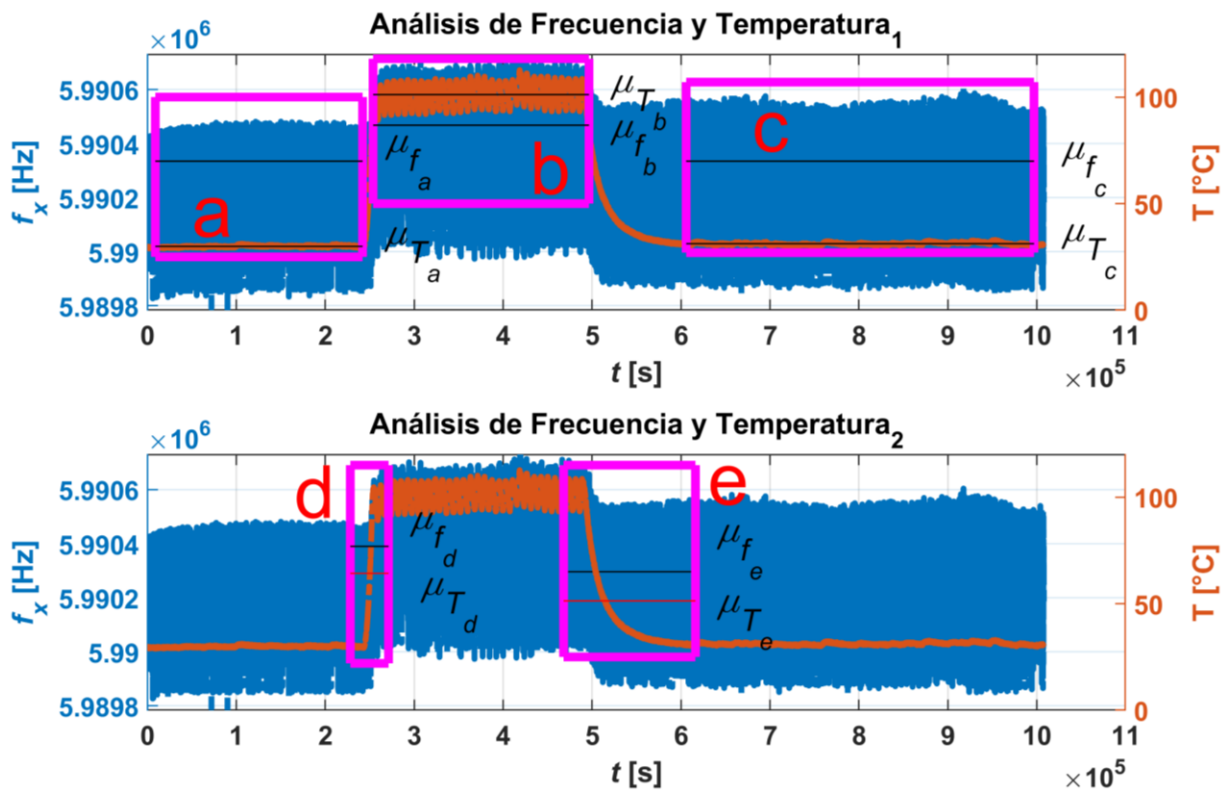


Figura 31. Proceso de medición de frecuencia generada por la microbalanza de cuarzo durante variaciones de temperatura.

En la Fig. 31, para los Análisis de Frecuencia y Temperatura, se definen μ_{f_x} [Hz] como la media de frecuencias y μ_{T_x} [°C] como la media de temperaturas para las zonas a,b,c,d y e.

En este experimento una microbalanza limpia de 6 MHz fue puesta dentro de un horno con temperatura regulable. Esto con el objetivo de observar las variaciones de frecuencia correspondientes a variaciones de temperatura, la temperatura varía en un intervalo desde temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) hasta 100 °C. La frecuencia y temperatura fueron medidas ininterrumpidamente durante todo el experimento.

De acuerdo con los datos mostrados en la Fig. 31, la frecuencia de la microbalanza tiene variaciones las cuales son atribuidas a las variaciones de temperatura; en general cinco zonas de interés pueden ser observadas: frecuencia generada a temperatura constante antes del incremento de temperatura (zona a), frecuencia generada durante el incremento y decremento de la temperatura (zona d, b y e respectivamente) y finalmente la frecuencia generada a temperatura constante después de las variaciones de temperatura (zona c).

En un sistema de medición, se tiene que sus propiedades estadísticas permiten hallar su media, moda y mediana como una medida de tendencia central y también su desviación estándar como la dispersión de los datos [65]. Calcular la media es obtener la medida central de los datos, la mediana permite identificar (para el caso en que no coincida con la media) si la información está sesgada, la moda es el dato más frecuente dentro del análisis de los datos y la desviación estándar la variación de los datos, es decir, la diferencia que hay entre las medidas obtenidas. Considerando lo anterior, se muestran también las incertidumbres de las mediciones hechas para la frecuencia y temperatura. [66] [67].

Como información adicional del análisis estadístico, se presentan a continuación los datos mostrados en la tabla 1 y 2 para el análisis estadístico de las mediciones de frecuencia y temperatura respectivamente.

Análisis estadístico	Zonas				
	Zona "a" [Hz]	Zona b	Zona c	Zona d	Zona e
Media	5990235.4960	5990400.0490	5990270.7264	5990293.9176	5990296.5733
Moda	5990235.4960	5990338.1643	5990521.3270	5990262.1354	5990521.3270
Mediana	5990252.5476	5990418.6256	5990311.4187	5990319.4579	5990319.6638
Desv. estándar	169.5955	188.7102	205.6669	190.5925	207.2758
Varianza	28762.6462	35611.5555	42298.8824	36325.5012	42963.2576

Tabla 1. Datos relacionados al Análisis estadístico de frecuencias para las zonas a, b, c, d y

e.

Análisis estadístico	Zonas				
	Zona a	Zona b	Zona c	Zona d	Zona e
Media	29.9154	101.1501	31.2021	64.2190	51.3277
Moda	29.6709	106.5876	31.2109	30.0832	31.0677
Mediana	29.9451	101.7956	31.2109	30.0832	37.1724
Desv. estándar	0.3998	5.0008	0.5414	32.5639	26.2544
Varianza	0.1598	25.0081	0.2931	1060.4074	689.291230

Tabla 2. Datos relacionados al Análisis estadístico de temperaturas para las zonas a, b, c, d

y e.

En particular, en la Fig. 32 se aprecia la zona 'a' y su análisis estadístico correspondiente, tal como se muestra en la figura, se tiene que la desviación estándar está alejada de la media; por lo que existe una variación entre las medidas obtenidas. En la Fig. 32 inciso 'b' se tiene una histograma del análisis de frecuencia (inciso 'a'), con lo que se presentan la proporción del conjunto de frecuencias medidas en cada una de las clases [68] [69]; para el inciso 'c' no

se tiene un conjunto grande de datos, por lo que la desviación estándar se halla cerca del promedio de la información.

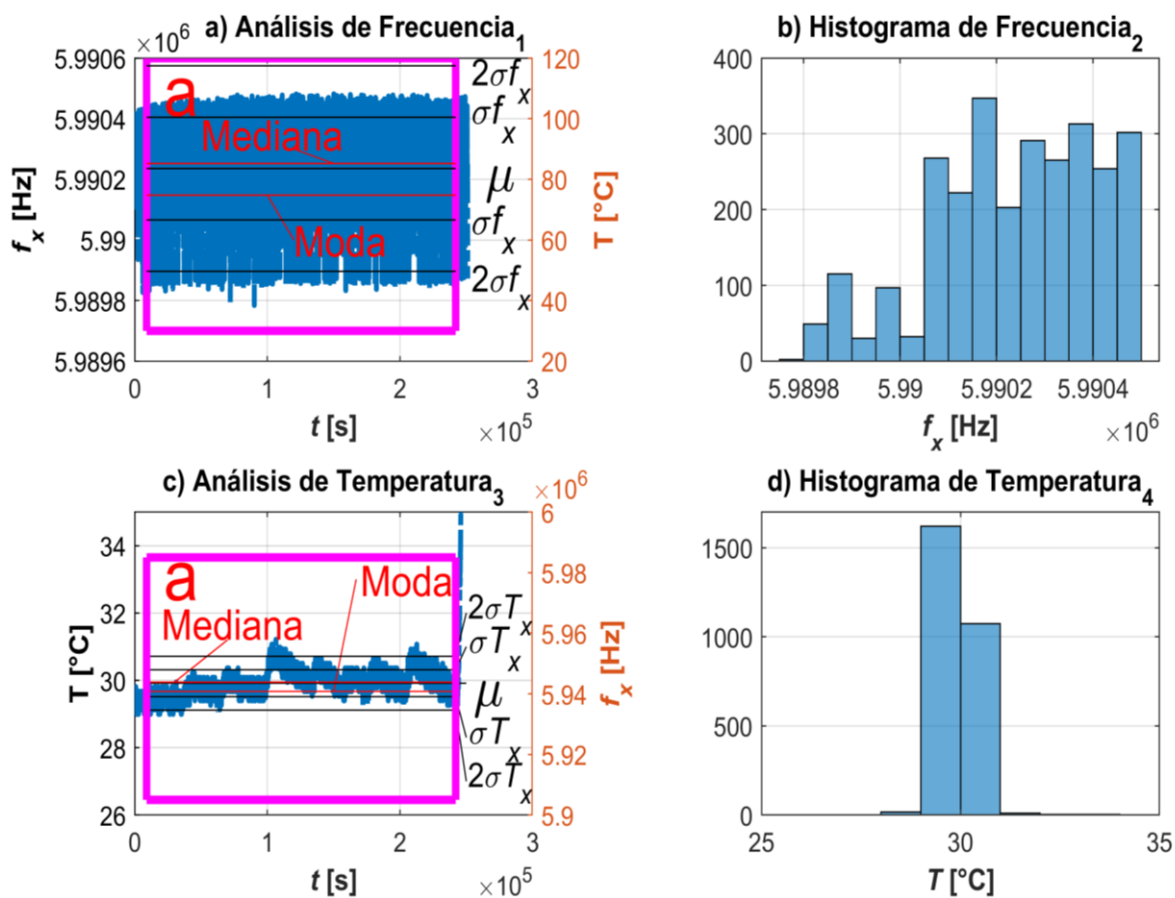


Figura 32. Análisis estadístico de zona a: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.

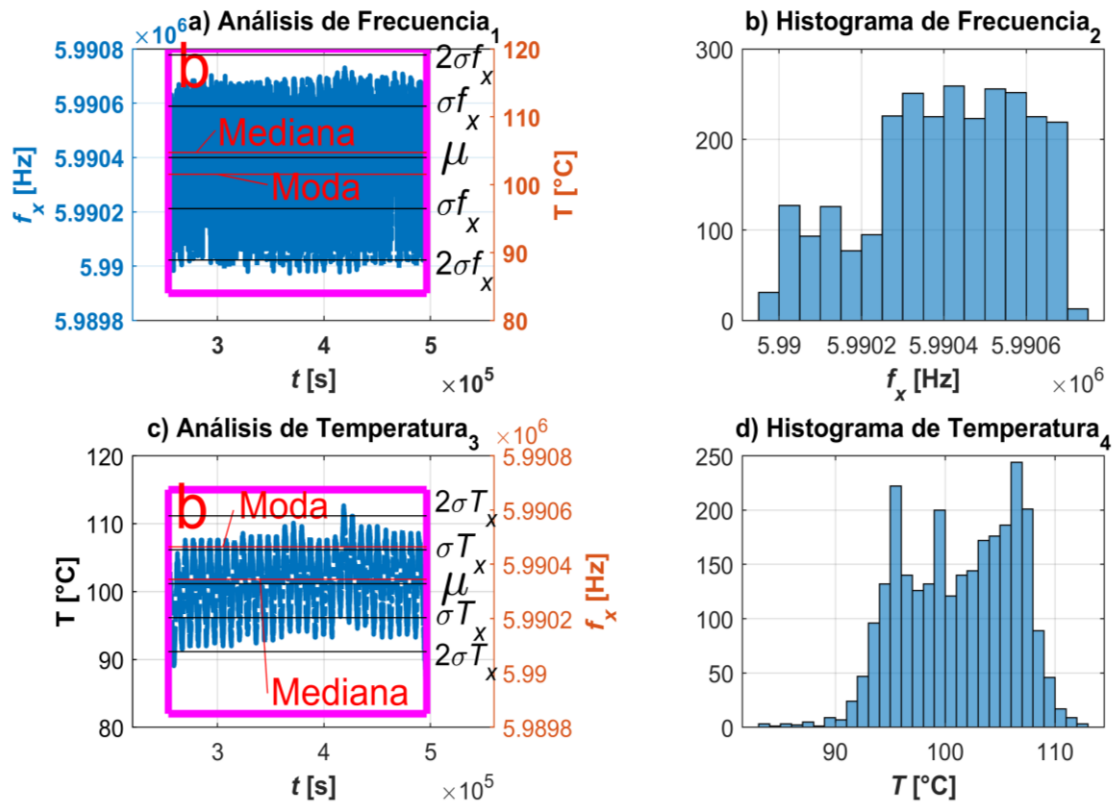


Figura 33. Análisis estadístico de zona b: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.

Dentro de la Fig. 33 se aprecia la zona 'b', para los incisos 'a' y 'b' tanto la mediana como el histograma muestran un sesgo de los datos hacia el lado derecho del conjunto, es decir, aquellos que están por encima de la media. De la misma manera, en la Fig. 33, el sesgo esta hacia la derecha, tal como muestra la mediana y el histograma de los incisos 'a' y 'b' de la figura respectivamente, para el análisis de frecuencia. Dentro de la Fig. 34 (zona 'c') se aprecia en los incisos 'c' y 'd' una posible simetría debido a los valores cercanos entre la mediana y la media, los histogramas presentados para los incisos 'b' y 'd' muestran un sesgo hacia la derecha e izquierda respectivamente.

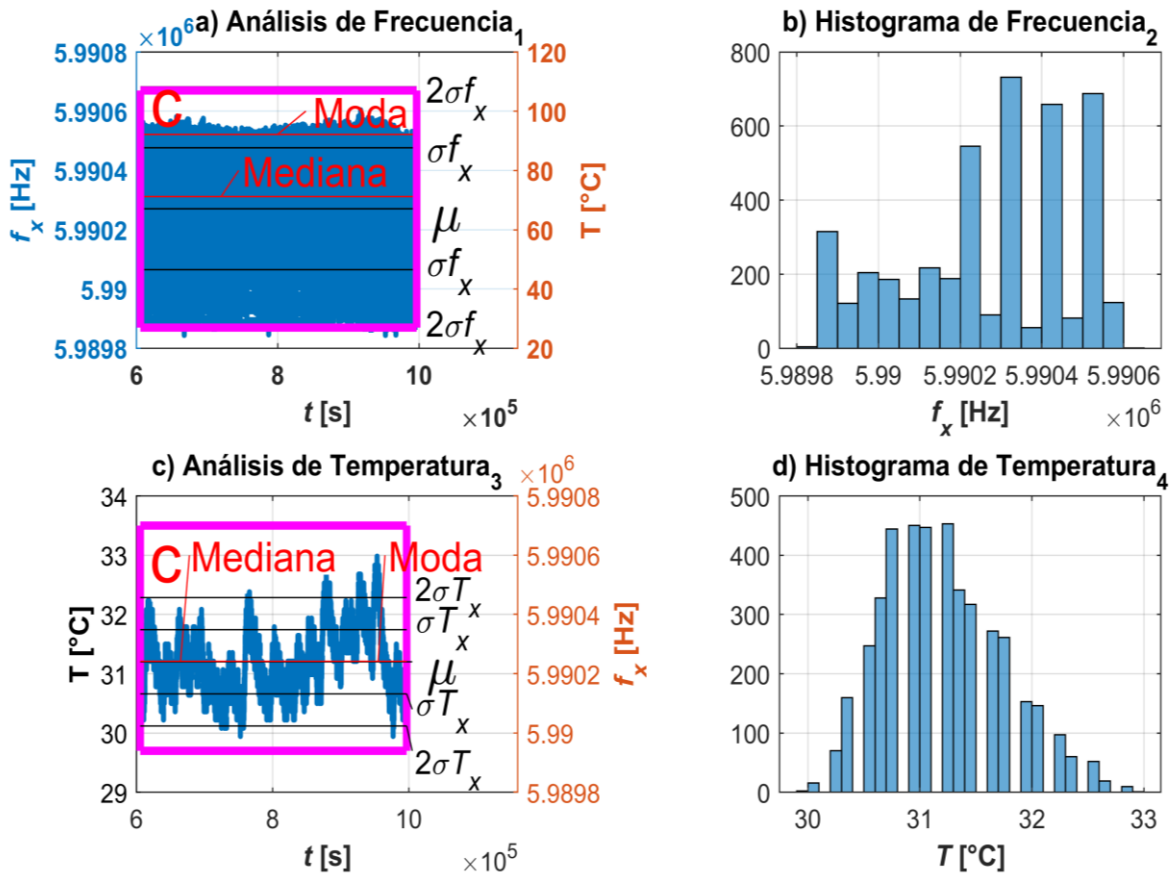


Figura 34. Análisis estadístico de zona c: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.

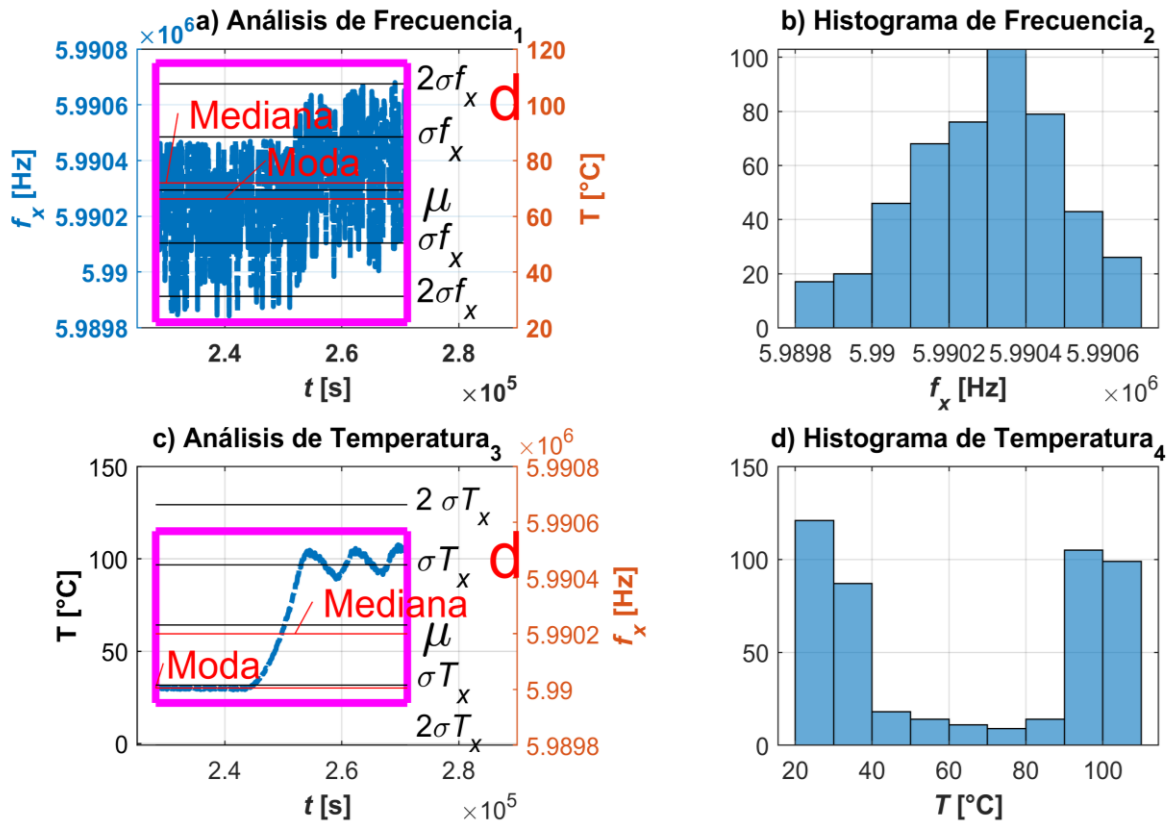


Figura 35. Análisis estadístico de zona d: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.

Para la Fig. 35 (zona 'd') el análisis de frecuencia y temperatura presentan un ligero incremento de sus valores debido al aumento de la temperatura dentro del horno. En el inciso 'c', su desviación estándar señala que hay mayor dispersión dentro del conjunto de datos de la zona 'd'. Las fluctuaciones mostradas en el inciso 'd' de la figura son una representación de la dispersión que se muestra en el análisis de temperatura (inciso 'c'). Para la Fig. 36 (zona 'e'), tanto en los análisis de frecuencia como de temperatura se muestran fluctuaciones sobre los histogramas como un decremento para el conjunto de datos. Por lo que también se aprecia una desviación estándar distanciada de la media del conjunto de datos.

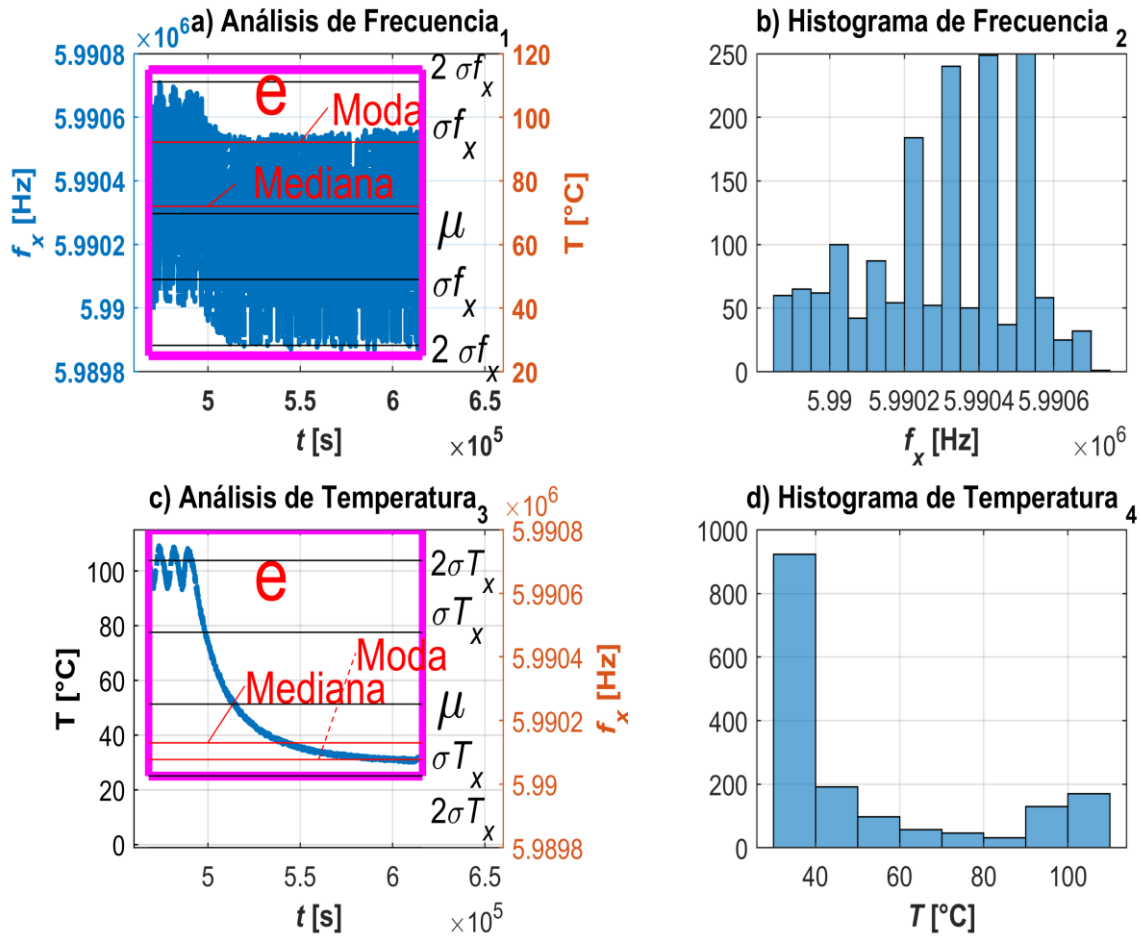


Figura 36. Análisis estadístico de zona f: a) Análisis de Frecuencia, b) Histograma de Frecuencia, c) Análisis de Temperatura, d) Histograma de Temperatura.

Dentro del análisis estadístico de los datos mostrados anteriormente, se hace uso de la desviación estándar para la caracterización del sistema de medición. Como incertidumbre para el análisis estadístico de los datos, se tiene que el valor medido de frecuencia f_x tiene una incertidumbre máxima de $\pm 5.990335 \times 10^6 \text{ Hz}$ y mínima $\pm 435.496034 \text{ Hz}$ de . Para la temperatura T_x se tiene una incertidumbre máxima de $\pm 1.2955 \text{ }^\circ\text{C}$ y mínima de $\pm 1.0522 \text{ }^\circ\text{C}$ considerando la información recabada.

La siguiente ecuación corresponde a la manera correcta de expresar la incertidumbre

$$x = \bar{x} \pm \delta x \quad (10)$$

Donde x es el valor reportado, \bar{x} es el valor medido (media) y δx es el error de la medición.

De acuerdo a los resultados de la incertidumbre, el análisis para el cálculo de la incertidumbre se basa en que las mediciones tienen muchos valores repetidos, por lo que el procedimiento del cálculo de la incertidumbre va siguiendo la fórmula [70].

$$\delta x_{max} = |\bar{x} - x_{max}| \quad (11)$$

$$\delta x_{min} = |\bar{x} - x_{min}| \quad (12)$$

Para obtener la máxima incertidumbre:

$$x = \bar{x} \pm \delta x_{max} \quad (13)$$

y la mínima incertidumbre:

$$x = \bar{x} \pm \delta x_{min} \quad (14)$$

Se hizo uso experimental del principio de aproximaciones racionales, su implementación teórica generó una frecuencia en el sistema de medición, cuyo uso está destinado a los sensores en el dominio de frecuencia. El funcionamiento del sistema se valoró utilizando una QCM expuesta a temperatura controlada. Como resultado, la frecuencia generada por el QCM, el tiempo de medición para cada proceso de medición y el constante monitoreo de la temperatura de exposición muestran cómo el sistema de medición permite cuantificar la frecuencia generada por el sensor y en poco tiempo.

Capítulo 5. Conclusión del proyecto

- En este trabajo se muestra un sensor que reacciona a la humedad ambiental. El sensor está hecho de un QCM modificado con zeolita LTA.
- El análisis SEM, EDS y XRD ilustra que los cristales en la superficie QCM corresponden al material esperado.
- Experimentalmente, se comprobó que la frecuencia generada por QCM-A estaba cambiando de acuerdo con los procesos de adsorción y desorción inducidos térmicamente.

Referencias

- [1] «Biosensors in clinical chemistry», *Clinica Chimica Acta*, vol. 334, n.º 1-2, pp. 41-69, ago. 2003.
- [2] «Development of human IgE biosensor using Sezawa-mode SAW devices», *Current Applied Physics*, vol. 14, n.º 4, pp. 608-613, abr. 2014.
- [3] İ. Karamollaoğlu, H. A. Öktem, y M. Mutlu, «QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)», *Biochemical Engineering Journal*, vol. 44, n.º 2-3, pp. 142-150, may 2009.
- [4] R. A. Weinstein, «Nosocomial infection update.», *Emerg Infect Dis*, vol. 4, n.º 3, pp. 416-420, 1998.
- [5] P. Sun, Y. Jiang, G. Xie, X. Du, y J. Hu, «A room temperature supramolecular-based quartz crystal microbalance (QCM) methane gas sensor», *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 141, n.º 1, pp. 104-108, ago. 2009.
- [6] L. Sartore, M. Barbaglio, L. Borgese, y E. Bontempi, «Polymer-grafted QCM chemical sensor and application to heavy metal ions real time detection», *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 155, n.º 2, pp. 538-544, jul. 2011.
- [7] «An extended Butterworth Van Dyke model for quartz crystal microbalance applications in viscoelastic fluid media - IEEE Journals & Magazine». [En línea]. Disponible en: <https://ieeexplore.ieee.org/document/949746>. [Accedido: 15-mar-2019].
- [8] G. Sauerbrey, «Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung», *Z. Physik*, vol. 155, n.º 2, pp. 206-222, abr. 1959.
- [9] S. Malhotra, A. Verma, N. Tyagi, y V. Kumar, «BIOSENSORS: PRINCIPLE, TYPES AND APPLICATIONS», vol. 3, n.º 2, p. 6, 2017.
- [10] P. W. Walton, M. E. Butler, y M. R. O'Flaherty, «Piezoelectric-based biosensors», *Biochemical Society Transactions*, vol. 19, n.º 1, pp. 44-48, feb. 1991.
- [11] G. Pang y X. Wang, «Amplification systems of weak interaction biosensors: applications and prospects», *Sensor Review*, vol. 35, n.º 1, pp. 30-42, ene. 2015.
- [12] R. P. H. Kooyman y L. M. Lechuga, «Immunosensors based on total internal reflectance», en *Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food, and the Environment*, CRC Press, 1997.

- [13] L. Raleigh, «Quartz piezoelectricity», *Pacy, DJ (1960). Vacuum*, vol. 9, p. 261, 1885.
- [14] J. Curie y P. Curie, «An oscillating quartz crystal mass detector», *Rendu*, vol. 91, pp. 294-297, 1880.
- [15] C. Lu y A. W. Czanderna, *Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances*. Elsevier, 2012.
- [16] V. Avramescu *et al.*, «Surface Acoustic Wave devices and their sensing capabilities», en *2009 International Semiconductor Conference*, 2009, vol. 1, pp. 27-36.
- [17] «Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications», *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 14, n.º 8-9, pp. 663-670, dic. 1999.
- [18] W. Tomasi, *Sistemas de comunicaciones electrónicas*. Pearson Educación, 2003.
- [19] I. Sasaki, H. Tsuchiya, M. Nishioka, M. Sadakata, y T. Okubo, «Gas sensing with zeolite-coated quartz crystal microbalances—principal component analysis approach», *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 86, n.º 1, pp. 26-33, ago. 2002.
- [20] «New approach for the QCM sensors characterization», *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 207, pp. 1-9, mar. 2014.
- [21] A. Arnau, «A Review of Interface Electronic Systems for AT-cut Quartz Crystal Microbalance Applications in Liquids», *Sensors*, vol. 8, n.º 1, pp. 370-411, ene. 2008.
- [22] A. Arnau, T. Sogorb, y Y. Jimenez, «A new method for continuous monitoring of series resonance frequency and simple determination of motional impedance parameters for loaded quartz-crystal resonators», *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 48, n.º 2, pp. 617-623, mar. 2001.
- [23] G. García-Martínez *et al.*, «Development of a Mass Sensitive Quartz Crystal Microbalance (QCM)-Based DNA Biosensor Using a 50 MHz Electronic Oscillator Circuit», *Sensors*, vol. 11, n.º 8, pp. 7656-7664, ago. 2011.
- [24] A. L. Smith y Hamid. M. Shirazi, «Principles of quartz crystal microbalance/heat conduction calorimetry: Measurement of the sorption enthalpy of hydrogen in palladium», *Thermochimica Acta*, vol. 432, n.º 2, pp. 202-211, jul. 2005.
- [25] D. V. P. Petranovskii y D. O. Sergiyenko, «Fabian Natanael Murrieta Rico», p. 115.
- [26] R. Wang y Y. Li, «Hydrogel based QCM aptasensor for detection of avian influenzavirus», *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 42, pp. 148-155, abr. 2013.

- [27] R.-Z. Hao *et al.*, «DNA probe functionalized QCM biosensor based on gold nanoparticle amplification for Bacillus anthracis detection», *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, n.º 8, pp. 3398-3404, abr. 2011.
- [28] F. N. Murrieta-Rico, V. Petranovskii, O. Y. Sergiyenko, D. Hernandez-Balbuena, y L. Lindner, «A New Approach to Measurement of Frequency Shifts Using the Principle of Rational Approximations», *Metrology and Measurement Systems*, vol. 24, n.º 1, pp. 45-56, 2017.
- [29] N. V. Kirianaki, S. Y. Yurish, y N. O. Shpak, «Methods of dependent count for frequency measurements», *Measurement*, vol. 29, n.º 1, pp. 31-50, 2001.
- [30] F. N. Murrieta-Rico, P. Mercorelli, O. Yu. Sergiyenko, V. Petranovskii, D. Hernández-Balbuena, y V. Tyrsa, «Mathematical Modelling of molecular adsorption in zeolite coated frequency domain sensors», *IFAC-PapersOnLine*, vol. 48, n.º 1, pp. 41-46, 2015.
- [31] D. Hernández Balbuena, O. Sergiyenko, V. Tyrsa, L. Burtseva, y M. R. López, «Signal frequency measurement by rational approximations», *Measurement*, vol. 42, n.º 1, pp. 136-144, ene. 2009.
- [32] «Signal frequency measurement by rational approximations», *Measurement*, vol. 42, n.º 1, pp. 136-144, ene. 2009.
- [33] J. C. A. Fletcher, E. J. Nossen, y E. R. Starner, *Frequency measurement by coincidence detection with standard frequency*. Google Patents, 1975.
- [34] A. Y. Hinchin, *Cepnye drobi [Continued fractions]*. Leningrad, 1961.
- [35] J. H. Conway y R. K. Guy, «Farey fractions and ford circles», *The Book of Numbers*, pp. 152-154, 1996.
- [36] S. Johansson, «New frequency counting principle improves resolution», en *Proceedings of the 20th European Frequency and Time Forum*, 2006, pp. 139-146.
- [37] J. Kalisz, «Review of methods for time interval measurements with picosecond resolution», *Metrologia*, vol. 41, n.º 1, p. 17, 2003.
- [38] O. Sergiyenko *et al.*, «Analysis of jitter influence in fast frequency measurements», *Measurement*, vol. 44, n.º 7, pp. 1229-1242, 2011.

- [39] O. Y. Sergiyenko *et al.*, «Automotive FDS resolution improvement by using the principle of rational approximation», *IEEE Sensors Journal*, vol. 12, n.º 5, pp. 1112-1121, 2011.
- [40] F. N. Murrieta-Rico *et al.*, «Optimization of pulse width for frequency measurement by the method of rational approximations principle», *Measurement*, vol. 125, pp. 463-470, sep. 2018.
- [41] F. N. Murrieta-Rico, V. Petranovskii, O. Y. Sergiyenko, D. Hernandez-Balbuena, A. Pestryakov, y V. Tyrsa, «Frequency domain sensors and frequency measurement techniques», en *Applied Mechanics and Materials*, 2015, vol. 756, pp. 575-584.
- [42] H. Robson, *Verified synthesis of zeolitic materials*. Gulf Professional Publishing, 2001.
- [43] L. de Bragg, «Técnicas para la caracterización de materiales», p. 50.
- [44] «Difracción de rayos X». [En línea]. Disponible en:
<https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Minerales/Difraccion-de-rayos-X.html>.
 [Accedido: 20-may-2019].
- [45] «Crystallography - Cristalografía». [En línea]. Disponible en:
<http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/>. [Accedido: 23-sep-2019].
- [46] A. Kelly, G. W. Groves, y P. Kidd, *Crystallography and Crystal Defects*. Wiley, 2000.
- [47] G. Gilli y P. Gilli, «Molecules and molecular crystals», 2011.
- [48] B. D. Cullity, *Elements of X-ray Diffraction*. Addison-Wesley Publishing Company, 1978.
- [49] V. Pecharsky y P. Zavalij, *Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials*. Springer US, 2003.
- [50] S. Mitra, *Fundamentals Of Optical, Spectroscopic And X-Ray Mineralogy*. New Age International Publishers, 1996.
- [51] «(PDF) Visible Light-Induced Degradation of Methylene Blue in the Presence of Photocatalytic ZnS and CdS Nanoparticles». [En línea]. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/233829201_Visible_Light-Induced_Degradation_of_Methylene_Blue_in_the_Presence_of_Photocatalytic_ZnS_and_CdS_Nanoparticles. [Accedido: 23-sep-2019].

- [52] «CIO». [En línea]. Disponible en: https://www.cio.mx/microscopia_SEM.php. [Accedido: 23-sep-2019].
- [53] «Instituto de Ecología, A.C.» [En línea]. Disponible en: <http://www.inecol.edu.mx/inecol/index.php/es/17-ciencia-hoy/723-microscopia-electronica-de-barrido-y-microanalisis-de-elementos-del-cluster-cientifico-y-tecnologico-biomimic>. [Accedido: 23-sep-2019].
- [54] B. G. Yacobi y D. B. Holt, *Cathodoluminescence Microscopy of Inorganic Solids*. Springer US, 2013.
- [55] M. M. S. U. D. Chescoe, D. Chescoe, P. J. Goodhew, R. M. S. (Great Britain), y P. D. M. S. E. P. J. Goodhew, *The Operation of Transmission and Scanning Electron Microscopes*. Oxford University Press, 1990.
- [56] J. Goldstein *et al.*, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: Third Edition*. Springer US, 2012.
- [57] W. C. Bigelow y A. M. Glauert, *Practical Methods in Electron Microscopy: Vacuum methods in electron microscopy / Wilbur C. Bigelow*. Portland Press, 1994.
- [58] «JIB-4500 MultiBeam SEM-FIB | Products | JEOL Ltd.» [En línea]. Disponible en: <https://www.jeol.co.jp/en/products/detail/JIB-4500.html>. [Accedido: 23-sep-2019].
- [59] T. Schuerlein, «Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS) Characterization of an Ultrathin Multilayer Film», p. 2.
- [60] D. C. Bell y A. J. Garratt-Reed, *Energy dispersive X-ray analysis in the electron microscope*. Garland Science, 2003.
- [61] L. E. Murr, *Electron and ion microscopy and microanalysis: principles and applications*. CRC Press, 1991.
- [62] G. H. Zschornack, *Handbook of X-Ray Data*. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [63] M. Frerking, *Crystal Oscillator Design and Temperature Compensation*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [64] L. M. Surhone, M. T. Timpledon, y S. F. Marseken, *Proteus (Design Software)*. VDM Publishing, 2010.
- [65] J. P. Bentley, *Principles of measurement systems*. Pearson education, 2005.

- [66] «NIST | National Institute of Standards and Technology», *NIST*. [En línea].
Disponible en: <https://www.nist.gov/national-institute-standards-and-technology>.
[Accedido: 08-sep-2019].
- [67] «BIPM - About the BIPM». [En línea]. Disponible en:
<https://www.bipm.org/en/about-us/>. [Accedido: 08-sep-2019].
- [68] R. E. Walpole, R. H. Myers, y S. L. Myers, *Probabilidad y estadística para ingenieros*. Pearson Educación, 1999.
- [69] W. W. Hines, D. C. Montgomery, y M. de Lourdes Fournier de Fournier,
Probabilidad y estadística para ingeniería y administración. Compañía Editorial Continental, 1980.
- [70] J. P. Holman y W. J. Gajda, *MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA INGENIEROS*. MCGRAW - HILL, 1986.