

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA**



**MICROCALORÍMETRO ISOTÉRMICO DE  
VALORACIÓN DE ALTA SENSIBILIDAD.  
APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA  
ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE  
COLOIDES MODELO POLIMÉRICOS.**

**ADRIÁN VELÁZQUEZ CAMPOY**

**TESIS DOCTORAL**

**MICROCALORÍMETRO ISOTÉRMICO DE VALORACIÓN DE  
ALTA SENSIBILIDAD.  
APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS  
SOBRE COLOIDES POLIMÉRICOS**

por

**ADRIÁN VELÁZQUEZ CAMPOY**

DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. Miguel Ángel Cabrerizo Vílchez  
Profesor Titular Dpto. Física Aplicada

Dr. Obdulio López Mayorga  
Catedrático Dpto. Química-Física

Trabajo presentado para aspirar al  
**GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS FÍSICAS**

Adrián Velázquez Campoy

Granada, Abril de 1998

Es momento de mostrar mi reconocimiento a todos aquellos que, de una u otra forma, han colaborado para que lo que en un principio era un proyecto de trabajo llegara a ser una realidad.

En primer lugar, quiero agradecer a Miguel Cabrerizo Vílchez y Obdulio López Mayorga la confianza que desde el primer día pusieron en mí y su gran labor de dirección, sin la que este trabajo no hubiera llegado a su fin. De ellos no sólo he recibido lecciones en el terreno profesional, sino también en el trato personal, no menos importante, donde su gran humanidad y manera de ser les desborda.

El primer contacto con el Grupo de Investigación al que actualmente pertenezco fue a través de Roque Hidalgo, al que debo agradecer que contara conmigo para los planes futuros.

He de nombrar a Rafael Martínez, M<sup>a</sup> José Gálvez, Pepe Callejas, Curro Galisteo y Antonio Martín; también a los otros "mayores": Delfi Bastos, Juan Luis Ortega, Paco Martínez y Artur Schmitt. Siempre han estado ahí para resolver cuantas dudas surgiesen y han sabido soportar con paciencia mi impaciencia y mi inexperiencia.

A Francisco Javier de las Nieves y su Grupo de Investigación de Almería, que no hace mucho tiempo aún rondaban por aquí y ahora están en mi tierra.

Quiero tener un recuerdo especial para Miguel Cabrerizo Muñoz, una persona realmente extraordinaria y un auténtico maestro, de cuyas manos salieron la mayoría de las piezas que forman parte del dispositivo experimental.

A José Manuel Peula, del Departamento de Física Aplicada II de la Universidad de Málaga, tengo que agradecerle el permitirme utilizar en mi trabajo de investigación un látex sintetizado y caracterizado por él.

He de agradecer igualmente a Joxé Sarobe, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad del País Vasco, el haberme permitido utilizar un látex sintetizado por él y a José Antonio Molina el haber realizado su caracterización.

Hay un grupo de personas con las que he compartido durante estos años las frustraciones y las alegrías en el trabajo. Me refiero a los "okupantes" del barracón 13: María Tirado, Hartmut Wege, Juan Antonio Holgado, José Antonio Molina, Pepe Sánchez, Mustapha Zarrouk y Herman van Bellingen. Ellos me han ayudado a levantar cabeza y seguir adelante cuando las cosas no marchaban como uno quería. Además...hubo momentos muy buenos, no?

No, no me he olvidado de nadie. Quería mencionar aparte a Omar El Gholabzouri, a quien conozco desde hace 5 años, durante los cuales hemos llegado a trabar una gran amistad discutiendo sobre lo divino y lo humano. Empezamos juntos y ha sufrido también el nerviosismo del momento final. A Manolo Quesada, al que

conozco desde hace menos tiempo, pero que ha demostrado ser un buen amigo, que no es poco. Y también a Ignacio Martínez, con el que pasé todos los años de la carrera y los iniciales del doctorado; aunque al principio estaba un poco reticente, terminó por entrar en este mundillo.

Durante bastante tiempo mi lugar de trabajo fue el Departamento de Química-Física de la Universidad de Granada y quiero agradecer a su Director y a todos sus integrantes la ayuda prestada.

Finalmente, quisiera agradecer al Director del Departamento de Física Aplicada y, de modo extensivo, a todas las personas que lo integran, el haberme permitido realizar el trabajo de investigación que se refleja en esta Memoria. Todos ellos han hecho siempre más fácil la tarea diaria.

Agradezco la financiación económica de parte de este trabajo de investigación por parte del Proyecto MAT-95-0578-C02-01 (CICYT), así como al Grupo de Investigación al que pertenezco, del cual he sido becario de investigación durante estos años.

Fuera del terreno académico, quisiera poder demostrar con estas palabras todo mi agradecimiento por el apoyo y las muestras de cariño que he recibido de toda mi familia. No puedo nombraros a todos por falta de espacio, pero no me olvido de ninguno de vosotros. Gracias a vosotros, pude ahuyentar los malos momentos, que han sido bastantes, y seguir hacia adelante.

Mis hermanos, Nicolás, Luis y Ana, siempre me animaron y confiaron en que saldría adelante; casi tenían más ganas que yo de que llegara este momento.

De mis padres, Nicolás y Ana María, he de decir que su actitud y su labor ha sido admirable en todo momento. Siempre creyeron en mí y nunca dudaron en darme su apoyo en cualquier decisión que tomara. Por su paciencia y por todo lo que les debo, a ellos les dedico esta Memoria.

Como se puede ver, son muchas deudas las que debo saldar en el futuro por todo lo que recibí durante todo este tiempo. Y no podía faltar alguien con quien la deuda es enorme. He compartido con Sonia más de un tercio de mi vida y me ha dado continuamente la fuerza suficiente para seguir avanzando. Por ello y por todas las ilusiones que ella ha hecho creíbles, es también responsable de cualquier éxito que yo pudiera merecer. A ella también está dedicada esta Memoria.

A mis padres

A Sonia

*“Por muchos caminos diferentes y de múltiples modos llegué yo a mi verdad; no por una única escala ascendí hasta la altura desde donde mis ojos recorren el mundo.*

*Y nunca me ha gustado preguntar por caminos -esto repugna siempre a mi gusto! Prefería preguntar y someter a prueba a los caminos mismos.*

*Un ensayar y un preguntar fue todo mi caminar. ¡Y en verdad, también hay que aprender a responder a tal preguntar! Este es mi gusto. No un buen gusto, no un mal gusto, sino «mi gusto», del cual ya no me avergüenzo ni lo oculto.*

*«Este es mi camino, ¿dónde está el vuestro?», así respondía yo a quienes me preguntaban «por el camino». ¡El camino, en efecto, no existe!”*

Friedrich Nietzsche, *Así habló Zaratustra*.

*“Esto sólo significa que el tiempo, aunque es un convencionalismo del pensamiento muy útil, no tiene un valor intrínseco mayor, digamos, que el dinero. Pensar en función del tiempo es una manera de pensar muy complicada y artificial; además, muchos niños dominan idiomas extranjeros y teorías matemáticas mucho antes de haber adquirido una comprensión del tiempo o aceptado la tesis que se refuta fácilmente de que la causa precede al efecto.”*

Robert Graves, *La Diosa Blanca*.

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA MICROCALORIMÉTRICO ISOTÉRMICO DE VALORACIÓN.</b> | <b>15</b> |
| <b>2.1. Unidad microcalorimétrica.</b>   | <b>24</b> |
| <b>2.2. Sistema de adquisición de datos.</b>                                   | <b>33</b> |
| <b>2.3. Control de temperatura.</b>  | <b>35</b> |
| <b>2.4. Sistema de compensación de potencia.</b>                               | <b>36</b> |
| <b>2.5. Sistema de inyección.</b>  | <b>42</b> |
| <b>2.6. Sistema de agitación.</b>  | <b>44</b> |
| <b>3. MODO DE OPERACIÓN BÁSICO.</b>  | <b>49</b> |
| <b>3.1. Conceptos previos.</b>   | <b>49</b> |
| <b>3.2. Efecto de la compensación de potencia.</b>                             | <b>53</b> |
| <b>3.3. Estabilidad de línea base.</b>   | <b>57</b> |
| <b>3.4. Linealidad.</b>  | <b>59</b> |
| <b>3.5. Precisión.</b>   | <b>62</b> |
| <b>3.6. Sensibilidad.</b>  | <b>63</b> |
| <b>3.7. Procedimiento de medida en un experimento químico.</b>                 | <b>64</b> |
| <b>3.8. Influencia de la velocidad de agitación en la respuesta.</b>           | <b>65</b> |
| <b>3.9. Elección del período de muestreo.</b>                                  | <b>66</b> |
| <b>4. MODELO FÍSICO-MATEMÁTICO DEL DISPOSITIVO.</b>                            | <b>69</b> |

|  |     |
|--|-----|
| <b>4.1. Modelo continuo.</b>                                 | 74  |
| 4.1.1. <i>Función de transferencia directa.</i>              | 80  |
| 4.1.2. <i>Función de transferencia de retroalimentación.</i> | 85  |
| 4.1.3. <i>Función de transferencia de lazo cerrado.</i>      | 87  |
| <b>4.2. Modelo discreto.</b>                                 | 90  |
| 4.2.1. <i>Respuesta directa.</i>                             | 95  |
| 4.2.2. <i>Respuesta en lazo cerrado.</i>                     | 96  |
| <b>5. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DEL MICROCALORÍMETRO.</b>     | 101 |
| <b>5.1. Sistema continuo.</b>                                | 101 |
| 5.1.1. <i>Principios generales.</i>                          | 101 |
| 5.1.2. <i>Aplicación a la microcalorimetría.</i>             | 105 |
| <b>5.2. Sistema discreto.</b>                                | 108 |
| 5.2.1. <i>Principios generales.</i>                          | 108 |
| 5.2.2. <i>Aplicación a la microcalorimetría.</i>             | 112 |
| <b>5.3. Error en estado estacionario.</b>                    | 119 |
| <b>5.4. Controlabilidad y observabilidad.</b>                | 124 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>6. TIPOS DE CONTROL PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PRINCIPIO DE MEDIDA POR COMPENSACIÓN DEL EFECTO TÉRMICO.</b> | 127 |
| <b>6.1. Sistemas de control continuos.</b>   | 127 |
| <i>6.1.1. Control nulo.</i>  | 128 |
| <i>6.1.2. Control proporcional.</i>  | 133 |
| <i>6.1.3. Control proporcional-derivativo.</i>   | 147 |
| <i>6.1.4. Control proporcional-integral.</i>   | 159 |
| <b>6.2. Sistemas de control discretos.</b>   | 175 |
| <i>6.2.1. Control nulo.</i>  | 177 |
| <i>6.2.2. Control proporcional.</i>  | 182 |
| <i>6.2.3. Control proporcional-derivativo.</i>   | 193 |
| <i>6.2.4. Control proporcional-integral.</i>   | 199 |
| <b>7. CARACTERIZACIÓN ESTÁTICA Y DINÁMICA.</b>   | 207 |
| <b>7.1. Determinación de la constante de calibración.</b>  | 210 |
| <i>7.1.1. Experimentos de calibración eléctrica.</i>   | 210 |
| <i>7.1.2. Experimentos de calibración química.</i>   | 214 |
| <b>7.2. Dependencia de la constante de calibración respecto de los parámetros de control y la temperatura.</b> | 217 |
| <b>7.3. Determinación de las constantes de tiempo.</b>   | 223 |
| <b>7.4. Dependencia de las constantes de tiempo respecto de los parámetros de control.</b>                     | 228 |
| <b>7.5. Índices de eficiencia.</b>   | 234 |
| <b>8. EXPERIMENTOS PREVIOS DE COMPROBACIÓN.</b>  | 245 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>9. CALORIMETRÍA DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS.</b>  | 245 |
| <b>9.1. Introducción.</b>                          | 245 |
| <i>9.1.1. Generalidades.</i>                       | 245 |
| <i>9.1.2. Proteínas en interfases.</i>             | 249 |
| <b>9.2. Materiales y métodos.</b>                  | 259 |
| <b>9.3. Resultados experimentales y discusión.</b> | 274 |
| <i>9.3.1. Efecto del pH.</i>                       | 274 |
| <i>9.3.2. Efecto de la fuerza iónica.</i>          | 290 |
| <i>9.3.3. Efecto de la temperatura.</i>            | 298 |
| <br>   |     |
| <b>10. RESUMEN Y CONCLUSIONES.</b>                 | 305 |
| <br>   |     |
| <b>APÉNDICES.</b>                                  |     |
| <b>A1. Criterios de estabilidad.</b>               | 315 |
| <b>A2. Técnica del lugar de las raíces.</b>        | 323 |
| <br>   |     |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.</b>                               | 333 |

## 1. INTRODUCCIÓN.

Los procesos de adsorción tienen un enorme interés, tanto desde el punto de vista teórico como aplicado. No debería hacer falta recordar que una gran parte de los fenómenos en la naturaleza tienen lugar en interfases entre dos medios. Si en el medio hay macromoléculas anfifílicas presentes (ej. proteínas), éstas exhiben una tendencia, en general bastante acentuada, a acumularse en dichas interfases. Para matizar esta afirmación, habría que añadir que esta tendencia, caracterizada termodinámicamente a través de la energía de Gibbs de adsorción,  $\Delta_{ADS}G$ , se ve afectada por diversos factores: temperatura, fuerza iónica y  $pH$  del medio, hidrofobicidad, estado eléctrico de la interfase, heterogeneidad de la superficie y de las macromoléculas (Norde, 1976; Norde, 1979; Norde, 1985; Norde et al., 1991; van Dulm, 1981; Sadana, 1992; Hidalgo Álvarez et al., 1995). Estos factores ejercen una notable influencia sobre las posibles interacciones entre los distintos componentes de la interfase involucrados en el proceso de adsorción. De este modo, una mejor comprensión del fenómeno de adsorción permitiría progresar en el conocimiento de las interacciones subyacentes.

Desde el punto de vista de la aplicación industrial y tecnológica, interesa controlar el proceso de adsorción y determinar en qué condiciones se ve favorecido o dificultado. Numerosos ejemplos se pueden encontrar en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética y en el campo de la biotecnología y la biomedicina.

Un modo de estudiar dichos fenómenos se basa en un análisis físico-químico basado en la isoterma de adsorción. En este método realiza una medida directa de la cantidad adsorbida (acumulada) de macromolécula en la interfase en función de la concentración de macromolécula en disolución,  $I(c_S)$ , manteniendo la temperatura constante. De esta forma, es necesario adoptar un modelo del proceso para obtener los

---

parámetros que lo caracterizan termodinámicamente (constante de equilibrio,  $K$ ; energía de Gibbs de adsorción,  $\Delta_{ADS}G$ ; entropía y entalpía de adsorción,  $\Delta_{ADS}S$  y  $\Delta_{ADS}H$ ; variación de la capacidad calorífica,  $\Delta_{ADS}C_P$ ) y que proporcionan información sobre las interacciones moleculares y subprocesos implicados. Sin embargo, apenas existen modelos realistas que describan bien los procesos de adsorción de macromoléculas y los utilizados usualmente se fundamentan en unas hipótesis que difícilmente se verifican (ej. modelo de Langmuir), aunque ya se han introducido aspectos tales como la interacción soluto-disolvente o la diferencia en tamaño molecular entre soluto y disolvente (Everett, 1964; Everett, 1965; Adamson, 1976; Kronberg, 1983; Kronberg et al., 1984; Tadros, 1988; Young et al., 1988; Dékany et al., 1990; Király et al., 1990; Lyklema, 1991; Hajra et al., 1991; Sarkar et al., 1992; Sadana, 1992; Douillard et al., 1993; Sarkar et al., 1994; Chang et al. 1995; Dabrowski et al., 1995; Al-Malah et al., 1995; Chen et al., 1997; Silva da Rocha et al., 1997). De entre todas las hipótesis, cabe destacar aquellas que se refieren a la homogeneidad de la superficie adsorbente y la interacción soluto-soluto y soluto-disolvente. En la adsorción en la interfase sólido-líquido surge una competencia entre el disolvente y el soluto por ocupar la superficie y, consecuentemente, una heterogeneidad intrínseca del proceso de adsorción en dicha superficie, aparte de la posible heterogeneidad propia de tal superficie (Sadana, 1992; Hidalgo Álvarez et al., 1995), ya que coexistirán regiones no recubiertas y recubiertas por las moléculas adsorbidas. Debido a este último hecho, puede haber cierta preferencia por parte de una molécula por adsorberse lejos o cerca de otra ya adsorbida (cooperatividad negativa o positiva en el proceso de adsorción). En este caso, dicha preferencia vendrá determinada por las interacciones superficie-disolvente, superficie-soluto, soluto-soluto y soluto-disolvente. Dependiendo entre otros de parámetros tales como la hidrofobicidad de la superficie y el estado eléctrico de la interfase y el soluto, existirá una distribución particular de sitios y energías de adsorción sobre la superficie (Fubini, 1988). Una consecuencia inmediata de este hecho es la dependencia de la entalpía de adsorción respecto del grado de recubrimiento de la superficie adsorbente, estando el proceso de adsorción representado por múltiples estados. Por tanto, con este método se obtienen solamente magnitudes termodinámicas aparentes si el proceso no es de *dos estados*, que es lo frecuente dadas las características de los sistemas estudiados.

No obstante, existe una alternativa basada en un estudio termodinámico básico,

donde la magnitud a la cual se tiene acceso directo, mediante técnicas calorimétricas, es la entalpía de adsorción. De esta manera, es posible evaluar la entalpía de adsorción en función del recubrimiento de la superficie, lo que determinaría si el proceso global de adsorción presenta múltiples estados o no. Si los procesos estudiados son irreversibles, no se podrán aplicar las ecuaciones que permiten obtener, a partir de la variación de entalpía, las restantes magnitudes termodinámicas que caracterizan el proceso. Pero ésta es una limitación que presentaría de partida el método anterior y lo invalida completamente en dicha circunstancia, no pudiendo evaluar ninguna magnitud termodinámica característica del proceso.

Por todas estas razones, está totalmente justificado uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación: la construcción y optimización de un sistema microcalorimétrico diferencial isotérmico de valoración secuencial. Se ha conseguido una total automatización, estando controlado todo el dispositivo experimental (adquisición de datos, compensación de potencia, inyección de muestras) a través de un ordenador personal. La materialización de este objetivo se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Física Aplicada y del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. Con este dispositivo es posible realizar un estudio sistemático sobre la adsorción de macromoléculas en la interfase sólido-líquido. En concreto, nos hemos centrado en la adsorción de proteínas sobre partículas coloidales poliméricas.

Se ha elegido la Mioglobina como proteína modelo. Es una proteína globular compacta, con un único dominio estructural, de peso molecular relativamente bajo y de la que se conoce muy bien su estructura tridimensional (*Stryer, 1988; Evans, 1990; Sigma, 1997*). Asimismo, posee un punto isoeléctrico de 7.0, por lo que para que presente carga neta positiva o negativa no es necesario que el *pH* del medio alcance valores demasiado extremos. Es una macromolécula bastante hidrofílica y no deberá plantear problemas de solubilización o estabilización frente a la agregación.

El sistema adsorbente modelo utilizado es una dispersión en medio acuoso de partículas de matriz polimérica de tamaño menor de 1  $\mu\text{m}$ , conocida usualmente como

---

*látex*. Las propiedades físico-químicas del monómero empleado en la reacción de polimerización, es decir, en la síntesis de este tipo de sistemas, determinará las propiedades superficiales de dichas partículas. De igual modo, el iniciador que se haya utilizado para activar dicha reacción y los posibles grupos funcionales existentes en el monómero establecerán qué grupos funcionales estarán presentes en la superficie de las partículas. Teniendo esto en cuenta, eligiendo adecuadamente los reactivos y las condiciones de reacción es posible alcanzar un gran dominio sobre el proceso de síntesis y controlar el tamaño, densidad de carga eléctrica superficial e hidrofobicidad de tales partículas poliméricas. De este modo, se puede conseguir una suspensión monodispersa de partículas esféricas con propiedades superficiales específicas, lo que se traduce en la posibilidad de *construir* interfases sólido-líquido con características determinadas. Sin embargo, lo más destacable, y más relevante para un estudio sobre adsorción, de este tipo de sistemas es el hecho de que, debido al pequeño tamaño de partícula, con una fracción de volumen de sólido reducida es posible disponer de un área superficial enorme.

La elección de un microcalorímetro diferencial isotérmico de valoración secuencial para emprender un estudio de fenómenos de adsorción estriba en las ventajas que presenta esta clase de dispositivo cuando se compara entre todos los tipos de microcalorímetros de reacción empleados en la determinación energética de las interacciones involucradas en un proceso: calorímetro batch, calorímetro de flujo y calorímetro de valoración.

En cada experimento en un calorímetro batch se obtiene un único punto de la curva de valoración, ya que los dos reactivos, colocados en sendos compartimentos en la célula de medida, se ponen en contacto de forma íntegra en un único paso y en una proporción relativa constante y predeterminada en el experimento (*Calvet et al., 1956; Calvet et al., 1963; Sturtevant, 1972; Fujita et al., 1977*). Mediante un registro de la señal transitoria durante el proceso de mezcla, que es proporcional a la potencia térmica desarrollada, se obtiene el calor de reacción. Es evidente que este dispositivo presenta un gasto excesivo de reactivos y tiempo de trabajo.

En un calorímetro de flujo se produce una entrada continua de reactivos en la célula de medida y una salida continua y simultánea de productos (*Monkanol et al., 1968; Picker et al., 1969; Christensen et al., 1976a; Beezer, 1977; Wädso, 1977; Christensen et al.,*

1981; Smith et al., 1972). La velocidad de flujo debe ser tal que el tiempo de residencia sea suficiente para que se complete la reacción en el volumen de control de la célula. Es posible variar la proporción relativa de reactivos alterando los flujos respectivos y creando un gradiente de concentración, de modo que se pueden obtener distintos puntos de la curva de valoración (López Mayorga et al., 1984; Fisicaro, 1987). Sin embargo, éste no es el modo convencional de utilización de un calorímetro de flujo debido a que presenta algunos problemas. Por otra parte, la medida se realiza en régimen estacionario, siendo necesario esperar a que éste se establezca. La señal registrada en estado estacionario es proporcional al flujo de calor y al flujo de materia en la célula. Aunque este sistema mejora el rendimiento obtenido con un calorímetro batch, actualmente no es muy empleado porque el gasto de reactivos y tiempo de experimentación es mayor que el de un calorímetro de valoración.

En un calorímetro de valoración se realiza una adición continua o secuencial del agente valorante sobre una disolución del reactivo que se va a valorar (Christensen et al., 1965; Christensen et al., 1973; Spink et al., 1975; Hansen et al., 1975; Jordan et al. 1976; Spokane et al., 1981; McKinnon et al., 1984; Wiseman et al., 1989; Freire et al. 1990; El Harrous et al., 1994). De esta manera, en un solo experimento se puede obtener una curva de valoración completa hasta el término de la reacción. Aunque la curva obtenida en el primer método es continua y en el segundo es discreta, los niveles más altos de sensibilidad se han logrado con calorímetros de valoración secuenciales (Rouquerol, 1985b; Wiseman et al., 1989; Freire et al. 1990). En este tipo de dispositivos se consigue un rendimiento óptimo de material y tiempo de experimentación. La medida de la señal de potencia y la posterior evaluación del calor de reacción se realiza del mismo modo que en un calorímetro batch.

Como técnica analítica, la Calorimetría Isotérmica de Valoración se considera una herramienta universal (Oscarson et al., 1986; Wiseman et al., 1989; Landau, 1996) que posee un amplio campo de aplicación en muy diferentes áreas: química y bioquímica, física y biofísica, biotecnología, biomedicina, industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria, control de procesos, etc. (Jordan et al., 1976; Izatt et al., 1983; Wadsö, 1985b; Wadsö, 1985c; Wadsö, 1985d; Wadsö, 1995; Wadsö, 1997; Oscarson et al., 1986; Freire

---

*et al.*, 1990; Blume, 1991; Chaves *et al.*, 1994; Buckton, 1995; Lahti *et al.*, 1995; Aki *et al.*, 1995; Rowe, 1996; Landau, 1996; Regenass, 1985). También ha sido aplicada con éxito al estudio de fenómenos interfaciales, tales como la adsorción (Nyilas *et al.*, 1974; Norde, 1976; Norde, 1985; Norde *et al.*, 1994b; Izatt *et al.*, 1983; Gravelle, 1984; Gravelle, 1985; Della Gatta, 1985; Rouquerol, 1985a; Rouquerol, 1985b; Fubini, 1989; Rohl *et al.*, 1991; Handy *et al.*, 1993; Seidel, 1993; Wu *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997).

En un experimento típico en Calorimetría Isotérmica de Valoración se registra el efecto térmico producido por la mezcla secuencial de los reactivos, a presión constante, hasta que se alcanza el final de la reacción. De este modo, la magnitud observable y accesible directamente es el calor de reacción a presión constante,  $Q_P$ , que es justamente la entalpía de reacción,  $\Delta H$ . Dicha magnitud es uno de los parámetros comúnmente utilizados para caracterizar termodinámicamente cualquier proceso físico-químico. La señal que directamente se mide es el flujo de calor desde la célula de medida hacia el foco de calor, por lo que este tipo de dispositivo recibe también el nombre de *calorímetro de conducción* (Heminger *et al.*, 1984). Interpuestos entre célula y foco se sitúan los sensores de flujo de calor, empleándose usualmente termopilas de semiconductor que generan una fuerza electromotriz proporcional a la diferencia de temperaturas entre sus caras, es decir, entre célula y foco calorífico. Si el sistema se encuentra dentro de los límites de validez de la ley de enfriamiento de Newton, diferencia de temperatura y flujo de calor serán proporcionales y la medida del voltaje generado nos proporcionará la potencia térmica desarrollada. De aquí se desprende que este dispositivo no es estrictamente isotérmico, ya que el fundamento del método de medida se basa en una diferencia de temperaturas. Sin embargo, se puede comprobar que en el sistema microcalorimétrico desarrollado en este trabajo dicha diferencia es menor de 50  $\mu\text{K}$  y se considerará como un microcalorímetro *cuasi-isotérmico*. En todo caso, como función de estado, el valor de la variación de entalpía sólo dependerá del estado inicial y el estado final, estando éstos caracterizados por los mismos valores de temperatura y presión en un calorímetro isotérmico de valoración.

El éxito de esta metodología está basado en diversos hechos relevantes. En primer lugar, asociado a cualquier proceso existe un fenómeno concomitante de transferencia de calor (Wiseman *et al.*, 1989). El calor puesto en juego transferido entre el sistema

reaccionante y su entorno está vinculado con las interacciones moleculares implicadas en dicho proceso. Dicho calor se mide directamente y está conectado de una forma explícita con la entalpía y el avance de la reacción. Otras técnicas, tales como diálisis en equilibrio, ultrafiltración o cromatografía de exclusión en gel, utilizadas frecuentemente en la caracterización de procesos de equilibrio permiten evaluar la variación de entalpía a partir de la dependencia de la constante de asociación,  $K$ , respecto de la temperatura. Sin embargo, si el proceso en cuestión es complejo y presenta múltiples estados, la ecuación de van't Hoff no es válida y se obtiene una variación aparente de entalpía, que incluso carecerá de significado físico. En este caso, solamente mediante técnicas calorimétricas es posible determinar el verdadero cambio de entalpía en el proceso, ya que se miden directamente variaciones de este potencial termodinámico. Un caso concreto, que será objetivo experimental de este trabajo de investigación, donde podemos encontrar un proceso que no es de dos estados de forma muy clara es la adsorción de macromoléculas en la interfase sólido-líquido. En general, se observa que en dicho fenómeno la entalpía de adsorción depende del porcentaje de recubrimiento de la interfase (Arai *et al.*, 1990; Haynes *et al.*, 1993; Norde *et al.*, 1994b). De este modo, el proceso de adsorción no está caracterizado por un valor único de variación de entalpía, sino que la magnitud de ésta depende del avance de dicho proceso. En segundo lugar, el calor es una buena señal para observar y controlar cualquier proceso de forma no invasiva, debido a lo comentado anteriormente: prácticamente, todo fenómeno originado en un sistema va acompañado de un intercambio energético entre dicho sistema y sus alrededores (si el sistema reaccionante no es aislado) o de un aumento de su temperatura (si el sistema reaccionante es aislado). El primer caso corresponde a los denominados *calorímetros de conducción e isotérmico* y el segundo caso, a los denominados *calorímetros isoperibol y adiabático* (Heminger *et al.*, 1984; Izatt *et al.*, 1983; McGlashan, 1984; Rouquerol *et al.*, 1986; Wadsö, 1985c; Wadsö, 1985d; Wadsö, 1990; Wadsö, 1997a; Zielenkiewicz, 1992; Grønlund, 1991). El empleo de las otras técnicas analíticas alternativas no siempre es posible, ya que es indispensable que el sistema bajo estudio posea alguna propiedad específica que varíe en el tiempo conforme avance el proceso (ej. grupos fluoróforos para seguimiento mediante fluorescencia), requerimiento que no siempre es posible de satisfacer. Además, algunos subprocesos que no impliquen un cambio en dicha propiedad pueden ser enmascarados. Sin embargo, el carácter de técnica no específica y la incapacidad de separar e identificar procesos que

---

poseen los métodos calorimétricos, dado que el calor es un observable macroscópico presente en cualquier fenómeno físico-químico, es una limitación que hacen necesaria la ayuda de técnicas analíticas adicionales. En último lugar, existe una metodología bien establecida y una base teórica rigurosa para el análisis y tratamiento de los datos experimentales, incluso para sistemas relativamente complejos (*Christensen et al., 1972; Eatough et al., 1972a; Eatough et al., 1972b; Wiseman et al. 1989; Sari et al., 1989; Arena et al., 1989; Wyman et al., 1990; Freire et al., 1990*). Es momento de destacar que, aunque existen diversos modelos físico-matemáticos utilizados para representar y describir el funcionamiento de un calorímetro isotérmico de valoración (*Randzio et al., 1980; Navarro et al., 1982; Zielenkiewicz, 1992; Tanaka, 1992; Tanaka, 1996; García Fuentes, 1994*), aún existen puntos discordantes, sobre todo aquél relacionado con la discrepancia, a veces notable, entre la caracterización dinámica de un calorímetro obtenida mediante experimentos eléctricos y la obtenida mediante experimentos químicos, justificada normalmente aduciendo que la respuesta del calorímetro depende de la localización de la fuente de calor (*Barthel, 1975; Dantzer et al., 1982; Tanaka, 1989a; Navarro et al., 1992; Schachinger et al., 1983; Zielenkiewicz, 1992; Wadsö, 1997b*). En este sentido, otro de los objetivos de este trabajo de investigación es dar una respuesta satisfactoria a este problema. No hay que perder de vista que la realización de una caracterización dinámica precisa, es decir, la determinación rigurosa de la función de transferencia del calorímetro es esencial, por diversos motivos. Aparte de la importancia que de por sí tiene el hecho de poder reproducir teóricamente el comportamiento del dispositivo, podemos destacar que la posibilidad de llevar a cabo estudios sobre la cinética de determinados procesos depende de la precisión con que se conocen las constantes de tiempo instrumentales.

Cuando el proceso objeto de estudio corresponde a una interacción sencilla, tal como la unión no cooperativa de un ligando a una macromolécula que posee sitios de unión de idéntica afinidad, es posible obtener una caracterización termodinámica completa del proceso mediante una valoración calorimétrica. En este caso, es la única técnica que proporciona simultáneamente parámetros termodinámicos y estequiométricos (*Sari et al., 1989; Freire et al. 1990*). Si el proceso estudiado no reuniese las características necesarias para aplicar las herramientas de la Termodinámica Clásica del Equilibrio (ej. el proceso es

irreversible), la única magnitud que se puede evaluar es la variación de entalpía de proceso, que se mide directamente. Sin embargo, con las demás técnicas analíticas (ej. isoterma de adsorción), ni siquiera es posible obtener dicha magnitud. En este caso, podría llevarse a cabo un estudio cinético siguiendo la evolución temporal de alguna propiedad proporcional al avance de la reacción, siendo el estudio termocinético de dicho proceso factible en calorimetría isotérmica (*Zahra et al., 1973; Gravelle, 1985; Grønlund, 1991; Yamane et al., 1991; Le Blond et al., 1996; Landau, 1996*).

Una tendencia importante de desarrollo en calorimetría está conectada con la cantidad de reactivo empleada en un experimento concreto (*López Mayorga et al., 1984; El Harrous et al., 1994b; Sari et al., 1989; Wiseman et al., 1989; Freire et al., 1990*). La mayoría de los sistemas de interés biotecnológico contienen componentes considerablemente caros o, por razones de pureza, difíciles de conseguir. Además, si se desea determinar constantes de equilibrio y entalpías de reacción en sistemas que poseen constantes de afinidad elevadas es necesario utilizar reactivos en condiciones de dilución extremas. Por tanto, para realizar este tipo de estudios es imprescindible un calorímetro de alta sensibilidad que minimice la cantidad de sustancia requerida. Este dispositivo recibe entonces el nombre de *microcalorímetro*. Aquí, aunque aparecerán en el transcurso de este trabajo, cabe mencionar los conceptos de sensibilidad y sensibilidad específica del instrumento. La primera está relacionada con la cantidad mínima de reactivo y la segunda con la concentración mínima de reactivo requeridas para llevar a cabo un experimento. Son dos índices de eficiencia del instrumento igual de importantes, ya que un microcalorímetro puede poseer una sensibilidad elevada y una sensibilidad específica pobre y podemos encontrarnos con sistemas que muestran una estabilidad marginal fuertemente dependiente de las condiciones del medio (ej. disoluciones de macromoléculas) donde no es posible emplear concentraciones elevadas.

Otra línea de avance en instrumentación está dirigida a la reducción del tiempo de experimentación. Este es un aspecto muy importante si se trabaja con sistemas que poseen baja estabilidad en el tiempo, tales como suspensiones de material biológico u otros sistemas coloidales. Esta disminución del tiempo de experimento se consigue alterando las constantes de tiempo intrínsecas o tiempos de relajación térmica del instrumento. La forma

---

de conseguir esto es la inclusión en el sistema microcalorimétrico de un lazo de retroalimentación de potencia que modifique la función de transferencia del sistema (fenómeno que en Teoría de Sistemas recube el nombre de *compensación*) y el empleo de sistemas de control adecuados (*Randzio, 1981; McKinnon et al., 1984; Zhong et al., 1988; Wiseman et al., 1989; Freire et al., 1990; El Harrous et al., 1994a; El Harrous et al., 1994b; García Fuentes, 1994; Velázquez Campoy et al., 1998a; Velázquez Campoy et al., 1998b*). Este efecto está muy relacionado con la sensibilidad, ya que en realidad lo que se busca es que la respuesta del dispositivo sea más rápida, eliminando la inercia térmica de éste, siendo el tiempo de respuesta un factor determinante de la sensibilidad dinámica (*Hansen et al. 1983; Margas et al., 1993a; Margas et al., 1993b*). De sobra es conocido que la respuesta de un dispositivo es una versión distorsionada en el tiempo del estímulo a que fue sometido. Así, el termograma, que es la potencia térmica registrada en función del tiempo, no coincide con la termogénesis, que es la verdadera potencia térmica generada en la reacción en función del tiempo (*Heminger et al., 1984; Höhne, 1978; Randzio et al., 1980*). Aún cuando se ha prestado mucha atención al desarrollo de diversos métodos de deconvolución o corrección dinámica para obtener la segunda a partir de la primera (*Dubes et al., 1977; Höhne, 1978; Tanaka, 1978; Tanaka, 1989b; Nakanishi et al., 1981; Cesari et al., 1982a; Cesari et al., 1982b; Macqueron et al., 1983; Hatt et al., 1983; Rodríguez et al., 1983; Rey et al. 1983; Ortín et al., 1983; Ortín et al. 1984; Marco et al., 1985; Marco et al., 1986a; Fujieda et al., 1985; Fujieda et al., 1987; Fujieda et al., 1988; Müller et al., 1987; Tachoire et al., 1987; Yu et al., 1988; Yun et al., 1988; Rodríguez de Rivera et al., 1989; Gaillard, 1985; Yamane et al., 1991; Grønlund, 1991*) es muy ventajoso y aconsejable poder reducir en tiempo real las constantes de tiempo mediante el método de compensación. También es posible realizar la corrección dinámica analógicamente o numéricamente en tiempo real, pero se presentan problemas de diseño y operación de los circuitos analógicos empleados y de procesamiento de datos numéricos (ej. operación de derivación numérica, tratamiento de datos muestreados). Se ha comprobado que el método de compensación por retroalimentación es más eficaz y posee menos inconvenientes que la corrección dinámica analógica o numérica (*Randzio, 1981*). Con constantes de tiempo menores, la transferencia del calor generado en la reacción se realiza más deprisa y no se requiere un tiempo de medida demasiado grande. De este modo, se obtiene mayor sensibilidad dinámica en cuanto a potencia calorífica y se minimizan los errores debidos a

una deriva de la línea base.

Todas estas ideas se pueden resumir en que se demanda un microcalorímetro de alta sensibilidad, con máxima eficiencia en tiempo y mínimo gasto de material.

Hoy día hay varios tipos de microcalorímetros isotérmicos de valoración disponibles incluso comercialmente (*Wadsö, 1985a; Oscarson et al., 1986; Wiseman et al., 1989; Freire et al., 1990; Anderson, 1993; El Harrous et al., 1994a*), pero pocos son los que presentan una sensibilidad suficientemente elevada apropiada para abordar estudios sobre adsorción y, además, poseen un alto coste. Asimismo, con los instrumentos comerciales, dispositivos que no están diseñados para un propósito concreto, pueden surgir problemas específicos de diseño u operación inesperados, teniendo que ser resueltos por los investigadores. Debido a estas razones, se ha diseñado y construido un microcalorímetro isotérmico diferencial de valoración con control digital y sistema de compensación Peltier. El diseño, bastante sencillo y muy simplificado respecto a otros instrumentos similares, está basado en el principio *twin*. Para modificar la función de transferencia del sistema y reducir las constantes de tiempo instrumentales se ha incluido un sistema de compensación de potencia mediante un lazo de retroalimentación. El control digital, ejecutado mediante un ordenador personal incluido en la trayectoria de retroalimentación, permite la implementación de diferentes algoritmos de control, reflejando la flexibilidad, facilidad de implementación, simplicidad, calidad y reproducibilidad de los resultados, robustez y fiabilidad del control digital comparado con el control analógico (*Ambrosetti et al., 1983; López Mayorga et al., 1984; Karlsen et al., 1984; Klaasen et al., 1986; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Cortijo et al., 1995; Landau, 1996*). Además, el sistema manifiesta una enorme facilidad de operación y de ajuste de control, permitiendo un completo conocimiento de su funcionamiento. Si a todo esto se une el hecho de disponer de un modelo físico-matemático completamente detallado que reproduce con enorme fidelidad el comportamiento del instrumento, se puede concluir que, como dispositivo de medida, este microcalorímetro dista mucho de ser una *caja negra* para el usuario. Como se mostrará en este trabajo de investigación, gracias a todas estas posibilidades ha sido posible desarrollar un nuevo método de medida basado en un control proporcional-integral aplicable a este dispositivo y que presenta numerosas e importantes

---

ventajas comparado con el tradicional control proporcional (*Velázquez Campoy et al., 1998a*).

Una cuestión que merece la pena que sea comentada es la utilización de elementos Peltier como actuadores en el lazo potencia de retroalimentación. Aunque se ha generalizado el uso de elementos Peltier como detectores de temperatura o de flujo de calor, la compensación Peltier se dejó de aplicar hace ya bastantes años (*Calvet et al., 1963*) y actualmente se emplean elementos resistivos puros para dicha tarea. Nuestra decisión de emplear elementos Peltier se basa en cuatro importantes razones que detallamos a continuación:

a) En primer lugar, las termopilas o elementos Peltier son componentes que actúan como bombas de calor bidireccionales, ya que pueden generar flujos de calor en sentidos contrarios. Sin embargo, una resistencia solamente puede generar flujo de calor en un único sentido, lo que hace necesaria la aplicación de una potencia constante de referencia.

b) Existe un alto grado de miniaturización en este tipo de elementos, lo que los hace especialmente idóneos como sensores de temperatura o de flujo de calor en dispositivos donde los problemas de espacio pueden llegar a ser determinantes. En este sentido, se debe mencionar que la sensibilidad depende en gran medida de la densidad superficial de uniones semiconductoras en cada elemento Peltier y del número de elementos utilizados.

c) En tercer lugar, el enorme desarrollo alcanzado gracias a la investigación en semiconductores permite tener acceso a materiales que poseen unas características apropiadas: conductividad eléctrica y coeficiente Seebeck elevados y baja conductividad térmica. Así se consigue minimizar las pérdidas de calor y obtener un buen rendimiento en la conversión o transducción de una diferencia de temperatura en una fuerza electromotriz.

d) En último lugar, pero no por ello el argumento menos decisivo, hay que mencionar que empleando elementos Peltier, gracias a las características anteriormente comentadas, se logra implementar un control lineal prácticamente puro, ya que la potencia Peltier es varios órdenes de magnitud mayor que la potencia Joule, en condiciones no extremas de operación. Utilizando elementos resistivos el control es intrínsecamente

cuadrático ya que se basa en la potencia Joule generada por dichos componentes. No hay que perder de vista que si queremos que el sistema de medida en su conjunto se comporte linealmente (en realidad, este no es un requerimiento fundamental e indispensable para un sistema de medida, pero simplifica enormemente su modo de operación), el sistema de control inmerso en él debe conservar dicha linealidad.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA MICROCALORIMÉTRICO ISOTÉRMICO DE VALORACIÓN.

Tal como ha sido establecido anteriormente, el microcalorímetro de reacción desarrollado es del tipo de conducción de calor (*Heminger et al., 1984*). Por consiguiente, la evaluación del calor de reacción se basa en la detección de una diferencia neta de temperaturas que se extingue en el tiempo una vez alcanzado el equilibrio químico. Esta diferencia de temperaturas origina un flujo de calor a través de una determinada trayectoria cuyo objetivo es equilibrar térmicamente el sistema. La resistencia térmica ofrecida por este camino al flujo de calor no debe ser excesivamente elevada, lo que se traduciría en un flujo de calor aproximadamente nulo (calorímetro isoperibol y adiabático), ni excesivamente pequeña (calorímetro estrictamente isotérmico), lo que provocaría que las diferencias de temperatura apenas fuesen apreciables, ya que el tiempo de equilibración térmica sería muy reducido.

Un modelo simple de este microcalorímetro consiste en considerar cuatro elementos: contenido de célula, célula, sensor de temperatura y foco calorífico (véase la *Figura 2.1*). Entre estos 4 elementos se establecen contactos diatérmicos, lo que dará lugar a una interacción térmica cuyo resultado final será la consecución de un estado de equilibrio térmico mutuo. La magnitud que se mide es el flujo de calor o potencia térmica transferida entre la célula de medida y el foco calorífico cuando se produce un efecto térmico en el interior de la célula. Si no hubiera pérdidas, el calor generado como resultado de una reacción se transferiría íntegramente al foco; no obstante, en un sistema real inevitablemente habrá pérdidas, pero éstas se pueden considerar uniformes uniformes, es decir, representan siempre un porcentaje más o menos constante del calor desarrollado, y quedan englobadas en la constante de calibración (*Calvet et al., 1963*).

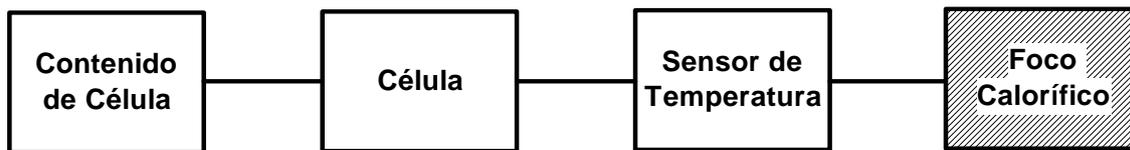


Figura 2.1. Modelo simplificado del microcalorímetro.

Un conjunto de termopilas de semiconductor, interpuestas entre la pared de la célula y el foco, convierte la diferencia instantánea de temperatura entre célula y foco, responsable del intercambio energético entre ambos, en una fuerza electromotriz (efecto Seebeck). De esta forma, se genera trabajo eléctrico aprovechando la tendencia de evolución del sistema hacia el equilibrio térmico. El principal camino seguido por el flujo de calor entre cada célula y el foco calorífico es a través del conjunto de termopilas que actúa como transductor. Aunque hay pérdidas de calor por radiación y convección, éstas son muy pequeñas, ya que las diferencias de temperatura creadas son mucho menores que  $50 \mu\text{K}$  (véase el Capítulo 7). Como se deduce de lo anterior, no se mide directamente el flujo de calor desarrollado, sino el voltaje generado por las termopilas que funcionan como sensores de temperatura o flujo de calor. El foco calorífico debe ser, como su nombre indica, un sistema que posee una capacidad calorífica extremadamente elevada, de modo que mantenga constante su temperatura cuando se encuentra involucrado en un proceso de transferencia de calor.

El método de medida es diferencial (*Barthel, 1975; Della Gatta, 1985; Freire et al., 1990*), disponiendo de dos células idénticas, muestra y referencia, en las cuales se procura que tengan lugar los mismos sucesos, excepto la reacción de interés, que sólo se produce en la célula de muestra. Un modo de conseguir aproximadamente esto es colocar solamente uno de los reactivos en la célula de muestra o inyectando el reactivo valorante únicamente en la célula de muestra. La señal de medida deberá ser la diferencia de las respectivas señales generadas en las células.

Cuando se produce un efecto térmico en una célula y se rompe el equilibrio térmico previamente establecido, cada termopila produce un voltaje eléctrico proporcional a la diferencia de temperatura entre sus caras (efecto Seebeck). El conjunto de termopilas de cada célula genera un voltaje global que es la suma de los voltajes generados en cada termopila. El foco calorífico actúa como un termostato cuya temperatura constante sirve de temperatura de referencia a ambas células simultáneamente. Teniendo en cuenta que los dos conjuntos independientes de termopilas de cada célula están conectados en oposición eléctricamente, la verdadera señal de medida es la diferencia entre el voltaje generado por ambos transductores. Esta señal,  $\Delta V(t)$ , será a su vez proporcional a la diferencia de temperatura,  $\Delta T(t)$ , entre la célula de muestra y la de referencia, si se considera un sistema de células gemelas (principio *twin*) (Barthel, 1975):

$$\Delta V(t) = \varepsilon \Delta T(t) \quad (2.1)$$

Además, si se supone que el sistema funciona en un régimen en que es válida la ley de enfriamiento de Newton (diferencias pequeñas de temperatura y conductividad térmica constante), la diferencia de temperatura entre la célula de muestra y la de referencia será proporcional a la diferencia de flujos caloríficos que atraviesan las termopilas que forman parte de los sensores en cada célula, medida y referencia,  $\dot{Q}_S(t)$  y  $\dot{Q}_R(t)$ :

$$\dot{Q}(t) = \dot{Q}_S(t) - \dot{Q}_R(t) = \alpha \Delta T(t) \quad (2.2)$$

En un sistema *twin* ideal los efectos térmicos accidentales comunes a las dos células (agitación del contenido de las células, fluctuaciones de temperatura del foco, mezcla de reactivos según el tipo de experimento llevado a cabo, etc) se cancelan y la diferencia de flujo calorífico refleja únicamente los fenómenos que tienen lugar de forma exclusiva en la célula de medida (en este caso, la reacción sometida a estudio). Sin embargo, es necesario realizar experimentos blanco para corregir los efectos térmicos asociados a procesos tales como la dilución de algún reactivo y que en un único experimento real es imposible compensar pues el estado final en ambas células es diferente.

El calor total puesto en juego durante la reacción se calcula integrando el voltaje registrado (termograma) durante el régimen transitorio entre los instantes inicial y final del efecto térmico. Si el dispositivo se comporta linealmente, se verifican las relaciones de proporcionalidad anteriormente establecidas y, consecuentemente, existirá una correspondencia entre área del termograma y calor o entre diferencia de voltaje y potencia térmica. La constante de proporcionalidad entre estas magnitudes se denomina constante de calibración,  $K_{CAL}$ , y está directamente relacionada con la ganancia estática o ganancia en estado estacionario de la función de transferencia del sistema,  $K_0$ :

$$\begin{aligned}\Delta V(t) &= \frac{\varepsilon}{\alpha} \dot{Q}(t) = \frac{1}{K_{CAL}} \dot{Q}(t) \\ \int_1^2 \Delta V(t) dt &= \frac{\varepsilon}{\alpha} Q = \frac{1}{K_{CAL}} Q \\ K_{CAL} &= \frac{1}{K_0} = \frac{\alpha}{\varepsilon}\end{aligned}\quad (2.3)$$

Normalmente, las reacciones estudiadas se realizan en condiciones de presión constante (presión atmosférica). Por este motivo, el calor de reacción evaluado,  $Q_P$ , coincide con la variación de entalpía del proceso,  $\Delta H$ . También se puede calcular la constante de equilibrio,  $K$ , a partir de los datos experimentales. Incluso, en determinados procesos, tales como la unión de ligandos (pequeñas moléculas) a macromoléculas, es posible determinar la estequiometría de la reacción (*Freire et al., 1990; Wiseman et al., 1989*). A partir de estos parámetros, si se cumplen las condiciones para poder aplicar las herramientas que nos proporciona la Termodinámica Clásica del Equilibrio, podemos completar la caracterización energética de la reacción estudiada y obtener los restantes parámetros termodinámicos del proceso utilizando algunas de las ecuaciones siguientes:

$$\begin{aligned}\left(\frac{\partial(\Delta G/T)}{\partial T}\right)_P &= -\frac{\Delta H}{T^2} & \Delta S &= -\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial T}\right)_P \\ \Delta G &= -RT \ln K & \Delta S &= \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \\ \Delta C_P &= \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T}\right)_P & \Delta C_P &= T \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial T}\right)_P\end{aligned}\quad (2.4)$$

donde  $\Delta G$  es la variación de energía de Gibbs,  $\Delta S$  es la variación de entropía y  $\Delta C_P$  es la variación de la capacidad calorífica a presión constante en el transcurso de la reacción. Si no está permitido este tratamiento, por lo menos se tiene acceso al potencial termodinámico entalpía, opción que no está al alcance con otras técnicas analíticas.

Todo dispositivo de medida introduce un retraso en la respuesta respecto a la señal de entrada (Höhne, 1978; Schöborn, 1983; Heminger et al., 1984). Esto significa que en un microcalorímetro no registraremos la potencia real o termogénesis,  $W(t)$ , desarrollada en la célula, sino que surgirá una distorsión temporal en la señal (*smearing*) y registraremos una potencia aparente o termograma,  $\dot{Q}(t)$ , mediante un voltaje,  $\Delta V(t)$ , tal y como se ilustra en la Figura 2.2.

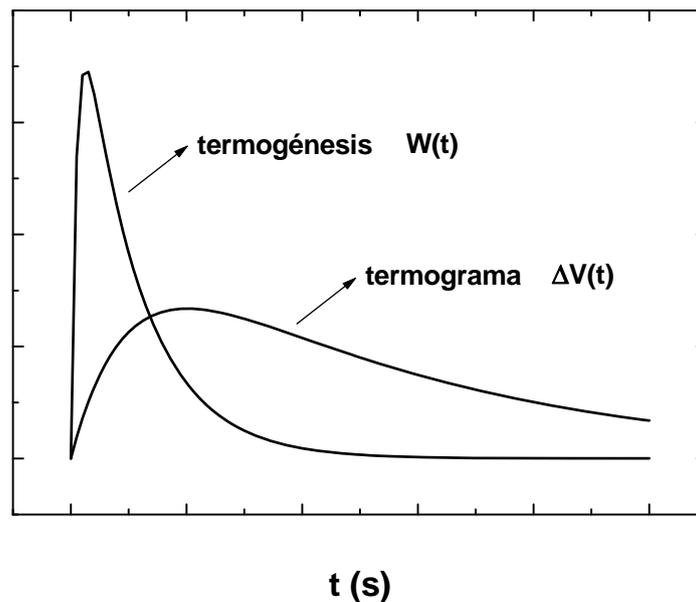


Figura 2.2. Relación temporal entre termograma,  $W(t)$ , y termogénesis,  $\dot{Q}(t)$  o  $\Delta V(t)$ .

Esto significa que la termogénesis,  $W(t)$ , no coincide exactamente con el termograma,  $\dot{Q}(t)$ , que es equivalente a  $\Delta V(t)$ . Por tanto, la relación existente entre  $\Delta V(t)$  y  $W(t)$  no es tan sencilla como la proporcionalidad entre  $\Delta V(t)$  y  $\dot{Q}(t)$  indicada en la ec. (2.3), sino que, en un sistema lineal invariante en el tiempo, se verifica la siguiente ecuación diferencial lineal con coeficientes constantes (Randzio et al., 1980):

$$\begin{aligned}
\sum_{i=0}^n N_i \frac{d^i \dot{Q}(t)}{dt^i} &= \sum_{i=0}^m M_i \frac{d^i W(t)}{dt^i} \\
\sum_{i=0}^n N_i \frac{d^i \Delta V(t)}{dt^i} &= \frac{1}{K_{CAL}} \sum_{i=0}^m M_i \frac{d^i W(t)}{dt^i} \quad n > m
\end{aligned} \tag{2.5}$$

siendo esta la ecuación básica aplicada en los métodos de deconvolución o corrección dinámica (obtención de la termogénesis a partir del termograma) en el dominio del tiempo.

Este fenómeno de deformación de la respuesta respecto a la señal de entrada está regido por un conjunto de constantes de tiempo o tiempos de relajación térmica característicos del dispositivo,  $\{\tau_i, \tau_j^*\}_{i=1, \dots, n; j=1, \dots, m}$ . Su significado físico está relacionado con el camino que recorre el flujo de calor desde la célula hasta el foco calorífico y las fronteras y discontinuidades existentes en él. En la ec. (2.5), las constantes  $N_i$  y  $M_i$  son funciones de estos tiempos característicos:

$$\begin{aligned}
N_0 &= 1 & M_0 &= 1 \\
N_1 &= \sum_{i=1}^n \tau_i & M_1 &= \sum_{i=1}^m \tau_i^* \\
N_2 &= \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \tau_i \tau_j & M_2 &= \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m \tau_i^* \tau_j^* \quad i < j \\
N_3 &= \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n \tau_i \tau_j \tau_k & M_3 &= \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^m \tau_i^* \tau_j^* \tau_k^* \quad i < j < k \\
&\vdots & &\vdots
\end{aligned} \tag{2.6}$$

Las constantes de tiempo instrumentales son enormemente importantes, ya que definen totalmente, junto con la constante de calibración, la función de transferencia del sistema,  $G(s)$ . Están relacionados directamente con los polos,  $-p_i$ , y ceros,  $-z_i$ , de dicha función y gobiernan el comportamiento dinámico del instrumento. La función de transferencia se obtiene a partir de la ec. (2.5) aplicando la técnica de la Transformada de Laplace y considerando condiciones iniciales nulas:

$$\Delta V(s) = G(s)W(s)$$

$$G(s) = K' \frac{\prod_{i=1}^m (s + z_i)}{\prod_{i=1}^n (s + p_i)} = \frac{1}{K_{CAL}} \frac{\prod_{i=1}^m (1 + \tau_i^* s)}{\prod_{i=1}^n (1 + \tau_i s)} \quad n > m \quad (2.7)$$

donde se supone que  $n$  es mayor que  $m$  para que el sistema sea causal y su respuesta impulso unitario esté acotada. La función de transferencia constituye una representación matemática del sistema microcalorimétrico que contiene toda la información sobre su comportamiento estático y dinámico. La ec. (2.7) es la ecuación básica para los métodos de deconvolución en el dominio de la frecuencia.

Normalmente, se considera un polinomio a lo sumo de grado tres en el denominador de la ec. (2.7). Se debe a que sólo es necesario especificar dos o tres de los tiempos característicos, ya que constituyen una sucesión fuertemente decreciente. El más importante es el mayor,  $\tau_1$ , denominado *constante de tiempo principal*, pudiendo ser considerado como un índice comparativo de eficiencia entre microcalorímetros.

Una caracterización exhaustiva del microcalorímetro deberá consistir en una determinación precisa de su función de transferencia. En este punto es importante establecer una distinción entre caracterización estática y dinámica (*Margas et al., 1993*). La primera está relacionada con la respuesta en estado estacionario y la sensibilidad estática (mínima potencia térmica detectada) y comprende la determinación de la constante de calibración y la relación señal-ruido, principalmente. La segunda está vinculada con la respuesta transitoria y la sensibilidad dinámica (mínima cantidad de calor detectada) y está dirigida a la obtención de las constantes de tiempo. Estos dos tipos de sensibilidades son, en cierto modo, independientes, ya que puede presentarse el caso de un microcalorímetro que posea una sensibilidad estática excelente, pero una pobre sensibilidad dinámica debido a que las constantes de tiempo son excesivamente grandes. Una vez conseguida una caracterización fiable, podremos predecir la respuesta del sistema a cualquier estímulo (señal de potencia térmica de entrada) y mejorar nuestro conocimiento sobre su comportamiento (ej. límites de estabilidad, límites de oscilación).

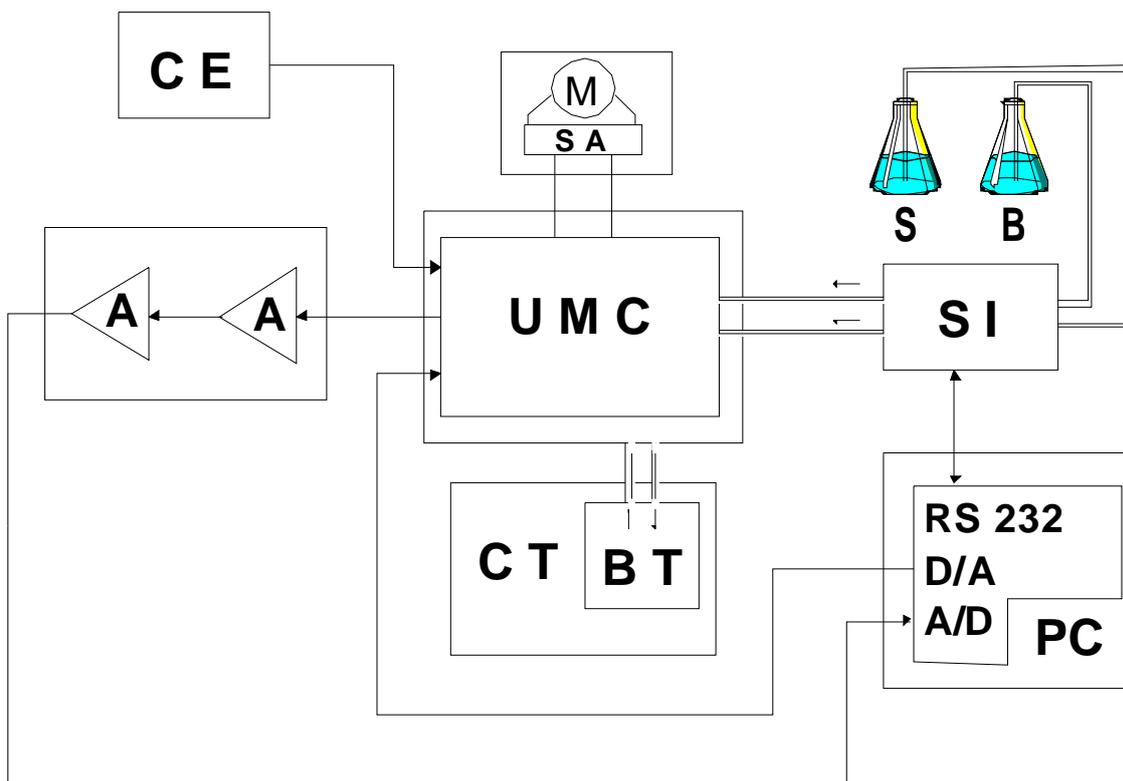
---

En microcalorimetría isotérmica de valoración la medida que interesa es el calor de reacción evaluado a través de la respuesta transitoria del instrumento; por consiguiente, la sensibilidad dinámica adquiere la mayor relevancia.

La presencia de constantes de tiempo elevadas representa una gran desventaja, ya que son un factor determinante para la sensibilidad dinámica (*Hansen et al. 1983; Margas et al., 1993a; Margas et al., 1993b*), el tiempo de experimento y la resolución temporal en un termograma (capacidad que posee el dispositivo de diferenciar en el tiempo dos sucesos). Con el propósito de reducir el retraso temporal en la respuesta debido a dichas constantes se incluye un sistema de compensación de potencia en el diseño del microcalorímetro. El objetivo de dicho sistema es evacuar de forma más eficaz el calor liberado en la reacción si ésta es exotérmica o, por el contrario, suministrar calor si la reacción es endotérmica. Se genera así un flujo extra de calor con el que se intenta restablecer más rápidamente el equilibrio térmico (línea base). Entonces, podemos distinguir dos modos de transferencia de calor simultáneos: transferencia pasiva a través de los sensores de temperatura, es decir, a través del sistema de medida, y transferencia activa, por medio del sistema de compensación de potencia. Este sistema modificará adecuadamente la función de transferencia del sistema global (compensación) (*Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996; Distefano et al., 1992*); concretamente, alterará los valores de las constantes de tiempo. Como se comprobará más adelante, el sistema de compensación de potencia tiene una influencia decisiva sobre el comportamiento del microcalorímetro, incrementando la sensibilidad, disminuyendo el tiempo de respuesta y minimizando los errores de cálculo en la evaluación de áreas (picos de señal más estrechos y acentuados). En definitiva, mejora la eficiencia global del sistema microcalorimétrico.

Hasta aquí se ha hecho una exposición breve sobre los aspectos más relevantes relativos a los fundamentos del método de medida en microcalorimetría isotérmica de valoración. En el resto del capítulo se va a abordar una descripción detallada de cada uno de los componentes principales del sistema microcalorimétrico. Habría que resaltar que, excepto la unidad de inyección, todo el sistema ha sido diseñado y construido en su

totalidad en los laboratorios del Departamento de Física Aplicada, en colaboración con el Departamento de Química Física, de la Universidad de Granada. Asimismo, el software empleado en la gestión y control de experimentos también ha sido desarrollado íntegramente. En la *Figura 2.3* se representa un diagrama de bloques del dispositivo.



*Figura 2.3.* Diagrama de bloques del sistema microcalorimétrico.

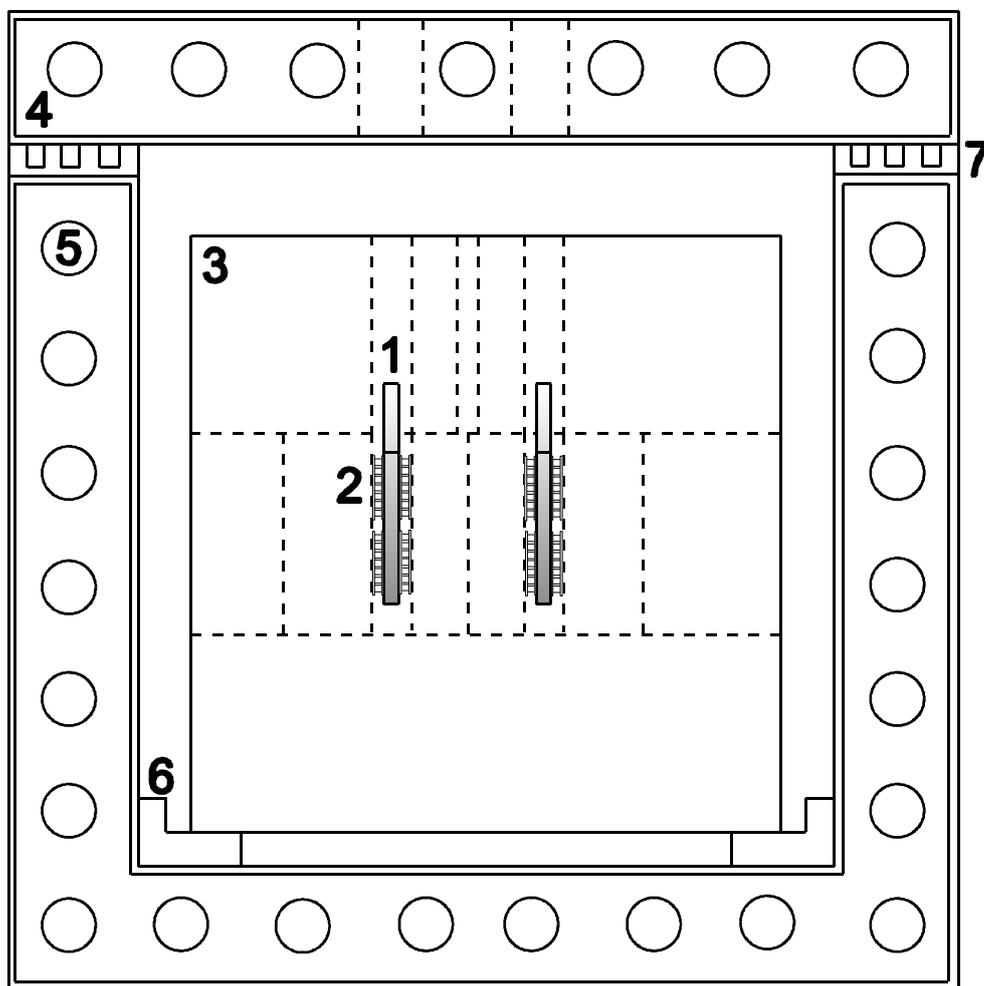
|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>UMC</b>      | unidad microcalorimétrica.                                       |
| <b>A</b>        | etapas de amplificación de la señal.                             |
| <b>PC</b>       | ordenador personal.  |
| <b>SI, S, B</b> | sistema de inyección y reactivos.                                |
| <b>CT, BT</b>   | control de temperatura y baño termostático.                      |
| <b>CE</b>       | fFuente de corriente para experimentos de calibración eléctrica. |

**M, SA** motor y sistema de agitación.

## 2.1. Unidad microcalorimétrica.

El elemento principal del dispositivo es la unidad microcalorimétrica. Básicamente consiste en: células de muestra y referencia, sensores de temperatura, foco calorífico y

coraza externa. En la *Figura 2.4* se muestra un esquema general del microcalorímetro:



*Figura 2.4.* Sección transversal del microcalorímetro.

- 1** célula de oro de 24 quilates
- 2** termopila de semiconductor
- 3** foco calorífico (bloque de aluminio)
- 4** doble coraza externa (acero inoxidable)
- 5** serpentín (cobre)
- 6** soporte anular (baquelita)
- 7** guías para los tubos de conducción de reactivos

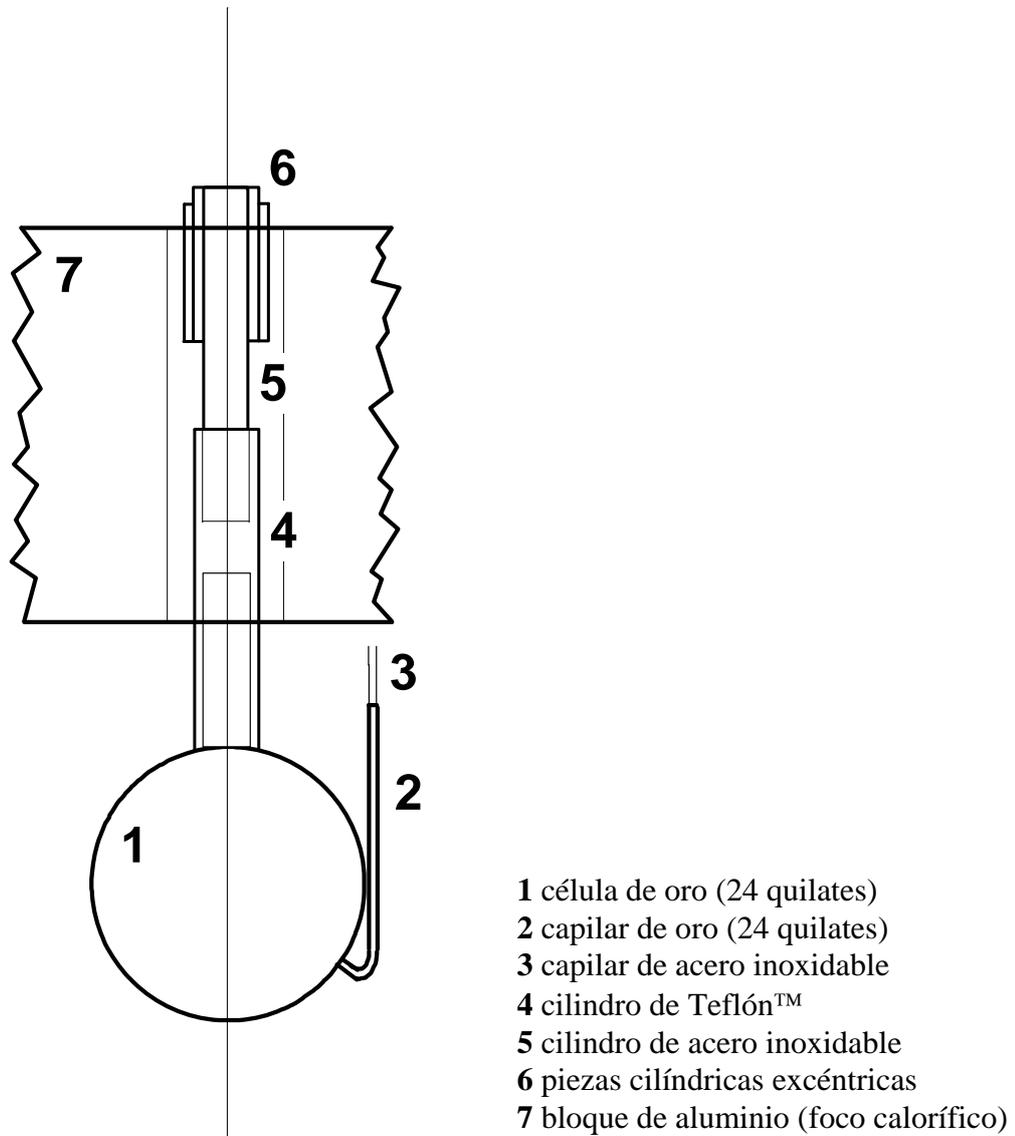
Ya se ha mencionado que el diseño está basado en el principio de células gemelas (*twin*). Se han fabricado dos células idénticas con oro de 24 quilates. Es importante que las células estén constituidas por un material inerte y de elevada conductividad térmica (usualmente, oro o platino). Las razones son obvias: no deben existir reacciones colaterales entre los reactivos y dicho material, no debe haber demasiadas limitaciones serias en

cuanto a la utilización de agentes limpiadores y no se debe crear una barrera importante respecto a la transferencia de calor. Asimismo, ante un efecto térmico originado en el interior de la célula y la consiguiente variación de temperatura, se debe establecer una distribución de temperaturas lo más uniforme posible en la pared de cada célula. De todas formas, aunque se produjese una distribución de temperaturas no uniforme, se ha demostrado que, si se mide la temperatura media en dicha pared, se puede aplicar el mismo tratamiento y consideraciones que son válidas en el caso ideal correspondiente a una distribución uniforme (*Tanaka, 1987; Tanaka, 1992*).

Las células tienen forma de disco (37 mm de diámetro y 6 mm de grosor) con un cuello cilíndrico (6 mm de diámetro y 21.7 mm de altura) (véase la *Figura 2.5*). La distancia entre las caras es de 5 mm y el grosor de la pared es de 0.5 mm. De este modo, tanto las dimensiones geométricas como la conductividad térmica del material empleado ( $318 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) son apropiadas para una rápida transferencia de calor desde el interior de la célula hacia el foco calorífico. Sobre el cuello de la célula se coloca una pieza cilíndrica de Teflón™ y sobre ésta, una pieza cilíndrica de acero inoxidable, que servirá de guía para el agitador. La finalidad de la primera es evitar el contacto térmico de la célula con la segunda, ya que el cilindro de acero va a estar en contacto con el foco calorífico. Se utilizan unas piezas cilíndricas excéntricas de aluminio para fijar la posición y alinear el tubo de acero.

El volumen efectivo de la célula es de 5 ml, considerablemente mayor que el volumen de inyección, que será del orden de 10-20  $\mu\text{l}$ . En un experimento no será necesario realizar correcciones debidas a la variación de las propiedades físicas del interior de la célula, ya que serán insignificantes. El agitador se introduce por el cuello y la inyección de reactivo valorante se realiza mediante un capilar de oro (0.5 mm de diámetro) acoplado a la célula que se inserta en la parte inferior de la célula a través de un orificio en la pared y formando un ángulo de  $30^\circ$  respecto del eje vertical. Alrededor de la pared lateral de la célula se encuentra enrollado un hilo de elevada resistencia eléctrica (*molecular wire*) utilizado en los experimentos de calibración eléctrica. La resistencia total del hilo se ha medido cuidadosamente resultando ser de  $161.95 \Omega$ . En estos experimentos se hace pasar una intensidad de corriente definida a través de dicha resistencia. Para este

propósito se empleará una fuente de corriente programable (KEITHLEY 220 PROGRAMMABLE CURRENT SOURCE).



*Figura 2.5.* Esquema del tipo de célula empleado.

Las células están inmersas y dispuestas simétricamente en un baño térmico o foco calorífico. Consiste en un gran bloque cilíndrico de aluminio (180 mm de diámetro y 150 mm de altura) con una masa de 10 Kg y capacidad calorífica de  $9000 \text{ JK}^{-1}$ , aproximadamente (véase la *Figura 2.6*).

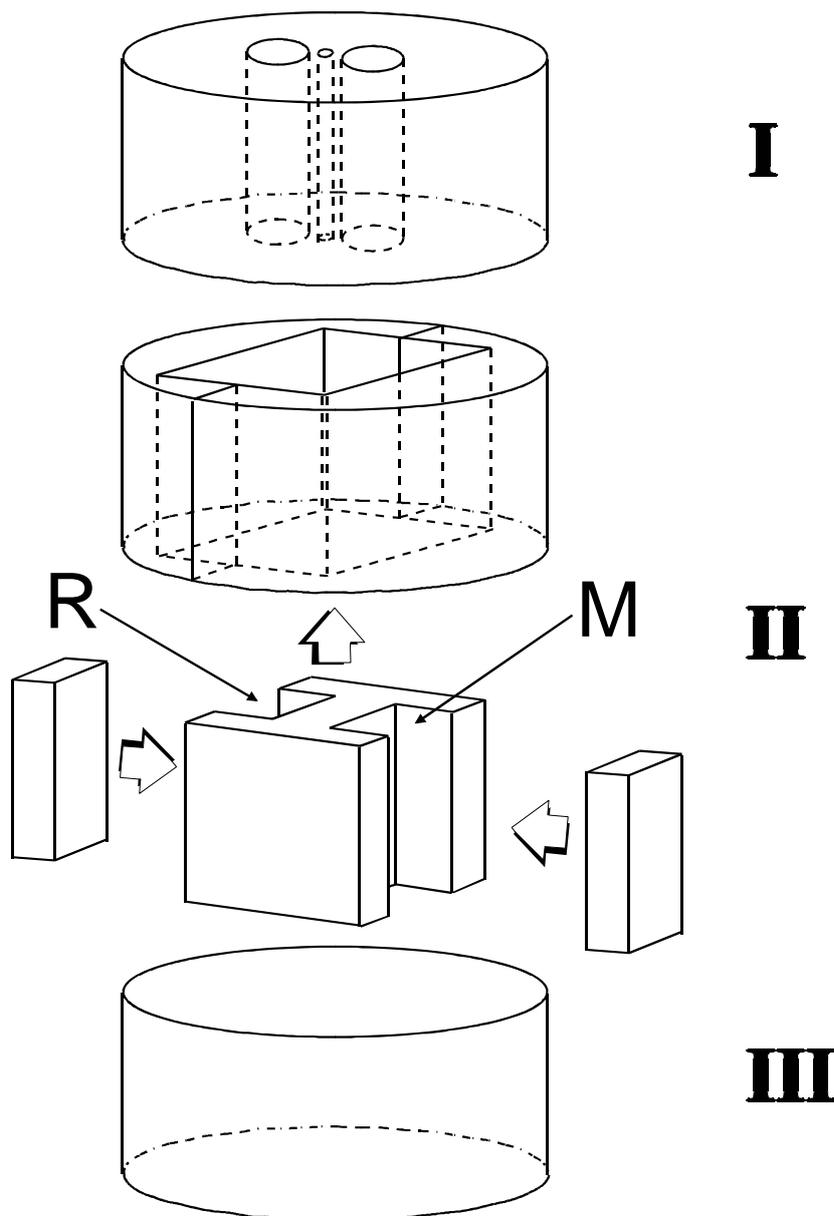


Figura 2.6. Despiece del bloque de aluminio que constituye el foco calorífico.

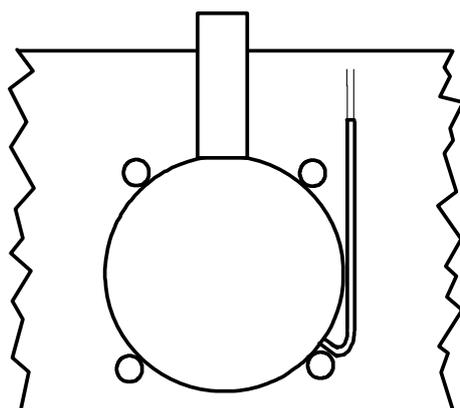
**I, II y III** bloques de aluminio superior, intermedio e inferior

**R, M** localización del conjunto sensor-célula de referencia y medida

Este bloque actuará como un termostato, ya que su temperatura, que sirve de referencia para ambas células, apenas variará cuando participe en procesos de transferencia de calores del orden de 1 mJ o menores. Dado que el sistema opera en modo diferencial, aunque se produzca un cambio en dicha temperatura, éste quedará cancelado y no afectará a la medida. El bloque de aluminio está constituido por tres elementos cilíndricos apilados (50 mm de altura). Las piezas superior e inferior son iguales, salvo por tres orificios

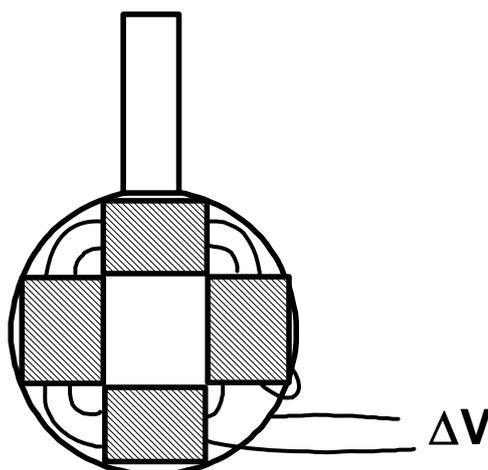
---

practicados en la primera, dos de ellos por donde se comunican con el exterior las dos células y otro por donde emergen los cables que portan la señal de medida, la señal de compensación y la señal eléctrica de calibración. En la pieza intermedia, que a su vez está integrada por varios elementos ensamblados, se localizan las células. Cada célula está sujeta mediante las termopilas en los huecos de la pieza central en forma de H y su desplazamiento lateral se impide con 4 piezas pequeñas cilíndricas de Teflón™ atornilladas al bloque de aluminio (véase la *Figura 2.7*). El tubo (capilar de acero inoxidable) de conducción del reactivo valorante hacia la célula realiza un recorrido por el interior del foco calorífico para que este reactivo se termostate (véase la *Figura 2.17*). Todos los acoplamiento entre las piezas que integran el bloque de aluminio se realizan mediante tornillos tipo Allen y el buen contacto térmico se garantiza con pasta de silicona térmica.



*Figura 2.7.* Apoyos de Teflón™ para la colocación de las células.

La trayectoria principal que recorre el flujo de calor entre célula y foco calorífico atraviesa un conjunto de termopilas de semiconductor (elementos Peltier), existiendo 4 en cada cara de célula (véase la *Figura 2.8*). Ya se mencionó anteriormente que, aunque puede haber pérdidas de calor (radiación, convección, conducción a través de los hilos que



portan la señal), si éstas son uniformes y suponen un porcentaje más o menos constante del total quedarán englobadas en la constante de calibración del dispositivo. Con el diseño adoptado aquí las pérdidas representan una porción desdeñable, ya que los sensores cubren una gran parte de la superficie de la célula y las diferencias de temperatura producidas son muy pequeñas (del orden de  $10^{-6}$  K).

*Figura 2.8.* Disposición de las termopilas de medida en cada cara de célula.

Cada termopila (MELCOR FC 0.45-66-05L) posee 66 uniones de semiconductor ( $\text{Bi}_2\text{Te}_3$ ) y se emplea como sensor de temperatura o de flujo de calor. Cuando existe una diferencia de temperatura entre sus dos caras o es atravesada por un flujo calorífico genera una fuerza electromotriz proporcional a dicha diferencia, en virtud del efecto Seebeck (véase la *Figura 2.9*). La constante de proporcionalidad se denomina coeficiente Seebeck y es característica del material constituyente de la termopila. En principio, este coeficiente depende de la temperatura, pero las variaciones de temperatura a las que serán sometidas las termopilas son del orden de  $10^{-6}$  K. Además, las termopilas empleadas como sensores no introducirán un retraso apreciable en la respuesta, ya que el tiempo característico del fenómeno termoeléctrico es menor que el tiempo característico relacionado con la conducción de calor. Si se supone válida la ley de enfriamiento de Newton, este voltaje generado será también proporcional al flujo de calor que se transfiere. Las termopilas correspondientes a una misma célula se disponen en serie eléctricamente y térmicamente en paralelo, situadas entre la pared externa de la célula y el foco calorífico. Con el fin de asegurar un perfecto contacto térmico de las caras de cada termopila con ambas paredes, se ha empleado pasta de silicona térmica como sellante de contacto.

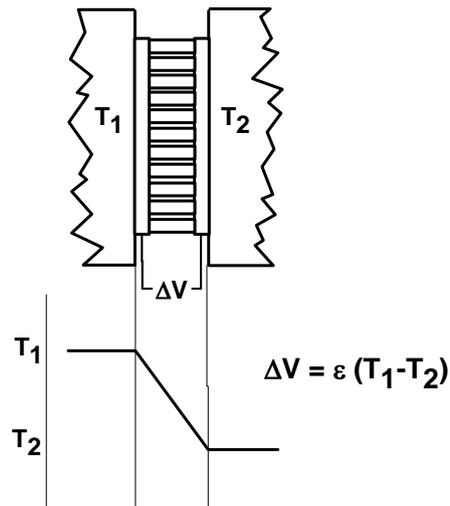


Figura 2.9. Funcionamiento básico de una termopila.

Surge en este momento una cuestión relativa a la organización espacial de las termopilas de medida sobre la pared de la célula. Se comprobará más adelante que: A) es aconsejable emplear un número de termopilas tan elevado como sea posible, sólo limitado por el espacio utilizable, ya que decrecen las constantes de tiempo instrumentales y la ganancia en estado estacionario del dispositivo permanece invariable. B) no es aconsejable disponer las termopilas en serie térmicamente, porque la ganancia en estado estacionario aumenta, pero las constantes de tiempo aumentan en un factor aún mayor. Así, en el primer caso la sensibilidad dinámica se ve mejorada, pero en el segundo caso empeora de forma muy señalada.

Debido a que las células son delgadas (espesor interno de 5 mm) y el grosor de las termopilas empleadas es de 2.4 mm, el flujo de calor transferido desde éstas hacia el foco calorífico se puede considerar como unidimensional y bidireccional. Este diseño está muy próximo a la condición de máxima sensibilidad posible, en lo que concierne a las propiedades geométricas y dimensiones del sistema, en un microcalorímetro unidimensional con tres dominios (Tanaka, 1983):

$$\begin{aligned}
 \text{sensibilidad} &\propto L(L_0 - L) \\
 \text{máx}_L \{ \text{sensibilidad} \} &\propto \frac{L_0}{4} \Leftrightarrow L = \frac{L_0}{2}
 \end{aligned}
 \tag{2.8}$$

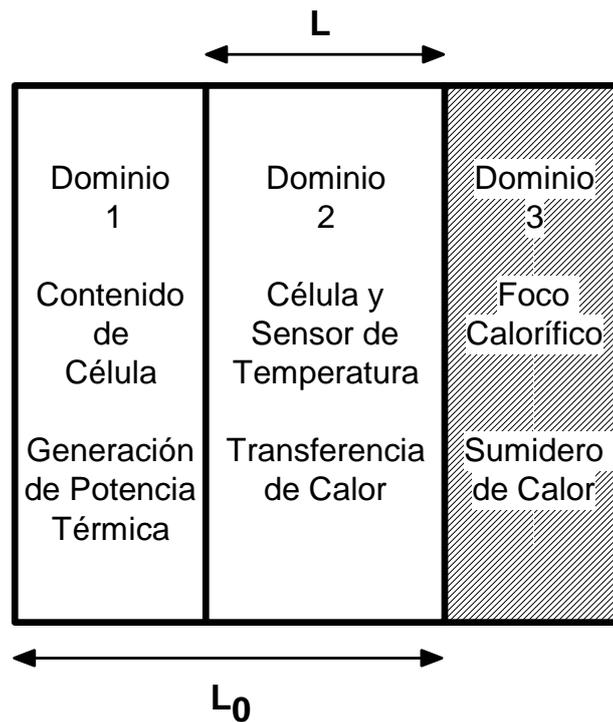
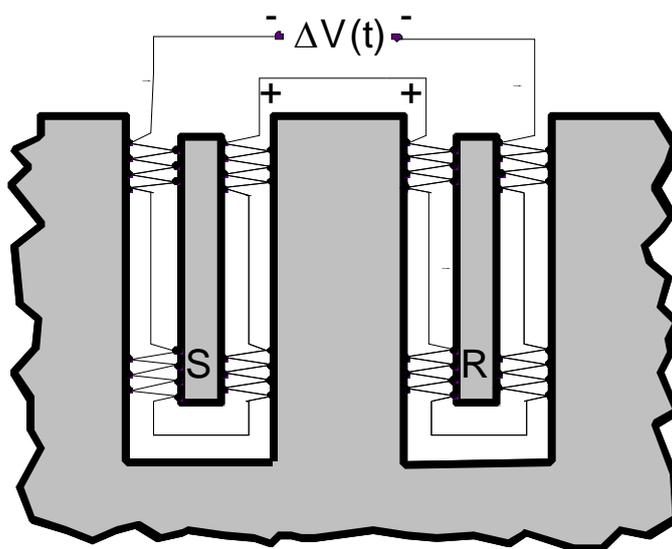


Figura 2.10. Diagrama de dominios en un microcalorímetro.

donde  $L$  es la suma de los espesores de la pared de la célula y del sensor de temperatura y  $L_0$  es la suma de los espesores del sensor y de la célula (en este caso, de la mitad de la célula, ya que la transferencia de calor se realiza en sentidos opuestos desde plano de simetría de la célula), según se indica en la Figura 2.10. En nuestro caso,  $L$  y  $L_0$  poseen un valor de 2.9 mm y 5.4 mm, respectivamente. Hay que tener en cuenta que es conveniente que  $L$  y  $L_0 - L$  no sean demasiado grandes para que haya una transferencia rápida de calor, pero en  $L_0 - L$  debe quedar espacio suficiente para incluir un agitador con el fin de homogeneizar el contenido de la célula. Asimismo,  $L$  es fijo, ya que se sabe que no es aconsejable acoplar en serie térmicamente las termopilas. Por tanto, hay que establecer un compromiso entre estos intereses.

Los dos conjuntos de termopilas de cada célula se conectan eléctricamente en oposición (véase la *Figura 2.11*). La señal que se mide es la diferencia entre los voltajes globales producidos por cada uno de forma independiente. En un sistema *twin* esta diferencia de voltajes es proporcional a la diferencia de temperatura entra ambas células y, consecuentemente, a la diferencia de flujos caloríficos que atraviesan las paredes de ambas células. Los efectos térmicos secundarios (fluctuaciones de temperatura del foco, mezclado, agitación, etc) producirán contribuciones al voltaje que se cancelarán y la señal medida representará el flujo calorífico debido únicamente a la reacción desarrollada en la célula de medida. En un dispositivo real no se consigue una cancelación perfecta, pero cuanto más se aproxime a un sistema completamente simétrico, tanto menores serán las las señales artefactuales no deseadas.



*Figura 2.11.* Detalle de la disposición de células y termopilas de medida.

Con la intención de minimizar las posibles fluctuaciones del foco calorífico, todo el conjunto descrito anteriormente se encuentra encerrado por una doble coraza cilíndrica externa de acero inoxidable. La misión de este elemento es la de crear un entorno cuasi-adiabático en el interior manteniendo esta pared a la misma temperatura que la unidad microcalorimétrica. El bloque de aluminio que constituye el foco calorífico no se encuentra en contacto directo con esta coraza, sino que se apoya en una pieza anular de baquelita y existe una separación de algunos centímetros entre foco y coraza. Además, la coraza está

recubierta completamente por una capa de polímero expandido de unos 5 cm de espesor. Los cables que portan las señales, los tubos que conducen la muestra que se va a inyectar y el eje del sistema de agitación atraviesan la pared de la coraza por medio de pequeños orificios. En el interior de coraza doble hay dos elementos que participan en la tarea de conseguir una pared a temperatura constante: una cantidad notable de agua estancada (8 litros, más o menos) y un serpentín de cobre por el que transita el agua bombeada por el circulador del baño termostático.

## **2.2. Sistema de adquisición de datos.**

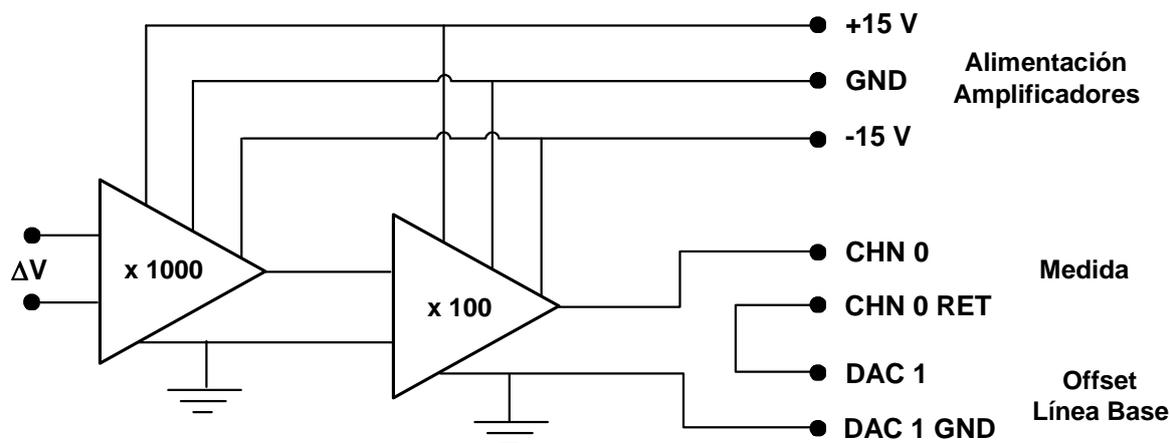
La señal de medida, diferencia de voltajes producidos por los sensores de cada célula, es siempre menor que 0.01 mV. Con una señal tan pequeña las perturbaciones originadas por campos electromagnéticos externos pueden ser substanciales. Por este motivo, hay que tomar dos precauciones. En primer lugar, la señal es amplificada en dos etapas mediante dos amplificadores de elevadas prestaciones (BURR-BROWN INA 103), con una ganancia global de  $10^2 \times 10^3$ , que se ubican en el interior del microcalorímetro (de este modo, la misma coraza externa actúa apantallando el interior, como una *caja de Faraday*). En segundo lugar, los cables que portan la señal desde la coraza hasta el dispositivo de adquisición de datos están cuidadosamente apantallados con una densa malla metálica conectada a tierra (Weichert, 1983; Moore et al., 1983). La colocación del amplificador dentro de la coraza lo protege de variaciones de temperatura, minimizando las derivas térmicas. Se debe tener la precaución de establecer un buen terreado de todos los elementos del dispositivo y de las señales para evitar señales artefactuales en el sistema (Weichert, 1983; Moore et al., 1983).

La señal de voltaje amplificada es digitalizada a través de un conversor analógico-digital (ADC) de 16-bits de resolución de una interfaz de propósito general (DATA TRANSLATION DT2805/5716) conectada a un ordenador personal (PC 80386). Este ordenador personal controla todo el dispositivo experimental a través de un soporte de software elaborado en C++. Los datos experimentales, junto con la información relativa a

cada experimento, son almacenados en ficheros de datos tipo ASCII para su posterior tratamiento.

El programa desarrollado realiza de forma automática la de adquisición de datos y controla de forma interactiva todo el proceso de medida. En lo que se refiere a la adquisición de datos, mediante este programa se selecciona el canal de medida analógico y la ganancia con que opera el conversor A/D, el intervalo de muestreo, el tiempo total de medida, el *offset* de línea base, el nombre del fichero de almacenamiento y los datos experimentales.

En la *Figura 2.12* puede verse un esquema de la configuración de este sistema de adquisición de datos. Aunque el conversor A/D posee 8 canales diferenciales bipolares, únicamente se emplea uno para la adquisición de datos. Además, la interfaz contiene dos conversores digital-analógico (D/A) bipolares. Uno se utiliza en el sistema de compensación de potencia (véase la sección 2.4) y el otro para eliminar el *offset* (separación) de línea base, de modo que ésta se sitúe siempre cercana a un valor de cero. Si bien este hecho en un calorímetro convencional no es importante, en un microcalorímetro con compensación de potencia sí lo es. En dicho dispositivo opera un lazo de retroalimentación con una señal actuante que es no nula siempre que haya una señal detectada. Si el *offset* de línea base es considerable, el sistema de compensación siempre estará sobreactuando.

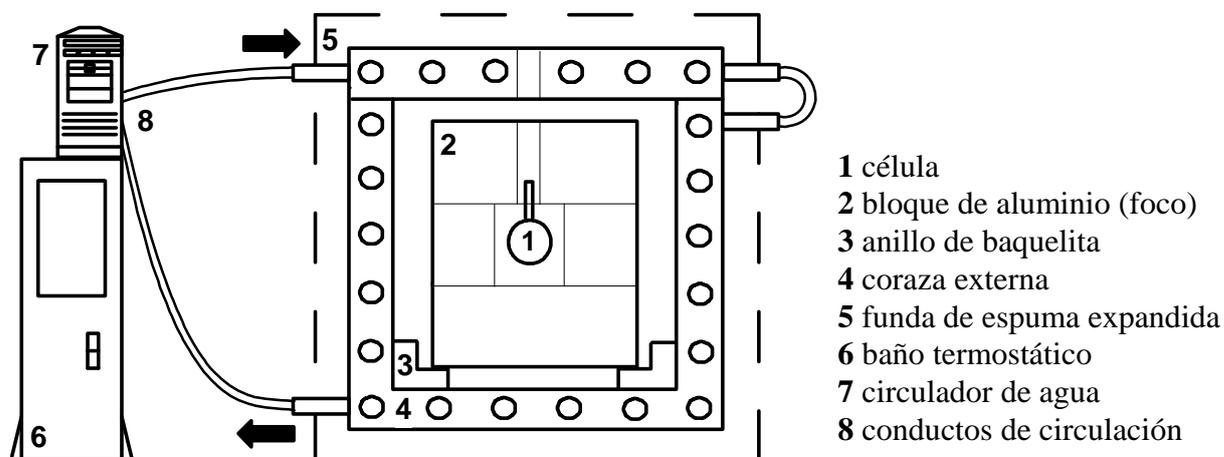


*Figura 2.12.* Diagrama del circuito de adquisición de datos.

### 2.3. Control de temperatura.

Una buena estabilidad de la línea base es imprescindible para minimizar los errores de cálculo en la evaluación de áreas en un termograma (*Sanahuja, 1985; Fujieda et al., 1991; El Harrous et al. 1994a*). Con la finalidad de asegurar dicha estabilidad se emplea un sistema de control de temperatura.

El sistema de control de temperatura se ha establecido en dos niveles. El primero consiste en el acondicionamiento como laboratorio de microcalorimetría de una habitación aislada y termostatazada ( $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) con la ayuda de un sistema de circulación aire programable. En un segundo nivel se halla implicado un baño termostático de agua (HETOTHERM<sup>®</sup> DT CIRCULATOR y DT COOLING BATH). El agua bombeada a la temperatura requerida circula por el interior de la coraza externa a través del serpentín de cobre. Además, el agua estancada dentro de dicha coraza aumenta la inercia térmica del conjunto. La estabilidad de la temperatura del baño es del orden de  $\pm 0.005^{\circ}\text{C}$ . Como se comentó anteriormente, la funda de espuma expandida que recubre toda la coraza externa contribuye a reducir los gradientes de pérdida de calor y aumenta aún más la estabilidad. En la *Figura 2.13* se puede ver un esquema del sistema de control de temperatura.



*Figura 2.13.* Diagrama del sistema de control de temperatura.

---

Es importante recordar que no hay contacto directo entre el foco calorífico (bloque de aluminio) y la coraza externa. Esto hace que las posibles fluctuaciones en la temperatura de esta última sean atenuadas y la estabilidad de la línea base se mejore en un factor de 5000, como se mostrará más tarde, respecto a la estabilidad de la temperatura del baño termostático.

## **2.4. Sistema de compensación de potencia.**

El objetivo del sistema de compensación de potencia es reducir las constantes de tiempo, lo que se traducirá en una mejora considerable de su eficacia global. En este sentido, se puede considerar que es el elemento capital del sistema microcalorimétrico. Es conocido que en un sistema de configuración fija (las posiciones relativas y materiales constituyentes de sus elementos son invariables) y, por tanto, con parámetros de funcionamiento fijos, éstos pueden ser alterados por medio de un elemento compensador. Lo que se consigue a través de la compensación es la modificación de la función de transferencia del dispositivo (*Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996; Distefano et al., 1992*).

La compensación se realiza mediante un sistema de control digital localizado en una trayectoria de retroalimentación, por lo que se denomina *compensación por retroalimentación*. El mismo ordenador que controla la adquisición de datos y la inyección de reactivos es el elemento controlador que proporciona la señal de retroalimentación (señal de compensación) generada por un algoritmo de control digital implementado en el programa general de medida y control del dispositivo. Esta señal consiste en un voltaje,  $\Delta V_C(t)$ , generado por uno de los dos conversores digital-analógico (DAC) de 12 bits de resolución existentes en la interfaz de propósito general acoplada al ordenador (véase la *Figura 2.14*). Dicho voltaje es enviado a un conjunto de termopilas (una en cada cara de célula, según se indica en *Figura 2.15*), conectadas en serie y situadas junto con las termopilas de medida, entre la pared externa de cada célula y el foco calorífico. Constituyen los actuadores de compensación, independientes de los sensores de

temperatura. Estas termopilas son idénticas a las empleadas como sensores y originan un flujo de calor extra,  $W_p(t)$ , mediante efecto Peltier con el que se pretende restablecer más rápidamente el equilibrio térmico (línea base):

$$W_p(t) = \pi I(t) = \pi \frac{\Delta V_C(t)}{R} \quad (2.9)$$

$$\pi = \varepsilon T$$

donde  $R$  es la resistencia eléctrica del conjunto de termopilas de compensación,  $I$  es la intensidad de corriente que se les suministra,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\pi$  es el coeficiente Peltier, característico del material constituyente de las termopilas. De este modo, dependiendo de que el efecto térmico desarrollado en la célula sea endotérmico o exotérmico, el sistema de compensación suministra o evacua una cantidad definida de calor.

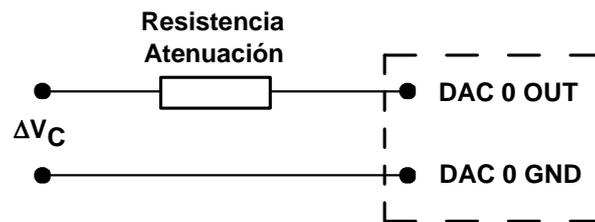


Figura 2.14. Diagrama del circuito de compensación.

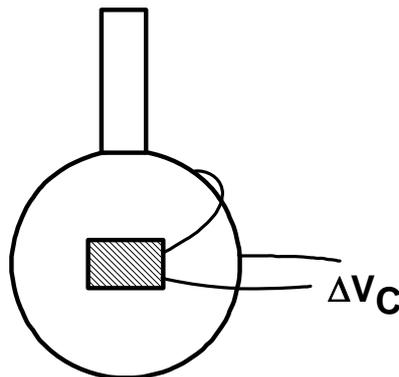


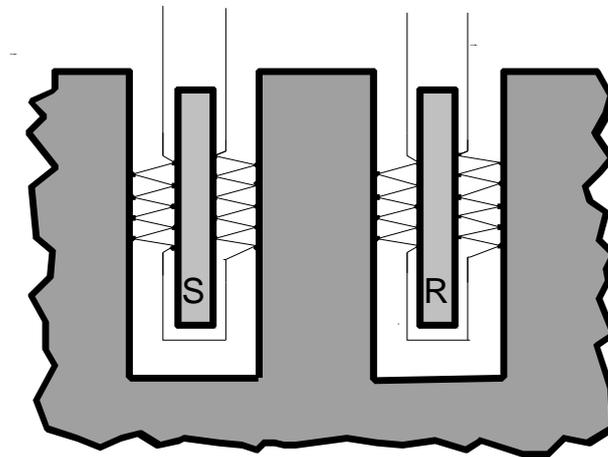
Figura 2.15. Colocación de las termopilas de compensación.

Las termopilas de compensación no producen ningún efecto cuando el dispositivo opera bajo un régimen sin compensación, ya que se envía un voltaje de compensación nulo a dichas termopilas, forzando que la diferencia de temperatura entre sus caras sea

---

prácticamente nula y que, por tanto, no se produzca transferencia de calor a través de ellas.

La compensación por retroalimentación se lleva a cabo bilateralmente, según se observa en la *Figura 2.16*. Hay dos trayectorias simétricas de retroalimentación que actúan en cada célula, pero el efecto es de signo contrario en cada una, siendo la transferencia de calor activa en sentidos opuestos. Así, una vez generado el voltaje de retroalimentación, se envía con distinta polaridad a las termopilas de compensación de cada célula. Este modo de compensación, aunque es formalmente idéntico al unilateral, presenta algunas ventajas interesantes: 1) contribuye a una mayor simetría en el dispositivo experimental (se debe recordar que todo el diseño está basado en el principio *twin* y se requiere una total simetría entre las secciones de medida y de referencia); 2) provoca un menor desequilibrio térmico entre las dos células; 3) la producción de potencia Joule por parte de las termopilas de compensación, aunque muy pequeña (varios órdenes de magnitud) comparada con la potencia Peltier, se cancela al ser un efecto simultáneo en ambas células e independiente del signo del voltaje; 4) garantiza una mayor igualdad de las constantes de calibración para efectos exotérmicos y endotérmicos. De una forma resumida, se podría decir que el sistema de compensación trabaja como una bomba térmica bidireccional.



*Figura 2.16.* Detalle de la disposición bilateral del sistema de compensación.

El voltaje de retroalimentación debe ser, por definición, función del voltaje medido. El tipo de control utilizado es el que determina qué tipo de dependencia existe entre estas dos señales. Además, el tipo de control es el punto clave de funcionamiento del

dispositivo, ya que es el que determina la modificación de la función de transferencia de la configuración básica. Se puede hacer uso de diferentes controles, pero existen algunas restricciones generales sobre ellos: deben mantener estabilizada la línea base y el área bajo la curva de un termograma debe ser proporcional al calor implicado en el efecto térmico registrado o la señal de voltaje debe ser proporcional a la potencia térmica instantánea desarrollada. Ésta última condición no es ni más ni menos que la propiedad de linealidad. En principio, en un sistema de medida no es imprescindible que se verifique dicha linealidad, pero sí lo es si queremos que el tratamiento de los datos sea sencillo y el desarrollo de un modelo acerca del dispositivo sea practicable. En nuestro caso, si esperamos que las relaciones válidas en el sistema sin compensación (en cuanto a la evaluación del calor y relaciones de proporcionalidad entre voltaje, diferencia de temperaturas y flujos de calor) se conserven en el sistema operando bajo compensación, debe mantenerse la linealidad en todos los componentes del sistema microcalorimétrico.

Bajo estas suposiciones, el control ideal es un control lineal que permite grandes deflexiones de la línea base cuando se produce un efecto térmico (elevada ganancia estática de la función de transferencia y buena relación señal ruido) y hace posible un retorno rápido hacia el equilibrio (constantes de tiempo pequeñas). La relación lineal más simple es la proporcionalidad, por lo que el control proporcional es el más extendido. Sin embargo, estas dos propiedades antes mencionadas entran en conflicto con este tipo de control. En este trabajo de investigación se ha desarrollado un nuevo método de medida basado en el control proporcional-integral que constituye una mejor aproximación al control ideal, presentando numerosas ventajas frente al proporcional (*Velázquez Campoy et al., 1998a*). También se mostrará que el control proporcional-derivativo apenas produce una mejora substancial respecto al proporcional.

El sistema de compensación actuará siempre que el sistema esté fuera del equilibrio térmico, es decir, mientras haya una diferencia de temperatura no nula entre las dos células y no se alcance la línea base. Sin embargo, la línea base no siempre estará localizada en el cero y existirá una cierta desviación (*offset*). Esto se debe a que, aunque dicha diferencia de temperaturas sea cero realmente, los sensores de temperatura no son totalmente idénticos y puede haber una diferencia neta entre los voltajes generados por ellos. Para

---

evitar que el sistema de compensación actúe en este caso sería conveniente poder situar la línea base siempre en cero. Una solución es incorporar en el algoritmo de control, es decir, en la dependencia entre señal de medida y señal de compensación, un término adicional para tener en cuenta este hecho. Pero esto alteraría las temperaturas de ambas células, ya que se estaría disipando una potencia térmica de compensación correspondiente a dicho término adicional y se estaría creando un desequilibrio entre ambas células para corregir una situación de equilibrio. Por ello, es más adecuado y sencillo emplear el convertor D/A restante de la interfaz para generar un voltaje contrario al *offset* de línea base y llevarla hasta el nivel cero.

Los parámetros de ajuste del sistema de control se pueden variar fácilmente a través de software en el programa general de operación. Esta es una de las ventajas de emplear control digital. Los beneficios derivados de la utilización de un sistema de control digital comparados con el control analógico ya fueron expuestos con anterioridad en la Introducción de esta Memoria. Mediante el programa general de operación se seleccionan los valores de los parámetros de control, es decir, se define de forma explícita la relación entre señal de medida y señal de retroalimentación. Esto permite un ajuste de control muy sencillo, de forma que el usuario puede adquirir un conocimiento amplio rápidamente del efecto de la compensación y de los distintos controles posibles sobre el funcionamiento del dispositivo.

Debido a que la señal de medida se amplifica con un factor de ganancia de  $10^5$ , la señal de compensación no puede ser enviada directamente a las termopilas de compensación y debe ser atenuada. Hay que tener en cuenta además que se utilizan 8 termopilas de medida y dos de compensación en cada célula. Esta atenuación no se puede llevar a cabo mediante la inclusión de un factor en el algoritmo de control de compensación debido a la diferente resolución que poseen el convertor A/D del sistema de medida (16 bits) y el convertor D/A del sistema de compensación (12 bits). Para resolver el problema, se intercala una resistencia eléctrica (9 K $\Omega$ ) entre el convertor D/A y las termopilas de compensación (véase la *Figura 2.14*), de modo que la relación entre el voltaje entre los extremos de dichas termopilas y el voltaje entre los bornes del convertor es de 0.02, teniendo el factor de atenuación un valor de 500. En el desarrollo posterior del

modelo microcalorimétrico este factor será incluido en la función de transferencia de retroalimentación, englobado en los parámetros de control.

Aparte de las ventajas, ya mencionadas en la Introducción, que aporta la compensación Peltier cuando se compara con la compensación Joule, surge otra diferencia importante basada en la capacidad que posee un elemento Peltier de trabajar como bomba de calor bidireccional. Una resistencia eléctrica únicamente puede liberar calor, pero puede comunicar una potencia calorífica mayor o menor. En la compensación Joule, es necesario establecer una potencia constante de referencia para el sistema de control. De esta manera, cuando se produzca el efecto térmico, el sistema de control ordenará que se disipe más o menos potencia en las resistencias de compensación, en función de la separación respecto de la línea base. Esto tiene dos inconvenientes (*Wadsö, 1997a; Wiseman et al., 1989*):

- La potencia de referencia se debe elegir antes del experimento basándose en una estimación del calor que se va a originar en la reacción bajo estudio. Si la estimación es errónea por defecto, llegaría un momento, durante el transcurso de una reacción exotérmica en el cual la potencia se anula y no sería posible compensar el calor de reacción en exceso sobre el calor estimado. A partir de este momento, el sistema de control deja de comportarse linealmente y el dispositivo no operaría bajo un único régimen, sino que antes de dicho instante operaba bajo compensación y después, sin compensación.
- La disipación de un calor constante para establecer la potencia de referencia adecuada puede elevar la temperatura de la unidad microcalorimétrica, violándose así el carácter estrictamente isotérmico del microcalorímetro, pues un experimento de valoración puede comenzar a una temperatura dada y finalizar a una temperatura superior en algunos grados.

Todo esto se evita si se utilizan elementos Peltier, ya que éstos pueden liberar o evacuar calor, y no hace falta suministrar una potencia constante de referencia.

---

Por último, merece la pena destacar que en este dispositivo microcalorimétrico la configuración del sistema de compensación es notablemente más simple que en otros similares (*García Fuentes, 1994; El Harrous et al., 1994a; El Harrous et al., 1994b; Zhong et al., 1988*) y, debido al modo en que se realiza dicha compensación, permite desarrollar un modelo lineal muy realista de su funcionamiento y un método de ajuste de control y calibración extremadamente sencillo.

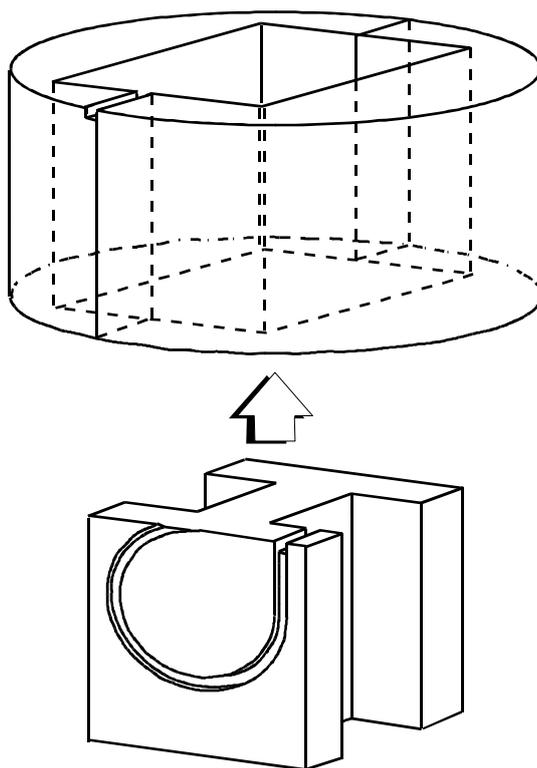
## **2.5. Sistema de inyección.**

La inyección del reactivo debería hacerse bilateralmente, es decir, en ambas células simultáneamente, si queremos cancelar el efecto de dilución. Sin embargo, un dispositivo real no es exactamente *twin*, por lo que no se produciría una cancelación perfecta. Debido a este hecho, y sobre todo si el calor de dilución del reactivo valorante es notable, es uso común el inyectar dicho reactivo únicamente en la célula de medida. Esto conlleva que haya que realizar un experimento blanco para determinar el calor de dilución de dicho reactivo. En la célula de referencia habría que inyectar tampón para cancelar los posibles efectos de fricción debidos al flujo entrante en cada célula, aumento de capacidad calorífica, etc., es decir, para conservar en todo momento la simetría en el proceso de medida e intentar que los efectos accidentales y secundarios respecto a la reacción sean los mismos en ambas células.

El reactivo valorante es introducido en la célula de un modo secuencial. Es necesario disponer de un dispositivo inyector con una precisión superior al  $\mu\text{l}$ , ya que los volúmenes de inyección serán del orden de 10-20  $\mu\text{l}$ . Se ha empleado un inyector doble (HAMILTON MICROLAB<sup>®</sup> 900) con dos microjeringas independientes (HAMILTON 1710TLLX y 1725TLLX) de 100 y 250  $\mu\text{l}$ . El sistema de inyección está controlado y automatizado totalmente por medio el ordenador personal a través de uno de los puertos serie mediante el protocolo estándar RS232C. La mínima cantidad de reactivo que se puede inyectar en la célula es 0.001 veces el volumen de la microjeringa empleada. De este

modo, está asegurada la reproducibilidad de los volúmenes de inyección. Además, teniendo en cuenta la proporción existente entre los volúmenes de célula y de inyección, las correcciones debidas a las variaciones de las propiedades físicas del contenido de célula durante un experimento son desdeñables y el sistema puede considerarse como invariante en el tiempo.

El reactivo valorante es enviado desde la jeringa hasta la célula mediante un tubo de Teflón™ que penetra a través de la coraza externa. Está conectado con un capilar de acero inoxidable que describe una trayectoria circular por el bloque aluminio (foco calorífico), para asegurar una buena termostatación del reactivo antes de la inyección (véase la *Figura 2.17*). El capilar de acero está conectado finalmente con un capilar de oro que forma parte de la célula y por el que desemboca el reactivo en el interior de la célula.



*Figura 2.17.* Trayectoria seguida por el capilar de acero de conducción de muestras por el interior del bloque de aluminio.

---

Mediante el programa de operación general, se seleccionan los parámetros de inyección: volumen de inyección, número de inyecciones, tiempo entre inyecciones sucesivas y velocidad de inyección.

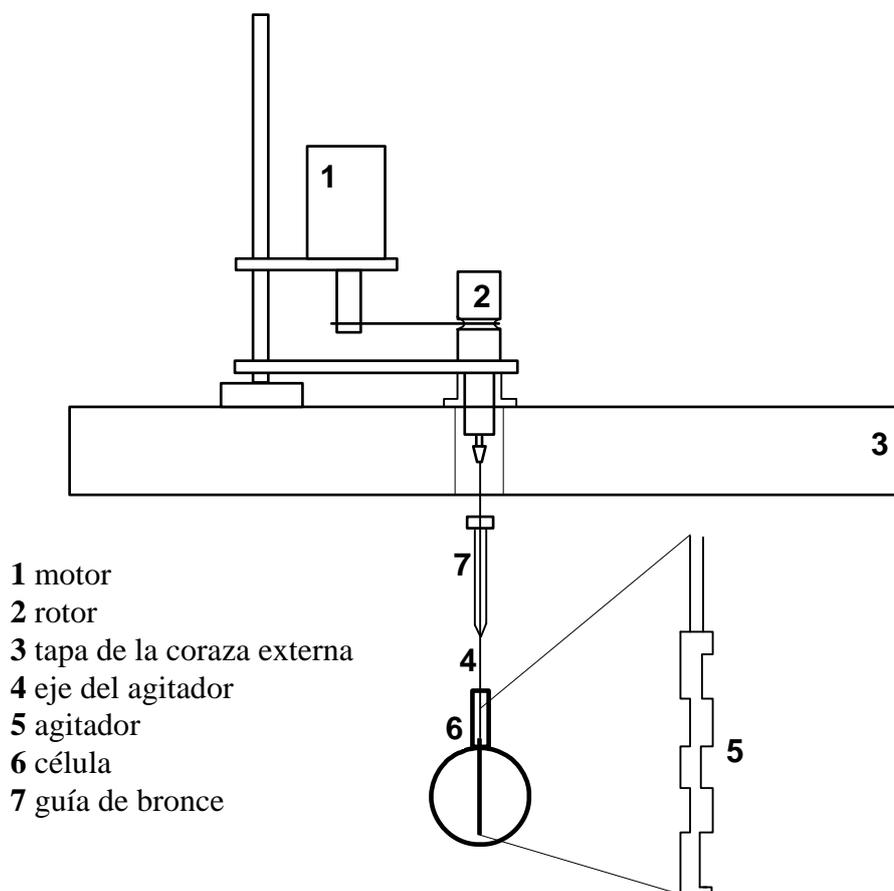
## **2.6. Sistema de agitación.**

El contenido de la célula debe ser sometido a agitación para garantizar una rápida homogeneización del proceso de mezclado de reactivos y minimizar el gradiente de concentración. Esto tiene tres objetivos obvios: atenuar los efectos que una lenta difusión del reactivo valorante introduciría en la respuesta del dispositivo, aumentar la velocidad de transferencia de calor entre el contenido de la célula y ésta, y lograr, en la medida de lo posible, una distribución uniforme de temperatura en las paredes de las células. Sin embargo, esta última razón no es vital, ya que si la temperatura no es uniforme en la pared de las células, midiendo la temperatura promedio sobre dicha pared obtenemos valores correctos del flujo de calor a través de ella (*Tanaka, 1992*). Y esto es justamente lo que se consigue distribuyendo termopilas por la pared de la célula.

Como interesa que el efecto debido a la agitación sea el mismo en las dos células y se cancele en el proceso de medida, se utiliza un sistema de agitación doble, según queda reflejado en la *Figura 2.18*. Éste consiste en un motor eléctrico situado sobre la tapa de la coraza externa que mueve simultáneamente dos rotores cilíndricos de bronce idénticos por medio de una banda elástica de goma (véase *Figura 2.19*). La velocidad impuesta por el motor se controla mediante la fuente de potencia que lo alimenta. La potencia del motor y el momento de inercia de los rotores es suficiente para asegurar que la velocidad angular del agitador será prácticamente constante. Acoplado a cada rotor hay un eje (capilar de acero inoxidable) que se introduce en la unidad microcalorimétrica a través de una abertura practicada en la coraza externa. Una guía cilíndrica de bronce, a través de la cual se insertan los ejes de rotación, evita posibles desviaciones de la verticalidad. Esta pieza está en contacto con la pieza cilíndrica de acero situada por encima del cuello de la célula (el

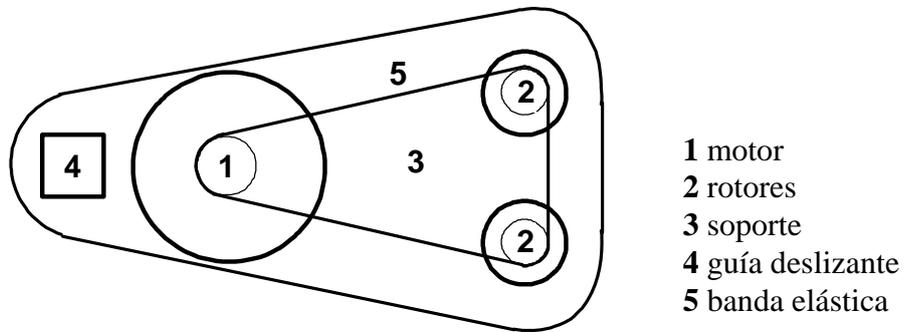
cilindro de acero está en contacto con el foco calorífico, pero no con la célula, ya que hay una pieza de Teflón™ interpuesta). De esta forma, cualquier efecto térmico debido a la fricción del sistema de agitación en este nivel es transferido al foco calorífico. En el extremo de cada eje se sitúa el agitador propiamente dicho. Es un tubo de acero inoxidable en el que se han realizado perforaciones rectangulares. Cuando se le dota de un movimiento de rotación trabaja como una fuente: el fluido penetra por los orificios inferiores y es expulsado por los superiores. El sistema de agitación está acoplado a la tapa de la coraza externa.

El sistema de agitación actúa desde el principio del experimento, por lo que no es necesario hacer una evaluación previa del efecto térmico originado por éste. Antes de iniciar la secuencia de inyecciones habrá que esperar un determinado tiempo hasta que se establezca una buena línea base. Existen dispositivos donde sí debe evaluarse dicho efecto porque la agitación sólo se realiza durante unos segundos posteriores a cada inyección realizada (*El Harrous et al., 1994a*).



---

*Figura 2.18.* Sistema de agitación doble.



*Figura 2.19.* Vista superior del sistema de agitación.

### **3. MODO DE OPERACIÓN BÁSICO.**

En el capítulo precedente se ha presentado una detallada descripción del dispositivo microcalorimétrico. Ahora vamos a comentar el modo básico de operación sin realizar una caracterización exhaustiva y basándonos en un modelo sencillo. La caracterización se abordará en un capítulo posterior, una vez desarrollado el modelo físico-matemático completo del microcalorímetro.

El control de compensación por retroalimentación es la clave para aumentar la eficacia global (tiempo y material consumidos en el experimento) del dispositivo, ya que permite mejorar la sensibilidad y reducir las constantes de tiempo. Aunque se utilizarán distintos controles, el análisis realizado en este capítulo será restringido casi exclusivamente al control proporcional. La razón es sencilla: utilizando un control proporcional el significado físico de las señales que intervienen en el proceso global se comprende fácilmente, incluso intuitivamente. Sin embargo, en un control proporcional-integral, el significado físico de cada señal no se puede asignar tan fácilmente sin la ayuda de un modelo.

#### **3.1. Conceptos previos.**

En el dispositivo microcalorimétrico sin sistema de compensación únicamente existe una señal de voltaje, que denominamos *señal de medida*. Está directamente relacionada con el flujo de calor que atraviesa las termopilas de los sensores de temperatura, en virtud del efecto Seebeck. Esta transferencia de calor será calificada como

---

*transferencia pasiva*. Todo el tratamiento posterior de los datos se reduce a esta señal. Sin embargo, en un dispositivo que trabaja en un régimen bajo compensación hay dos señales básicas: *señal de medida* y *señal de compensación* (o *de retroalimentación*). También reciben los nombres de *señal no compensada*,  $\Delta V_{NC}$ , y *señal compensada*,  $\Delta V_C$ , respectivamente, que quizás sean más representativos (García Fuentes, 1994). La primera posee el mismo significado que se indicó anteriormente y la segunda representa el flujo de calor adicional que crean las termopilas de compensación, mediante el efecto Peltier, y lo consideraremos como una *transferencia activa* de calor. Esta idea queda plasmada en la siguiente ecuación que representa la conservación de energía:

$$\dot{Q}(t) = \dot{Q}_{NC}(t) + \dot{Q}_C(t) \quad (3.1)$$

donde indicamos que el flujo calorífico total debe ser la suma de los flujos caloríficos, potencia térmica no compensada y compensada, implicados en la conducción activa y pasiva. Integrando entre los instantes inicial y final del efecto térmico registrado se obtiene una relación equivalente entre el calor total desarrollado en el efecto térmico,  $Q$ , y los calores evacuados por cada conjunto de termopilas, calor no compensado,  $Q_{NC}$ , y calor compensado,  $Q_C$ :

$$Q(t) = Q_{NC}(t) + Q_C(t) \quad (3.2)$$

Si ahora tenemos en cuenta la relación explícita entre cada voltaje y su flujo calorífico asociado (ecs. (2.3) y (2.9)), obtenemos la siguiente expresión:

$$\dot{Q}(t) = \frac{\alpha}{\varepsilon} \Delta V_{NC}(t) + \frac{\pi}{R} \Delta V_C(t) \quad (3.3)$$

Incluyendo la función de control, que en este caso, como se indicó más arriba, será una relación de proporcionalidad entre voltaje no compensado y voltaje compensado ( $\Delta V_C = K_P \Delta V_{NC}$ ), se ve claramente que cualquiera de las dos señales son útiles para determinar la potencia total y el calor total implicados en el efecto térmico, pudiendo utilizar las dos simultáneamente o sólo una de ellas:

$$\begin{aligned}\dot{Q}(t) &= \left( \frac{\alpha}{\varepsilon} + \frac{\pi}{R} K_P \right) \Delta V_{NC}(t) \\ \dot{Q}(t) &= \left( \frac{\alpha}{\varepsilon} \frac{1}{K_P} + \frac{\pi}{R} \right) \Delta V_C(t)\end{aligned}\tag{3.4}$$

donde  $K_P$  es la constante de proporcionalidad entre voltajes. De esta manera podemos definir 4 constantes de calibración, dependiendo de qué señales queremos utilizar y qué potencias o calores queremos evaluar:

$$\begin{aligned}\dot{Q}(t) = K_{CAL} \Delta V_{NC}(t) &\Rightarrow Q(t) = K_{CAL} \int_1^2 \Delta V_{NC}(t) dt \\ \dot{Q}(t) = K_{CAL}^C \Delta V_C(t) &\Rightarrow Q(t) = K_{CAL}^C \int_1^2 \Delta V_C(t) dt \\ \dot{Q}_{NC}(t) = K_{NC} \Delta V_{NC}(t) &\Rightarrow Q_{NC}(t) = K_{NC} \int_1^2 \Delta V_{NC}(t) dt \\ \dot{Q}_C(t) = K_C \Delta V_C(t) &\Rightarrow Q_C(t) = K_C \int_1^2 \Delta V_C(t) dt\end{aligned}\tag{3.5}$$

no siendo independientes entre sí estas constantes así definidas y verificando las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned}K_{CAL}^C &= \frac{K_{CAL}}{K_P} \\ K_{NC} &= K_{CAL} \Big|_{K_P=0} \\ K_C &= \frac{K_{CAL} - K_{NC}}{K_P}\end{aligned}\tag{3.6}$$

Todas las ecuaciones que estamos introduciendo son expresiones generales que serán válidas y aplicables directamente cuando más adelante desarrollemos el modelo sobre el dispositivo. Consideradas las ecs. (3.5) y una vez obtenidos los valores de las constantes mediante los oportunos experimentos de calibración, en un termograma podremos evaluar el porcentaje de calor compensado y no compensado, respecto al calor total. Esto da pie para definir lo que denominamos fracción de potencia o de calor compensada,  $\eta_C$ , y fracción de potencia o de calor no compensada,  $\eta_{NC}$  (*García Fuentes,*

1994) Estos parámetros, que no son independientes, constituyen un índice de eficiencia del sistema de compensación:

$$\begin{aligned}\eta_{NC} &= \frac{\dot{Q}_{NC}}{\dot{Q}} = \frac{Q_{NC}}{Q} = \frac{K_{NC}}{K_{CAL}} \\ \eta_C &= \frac{\dot{Q}_C}{\dot{Q}} = \frac{Q_C}{Q} = \frac{K_C}{K_{CAL}^C} = \frac{K_C K_P}{K_{CAL}} = \frac{K_{CAL} - K_{NC}}{K_{CAL}} = 1 - \eta_{NC}\end{aligned}\quad (3.7)$$

de forma que cuando  $\eta_C$  vale la unidad la potencia térmica no compensada es nula y toda la potencia desarrollada por el efecto térmico es evacuada a través de las termopilas del sistema de compensación, teniendo dicho sistema un 100% de eficacia. Cuando  $\eta_C$  es nulo, toda la potencia térmica es transferida a través de las termopilas de medida y la eficacia también es nula. En un dispositivo real funcionando mediante control proporcional no podremos nunca llegar a un régimen de operación en que  $\eta_C$  sea la unidad, debido a dos razones fundamentales. En primer lugar, el sistema de compensación proporcional actúa cuando existe una señal de medida no nula, es decir, cuando se aparta de la línea base. Por tanto, su funcionamiento implica la existencia de tal desviación, hecho que lleva asociados una potencia y un calor no compensados, rebajando así el valor de  $\eta_C$  respecto de la unidad. En segundo lugar, al ser un dispositivo retroalimentado mediante control digital, existirá una relación entre el período de muestreo (que actúa como tiempo de retraso en la trayectoria de retroalimentación) y la constante de proporcionalidad del control que determina las regiones de comportamiento inestable y comportamiento oscilatorio (*Leigh, 1992; Kuo, 1992*). Para un tiempo de muestreo dado existe un valor máximo permitido de dicha constante de proporcionalidad para que el sistema no presente inestabilidades ni oscilaciones. Esto provoca que en nuestro caso no sea posible alcanzar valores de  $\eta_C$  mayores de 0.95. Además, hay que tener en cuenta que  $\eta_C$  tiene un valor de 1 cuando  $K_P$  tiende a infinito (en la práctica, para valores de  $K_P$  muy grandes).

### 3.2. Efecto de la compensación de potencia.

Detengámonos a analizar el efecto del sistema de compensación sobre la respuesta del microcalorímetro; especialmente cómo mejora la sensibilidad y su eficacia global. En esta sección vamos a utilizar para ello los valores de las constantes de calibración, aunque aún no han sido obtenidos, cosa que se hará en un capítulo posterior. Lo interesante es observar cuál es el comportamiento del dispositivo bajo distintos regímenes de trabajo. Para ello se han registrado los termogramas correspondientes a pulsos de calor de anchura finita generados eléctricamente. Como ahora utilizamos solamente control proporcional, según lo discutido anteriormente no hace falta distinguir entre señal compensada y no compensada.

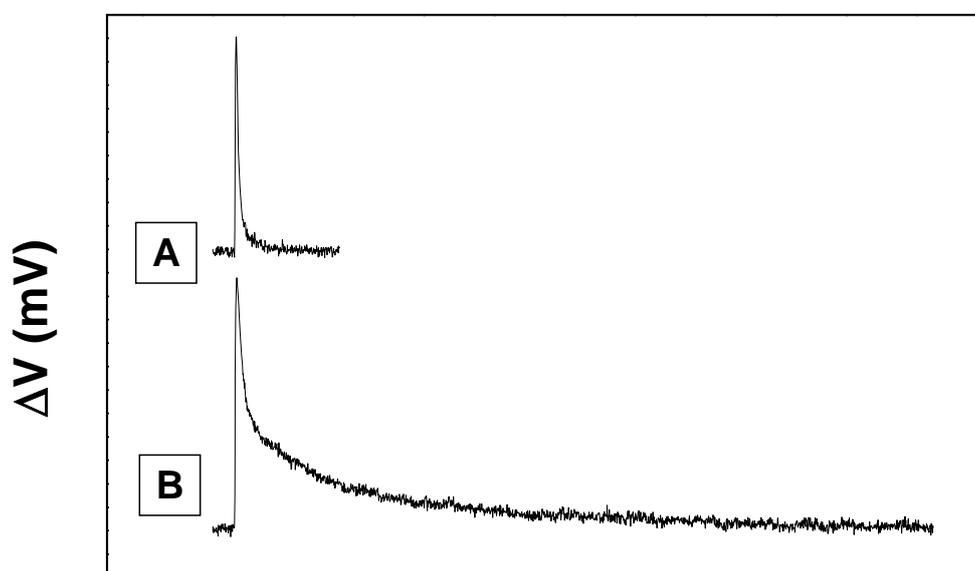


Figura 3.1. Respuesta (voltaje) del microcalorímetro frente a un pulso de  $20 \mu\text{W}$  de potencia y 10 segundos de duración.

(A) con compensación,  $K_p=10^{-4}$ , (B) sin compensación,  $K_p=0$ .

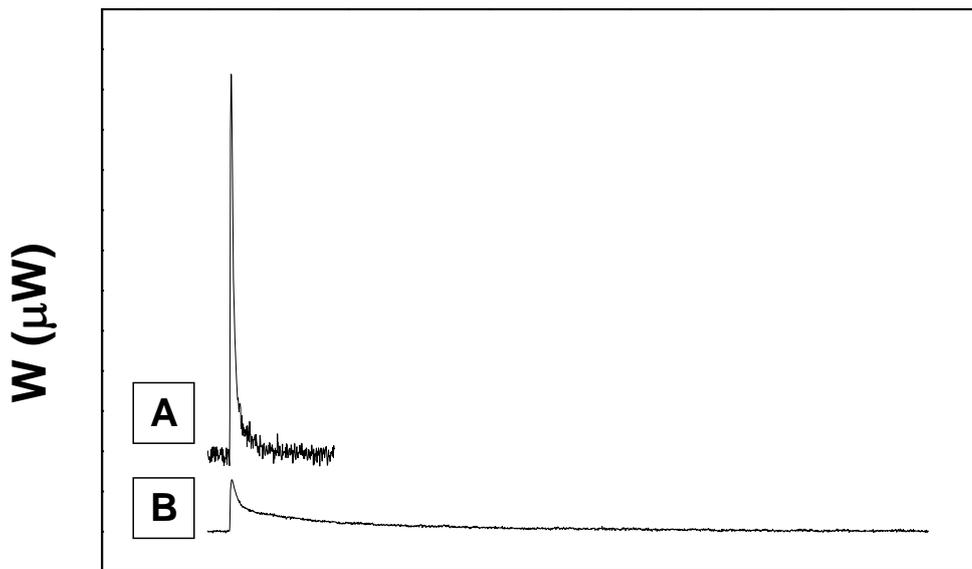


Figura 3.2. Respuesta en términos de potencia del microcalorímetro frente a un pulso de  $20 \mu\text{W}$  de potencia y 10 segundos de duración.  
(A) con compensación,  $K_p=10^{-4}$ , (B) sin compensación,  $K_p=0$ .

En la *Figura 3.1* se muestra la respuesta en voltaje (medida directa del dispositivo) frente a un pulso de calor de  $200 \mu\text{cal}$  (durante 10 s) cuando actúa el sistema de compensación ((A) con  $K_p=10^{-4}$ ) y cuando no actúa dicho sistema ((B) con  $K_p=0$ ). Se observan claramente dos efectos principales: mediante la compensación se consigue reducir el tiempo de duración de la respuesta y el área del termograma, que será proporcional al calor liberado, también decrece. Esto significa que las constantes de tiempo se hacen más pequeñas, que es justamente lo que se intentaba conseguir mediante el sistema de compensación. Sin embargo, aparece un efecto, en principio, perjudicial: disminuye la ganancia en estado estacionario (estática) del microcalorímetro. Esta consecuencia tiene una explicación lógica: el sistema de compensación por retroalimentación intenta que las desviaciones respecto de la línea base sean lo más pequeñas posible y será más eficaz en esta tarea cuanto mayor sea la ganancia de la trayectoria de retroalimentación. De esta manera, la relación señal-ruido decrece debido a que el ruido prácticamente se mantiene invariable, pero la señal proporciona una área menor cuando se emplea la compensación.

Sin embargo, si convertimos la señal de voltaje en la correspondiente señal de potencia térmica detectada, simplemente multiplicando por la constante de calibración, la situación cambia completamente de aspecto (véase la *Figura 3.2*). Las áreas correspondientes a ambos termogramas deben ser iguales y el pico del termograma cuando actúa la compensación es mucho más agudo y estrecho. La relación señal-ruido no mejora, pero aparecen ventajas importantes: cuando la retroalimentación es suficientemente eficaz, el tiempo empleado en un experimento puede llegar a reducirse en un factor mayor que 10 y los errores de cálculo debidos a la deriva de la línea base son minimizados. Además, la reducción de las constantes de tiempo mejora la sensibilidad dinámica, ya que la cantidad mínima de calor detectable depende directamente de la constante de tiempo principal (*Hansen et al. 1983; Margas et al., 1993a; Margas et al., 1993b*). De esta forma, pagando un cierto precio (disminución de la relación señal-ruido) se obtienen beneficios considerablemente importantes. Como dato orientativo, diremos que la constante de tiempo principal en (A) es de 26 segundos y en (B) es de 120 segundos (son constantes de tiempo verdaderas y no tiempos de subida o de establecimiento, como veremos más adelante en el Capítulo dedicado a la caracterización).

El funcionamiento del sistema de compensación se entiende mejor si las dos señales que operan simultáneamente en el dispositivo, compensada y no compensada para un mismo valor de  $K_P$ , se representan en una misma gráfica. El significado físico de ambas señales, tanto en forma de voltaje como de potencia térmica, ya se ha establecido.

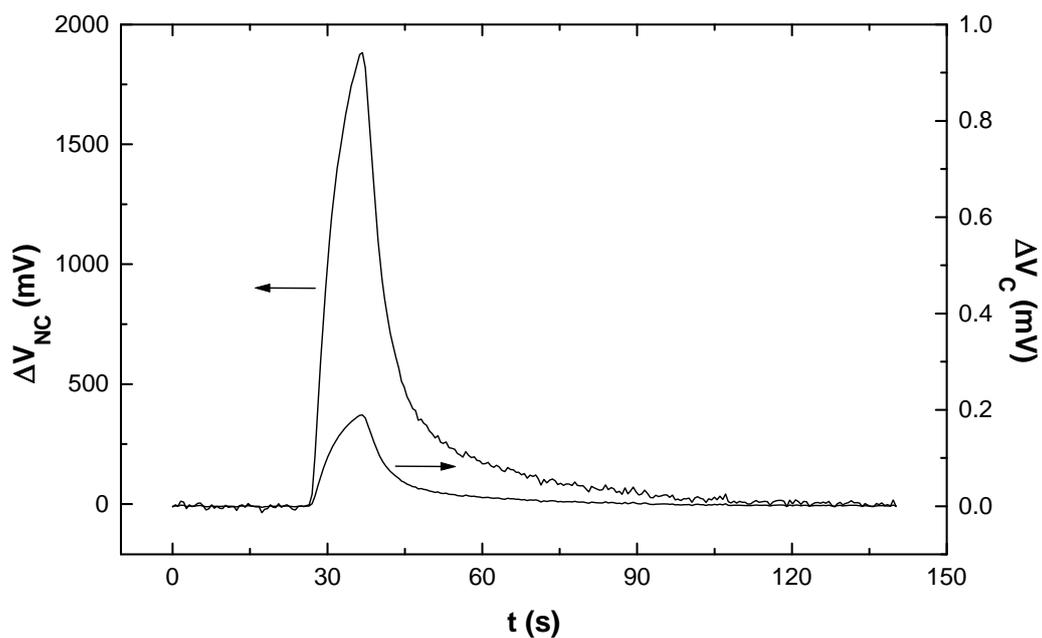


Figura 3.3. Señales de voltaje compensado y no compensado en la respuesta del microcalorímetro frente a un pulso de calor operando en un régimen con compensación, siendo  $K_p=10^{-4}$ .

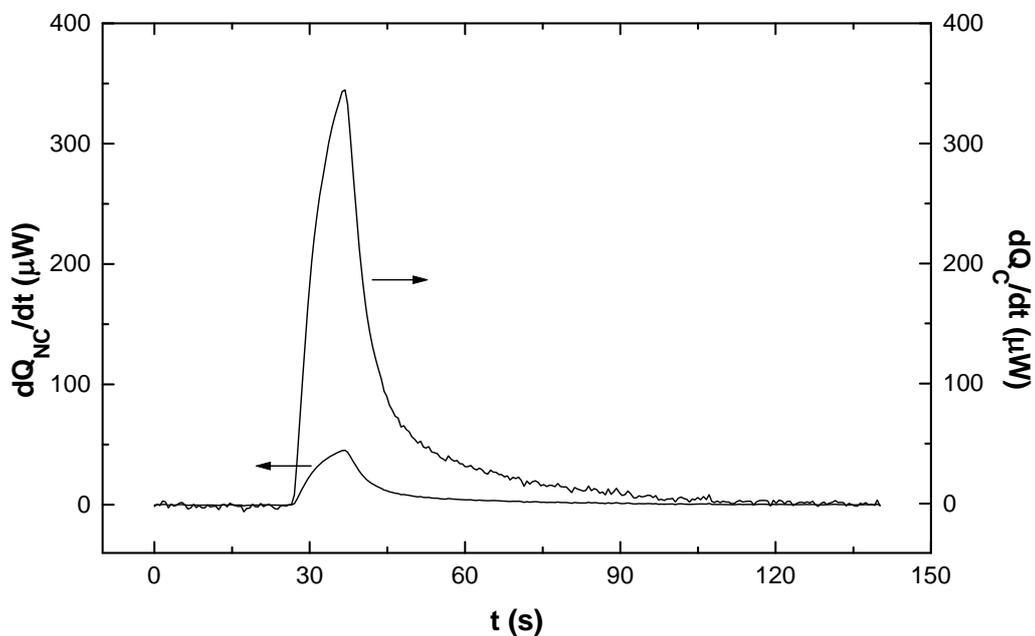


Figura 3.4. Señales de potencia compensada y no compensada en la respuesta del microcalorímetro frente a un pulso de calor operando en un régimen con compensación, siendo  $K_p=10^{-4}$ .

En la *Figura 3.3* se representa el voltaje compensado y no compensado en un mismo termograma, es decir, bajo un mismo régimen de compensación ( $K_p=10^{-4}$ ). Se observa como el primero es cuatro órdenes de magnitud mayor que el segundo. Sin embargo, ésta no es buena comparación, ya que el valor concreto de estos voltajes depende del factor de ganancia de los amplificadores ( $10^5$ ) en el sistema de medida, de la resistencia de atenuación y de la constante  $K_p$  en el sistema de compensación. Por ello, lo adecuado es convertir estas señales en potencia térmica mediante la correspondiente constante de calibración y obtener la potencia compensada y no compensada en un mismo termograma (véase la *Figura 3.4*). En este caso sí se pueden comparar las dos señales y se ve claramente como mediante el sistema de compensación se evacua casi todo el calor generado, constituyendo el calor no compensado una fracción muy pequeña del total. Si evaluamos el calor total y sus componentes compensada y no compensada, con ayuda de los valores de las constantes de calibración adecuadas, en el ejemplo ilustrado en las *Figuras 3.3* y *3.4* se obtiene un valor de 0.88 para la fracción compensada, con lo cual la eficiencia del sistema de compensación sería de un 88%.

### 3.3. Estabilidad de línea base.

Una de las primeras características que deben ser analizadas es la estabilidad de la línea base, ya que es un requisito indispensable para eliminar en la medida de lo posible los errores que se puedan cometer en la determinación de los calores de reacción a través del área del termograma. Esta estabilidad depende del buen funcionamiento y eficacia de elementos tales como coraza externa (envoltura adiabática externa), foco calorífico (termostato) y sistema de control de temperatura. En la *Figura 3.5* se muestra el registro de la señal de voltaje durante 6 minutos bajo tres modos de funcionamiento: (1) sin compensación ( $K_p=0$ ), (2) con compensación ( $K_p=10^{-4}$ ) y (3) con compensación y agitación ( $K_p=10^{-4}$ ). Se observa que utilizando el sistema de compensación el ruido disminuye un poco, reduciendo ligeramente la desviación estándar desde 7.7 hasta 6.9 y atenuando las oscilaciones de baja frecuencia. Además, la agitación del contenido de la

célula prácticamente no añade ruido en la línea base, elevando la desviación estándar hasta 7.2, de modo que apenas provoca ningún efecto adicional. Hay que tener en cuenta que las oscilaciones de baja frecuencia son las que podemos atribuir a perturbaciones en la temperatura de referencia del termostato o la de cada célula. Sin embargo, las de alta frecuencia serán debidas al ruido que introduzcan los componentes electrónicos (amplificadores, conversores, etc.) (Owens, 1982; Leigh, 1992). Esta asignación se realiza considerando la diferencia de orden de magnitud en los tiempos de relajación asociados con cada tipo de fenómeno (conducción de calor y conducción de carga eléctrica).

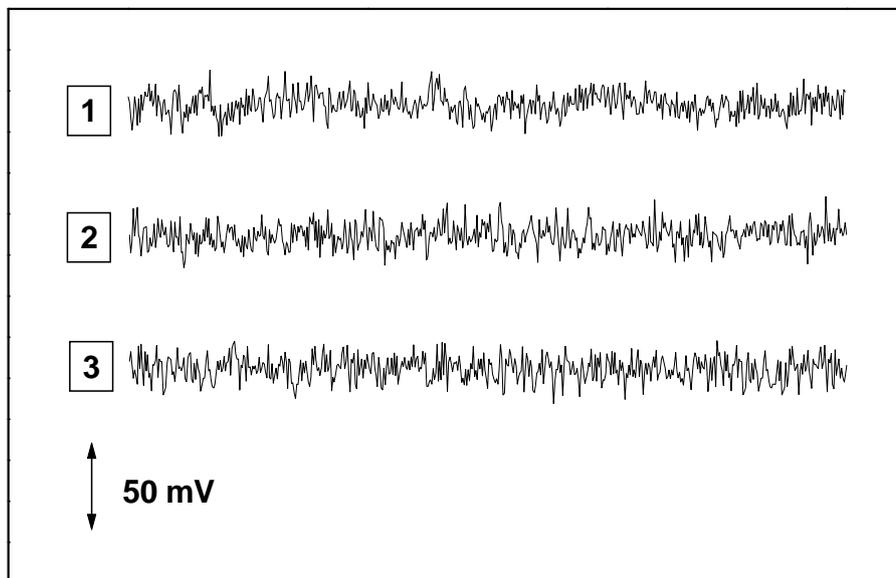


Figura 3.5. Estimación del ruido mediante registros (6 minutos) de la señal de voltaje.

- 1 sin compensación y sin agitación
- 2 con compensación y sin agitación
- 3 con compensación y con agitación

Anticipando ahora una relación, que demostraremos más tarde (ec. (4.16)), existente entre la señal de voltaje no compensada,  $\Delta V_{NC}(t)$ , y la diferencia de temperatura entre las dos células,  $\Delta T(t)$ :

$$\Delta V_{NC}(t) = A\varepsilon\Delta T(t) \quad (3.8)$$

donde  $A$  es el factor de ganancia en la etapa de amplificación, con un valor de  $10^5$ , y  $\varepsilon$  es el

coeficiente Seebeck de los sensores de temperatura. Para estimar  $\varepsilon$  podemos recurrir a la bibliografía, recogiendo un valor de  $400 \mu\text{V/K}$  ( $20^\circ\text{C}$ ) para una unión semiconductor  $\text{Bi}_2\text{Te}_3$  (Adkins, 1977), que es el material constituyente de las termopilas. Para dejar claro que se puede utilizar con total garantía dicho valor, indicamos éste se puede calcular mediante el modelo desarrollado sobre el microcalorímetro y los experimentos de calibración que se detallarán en un capítulos posteriores, obteniéndose un valor de  $400 \pm 10 \mu\text{V/K}$  ( $25^\circ\text{C}$ ). Este hecho es bastante sorprendente y no deja lugar a dudas sobre la adecuación excelente del modelo al sistema real y de la práctica inexistencia de pérdidas de calor en dispositivo. Si calculamos la desviación estándar de la diferencia de temperatura entre células, resulta un valor de  $0.35 \mu\text{K}$ . Asimismo, el valor de la distancia pico-pico en el ruido equivale a una diferencia de temperatura de  $1 \mu\text{K}$ . De todos modos, habría que matizar esta afirmación: este resultado es una estimación, ya que en el ruido observado no hay únicamente contribuciones térmicas. Aún así, aparece un factor de mejora en la estabilidad de la temperatura del orden de 5000 respecto a la estabilidad del baño termostático.

### 3.4. Linealidad.

Esta propiedad, que no es otra cosa que la verificación del Principio de Superposición, es crucial en el dispositivo microcalorimétrico. No tanto por el hecho de que un sistema de medida debe ser lineal, que no es condición estrictamente necesaria, sino porque si se quiere aplicar un modelo, practicable y resoluble, al sistema de medida, la tarea es más sencilla si dicho sistema se comporta linealmente. De sobra son conocidas las dificultades que se plantean en el tratamiento de sistemas no lineales. Aquí sería conveniente recordar una de las razones que hacen aconsejable la utilización de elementos Peltier como efectores del sistema de compensación, en lugar de elementos resistivos: la relación lineal entre potencia Peltier y voltaje (en realidad, intensidad de corriente) y la relación cuadrática entre potencia Joule y voltaje (o intensidad de corriente). Aunque en un elemento Peltier también se origina potencia Joule, para valores pequeños de voltaje este

---

es totalmente despreciable. Para realizar una estimación utilizamos un valor de 120 mV para el coeficiente Peltier de una unión semiconductor  $\text{Bi}_2\text{Te}_3$  (obtenido a través de la bibliografía (Adkins, 1977) y también mediante el modelo y el proceso de calibración) y de  $8.9 \Omega$  para la resistencia eléctrica,  $R$ , de un elemento Peltier (Melcor, 1985). Si tenemos en cuenta que el voltaje de compensación,  $\Delta V_C$ , no excederá nunca de 0.5 mV, la potencia Joule representa menos del 0.005% de la potencia total generada. Sin embargo, con un elemento resistivo está claro que constituye el 100%.

El error relativo de la constante de calibración, obtenida mediante regresión lineal, refleja la linealidad del sistema (Heminger et al., 1984). Un experimento sencillo consiste en aplicar sucesivas entradas de potencia constante,  $W$ , de larga duración (funciones paso) generadas eléctricamente (véase la Figura 3.6) y realizar un ajuste lineal entre potencia aplicada y valor de voltaje en estado estacionario,  $\Delta V_{NC,EE}$  (véase la Figura 3.7). Este método es totalmente equivalente a la aplicación de pulsos de calor de anchura finita y establecer una correspondencia entre calor desarrollado y área bajo el termograma registrado (véase el Capítulo 5). Sin embargo, el primer método es susceptible de menos errores, ya que no hay que evaluar áreas, sino valores de voltaje en estado estacionarios mediante el promedio en un intervalo de tiempo considerado. Pero, por otra parte, hay que tener cuidado con los errores debidos a la posible deriva de la línea base.

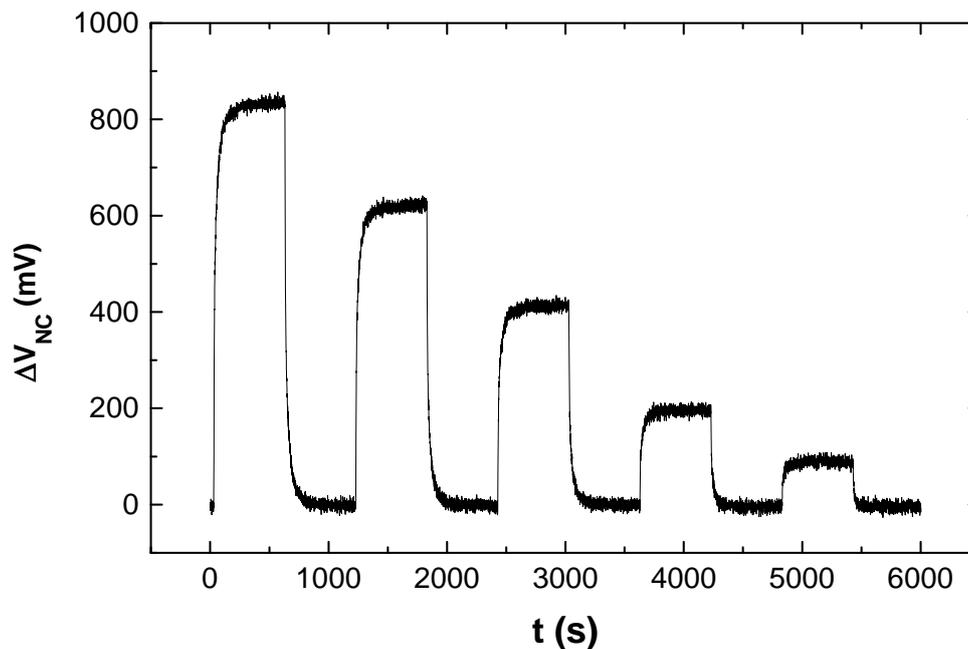


Figura 3.6. Sucesivas respuestas del microcalorímetro con compensación ( $K_p=10^{-4}$ ) frente a entradas paso de potencia constante (167.2, 125.6, 83.7, 41.9 y 20.9  $\mu\text{W}$ ).

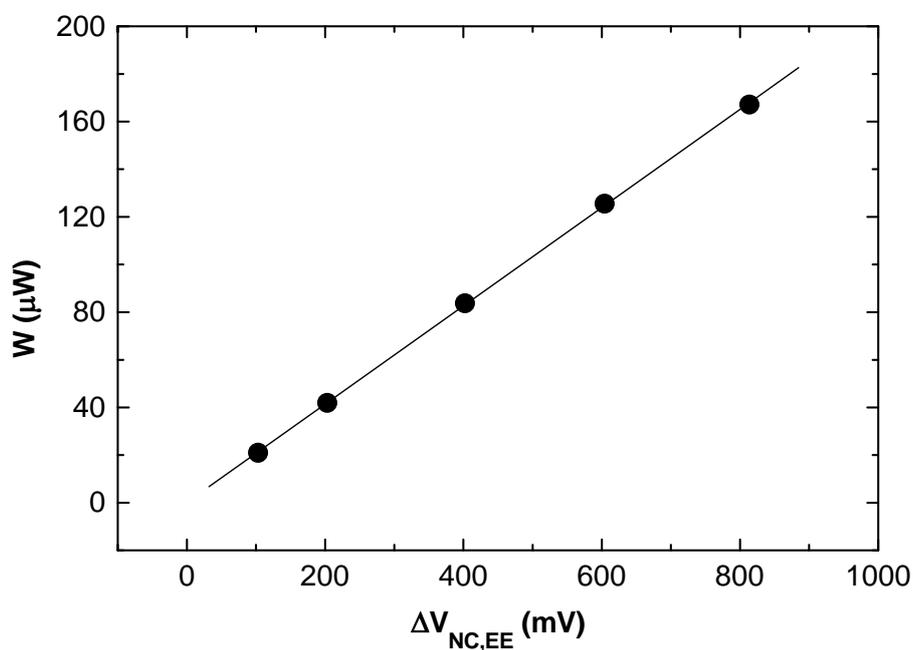


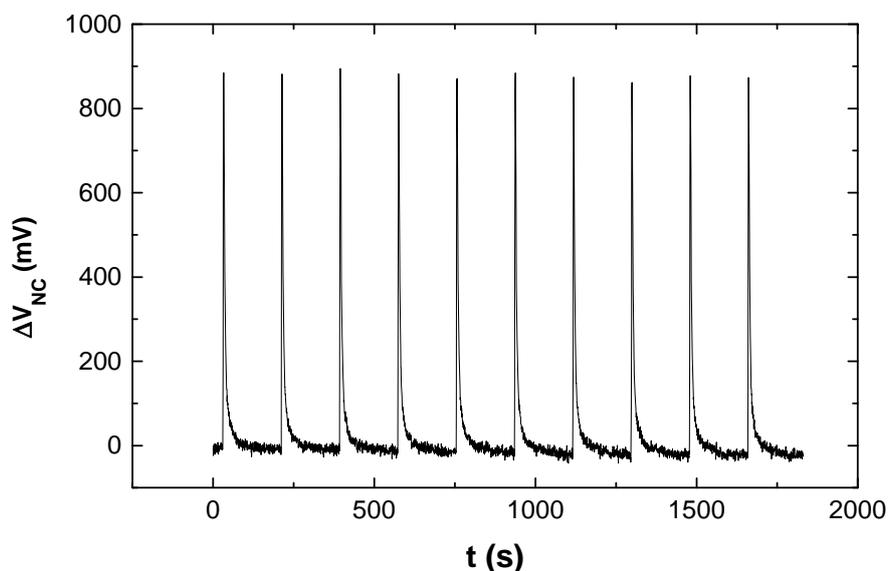
Figura 3.7. Regresión lineal entre potencia aplicada y voltaje en estado estacionario, correspondiente a la calibración eléctrica mostrada en la Figura 3.6.

---

El error relativo en la constante de calibración obtenido para el dispositivo operando bajo diferentes regímenes de compensación, es decir, diferentes valores de la constante  $K_P$ , es función decreciente de  $K_P$  y siempre menor del 1.7%. Este resultado es un nuevo dato que confirma de la mejora en la eficiencia y comportamiento que introduce el sistema de compensación.

### 3.5. Precisión.

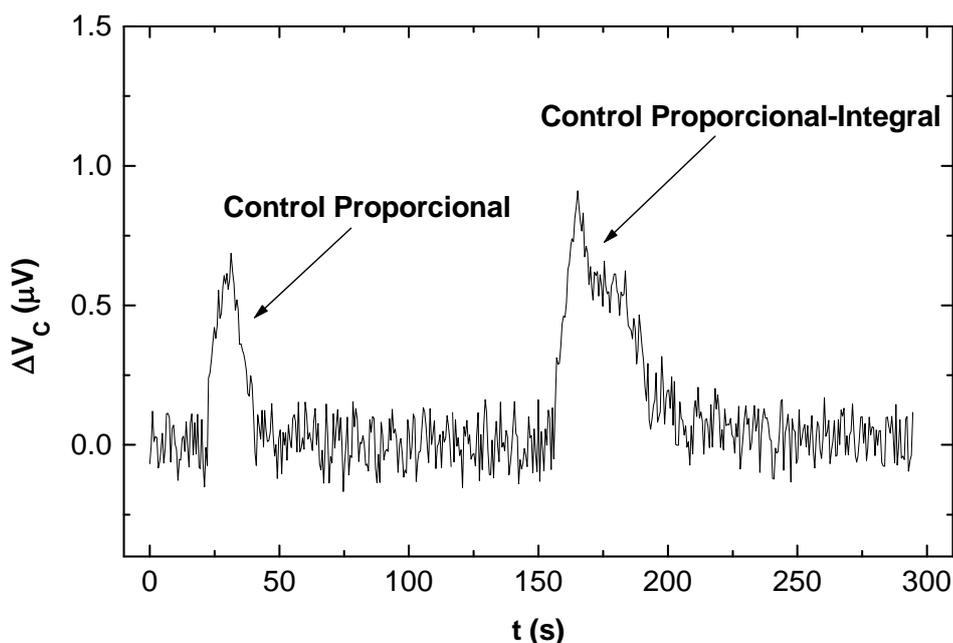
El concepto de precisión está relacionado con la reproducibilidad de las medidas realizadas en el microcalorímetro. Esta característica también puede ser comprobada mediante experimentos de calibración. Con tal fin se realizó una serie de 10 pulsos de calor de duración finita y el área bajo cada pico del termograma fue evaluada, es decir, el calor correspondiente, según se ilustra en la *Figura 3.8*. El cociente entre la desviación estándar y el promedio de los valores medidos es 0.009, de lo que se puede concluir que la precisión es mejor que el 1%.



*Figura 3.8.* Secuencia de 10 respuestas del microcalorímetro con compensación ( $K_P=10^{-4}$ ) frente a pulsos de calor de 1415  $\mu\text{J}$  idénticos.

### 3.6. Sensibilidad.

La noción de sensibilidad debe entenderse en un sentido dinámico o estático. Con anterioridad se estableció y comentó esta distinción y se adoptará la primera consideración según las razones ya argumentadas. Es en este único punto de este capítulo donde vamos a comparar el funcionamiento del dispositivo trabajando bajo los controles proporcional y proporcional-integral. En la *Figura 3.9* se muestra la respuesta del microcalorímetro a un pulso de calor de 20  $\mu\text{cal}$  de 10 segundos de duración. Queda claramente reflejada la mejora introducida por el control proporcional-integral. Este es un ejemplo de un resultado que se mostrará y justificará en capítulos posteriores: el control proporcional-integral mejora el funcionamiento del microcalorímetro.



*Figura 3.9.* Pulsos (20  $\mu\text{cal}$  durante 10 segundos) registrados bajo controles proporcional y proporcional-integral.

Se puede establecer que la sensibilidad dinámica absoluta es de 10-20  $\mu\text{cal}$  y la sensibilidad específica (sensibilidad dinámica por unidad de volumen efectivo de célula) es de 2-4  $\mu\text{cal/ml}$ , dependiendo del control empleado, siendo éstos dos valores excelentes si se tiene en cuenta que actualmente sólo dos laboratorios disponen de un dispositivo

---

microcalorimétrico de valoración cuya sensibilidad específica es mejor que la del microcalorímetro desarrollado en este trabajo de investigación (0.2  $\mu\text{cal/ml}$  Wiseman *et al.*, 1989; 1  $\mu\text{cal/ml}$ ; Freire *et al.*, 1990).

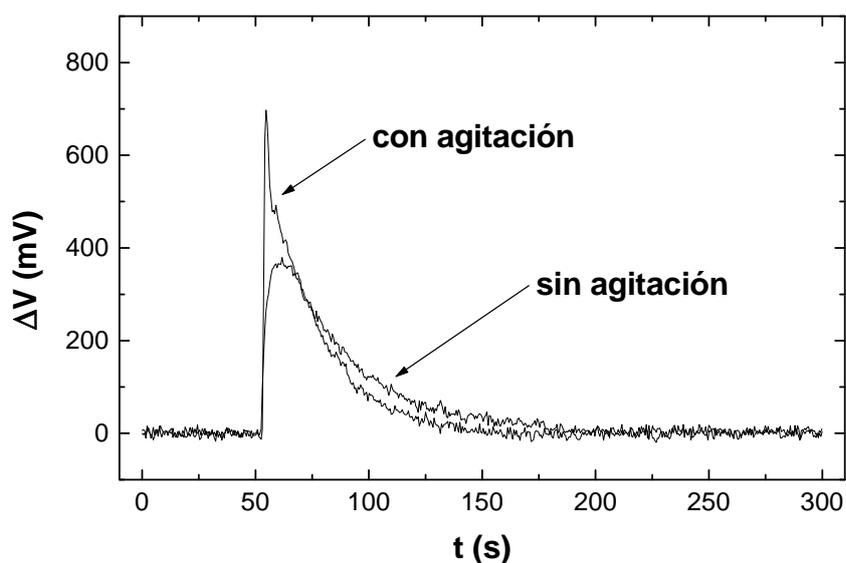
### **3.7. Procedimiento de medida en un experimento químico.**

Hasta ahora solamente hemos visto respuestas del microcalorímetro frente a entradas de potencia generadas eléctricamente. Esto ha sido así porque el método eléctrico de calibración y caracterización presenta menos incertidumbre que el método químico, ya que está afectado de menos fuentes de error (dilución, mezclado y determinación de concentraciones de reactivos). Sin embargo, el método químico es lo más parecido a la situación y condiciones reales de medida. En cualquier experimento mediante el programa general de operación se seleccionan todos los parámetros requeridos relativos al sistema de adquisición de datos, el sistema de compensación y el sistema de inyección

Después de realizar una limpieza de las células, el sistema de inyección se carga con el reactivo valorante. Luego, se coloca en la célula de medida el reactivo que va a ser valorado, normalmente en una disolución tamponada. En la célula de referencia se colocará agua destilada o disolución tamponada. De todos modos, podemos variar este método, por ejemplo, inyectando sólo reactivo valorante en la célula de medida. Dependiendo del procedimiento habrá que diseñar el correspondiente experimento blanco. El tiempo requerido para conseguir el equilibrio térmico es de unos 20 minutos. Una vez alcanzado éste, se activa el sistema de agitación y se deberá esperar un tiempo de unos 20-30 minutos hasta que se obtiene una línea base estable. A partir de dicho instante, el microcalorímetro está preparado para iniciar la secuencia de inyecciones programadas para el experimento.

### 3.8. Influencia de la velocidad de agitación en la respuesta.

Para comprobar la influencia de la velocidad de agitación del contenido de la muestra en el interior de las células y obtener un valor óptimo se ha realizado una serie de experimentos químicos. Estos experimentos consisten en la neutralización de una disolución de concentración muy bien determinada de  $\text{ClH}$  con  $\text{NaOH}$  en exceso. En cada inyección (de  $10\ \mu\text{l}$ ) se utilizó una velocidad de agitación distinta y se observó la influencia sobre la respuesta del dispositivo. En la *Figura 3.10* se muestran dos de estos experimentos correspondientes a una velocidad de agitación nula (A) y a una velocidad de 300 r.p.m. (B), respectivamente. Este último caso representa la velocidad óptima de agitación y el valor del máximo del termograma es prácticamente el doble. A velocidades superiores a este valor se encontró que no se mejoraba la altura del pico del termograma y tanto en la línea base como en el perfil de la curva en el tramo de relajación hacia el equilibrio térmico se producían alteraciones notables. Posiblemente esto se deba a que el flujo convectivo deje de ser laminar y se convierta en turbulento, dando lugar a una transferencia de calor anómala e ineficaz (transfiriendo localmente calor desde la disolución hasta las paredes de la célula o en sentido contrario) y generando por sí mismo diferencias considerables de temperatura.



*Figura 3.10.* Influencia de la velocidad de agitación sobre la respuesta del microcalorímetro.

---

El papel que juega la agitación es doble. En primer lugar, homogeneiza el contenido acelerando el proceso de mezcla y evitando que la velocidad de reacción esté limitada por la difusión de los reactivos. En segundo lugar, acelerar también el proceso de transferencia de calor creando un flujo convectivo de transporte y consiguiendo que dicha transferencia no esté determinada por la difusividad térmica de la disolución. Por estas razones, la forma de las curvas mostradas en la *Figura 3.10* son tan distintas, en cuanto a la pendiente inicial, el perfil en la región del máximo, el valor del máximo, el instante en que se alcanza el máximo y la relajación hacia el equilibrio. En realidad, todos estos rasgos están determinados por las constantes de tiempo, ya que con la agitación lo que se consigue es modificar las constantes de tiempo involucradas en el trayecto muestra → célula.

### **3.9. Elección del período de muestreo.**

Para finalizar, únicamente queda indicar la elección del intervalo de muestreo elegido en el proceso de adquisición de datos. Como el dispositivo microcalorimétrico está controlado mediante ordenador y la trayectoria de retroalimentación, como se verá más adelante, está contenida en éste, el sistema global es discreto en el tiempo y utiliza señales digitales y señales analógicas. En un sistema no retroalimentado el valor asignado al período de muestreo es prácticamente irrelevante. La única precaución que hay que tomar es que no sea demasiado grande como para que se pierda información. Sin embargo, en un sistema retroalimentado, el valor del período de muestreo puede llegar a ser crítico, ya que tanto un valor excesivamente elevado como uno muy reducido pueden desestabilizar el sistema (*Leigh, 1992*). Además, no es cierta la idea intuitiva de que si el período de muestreo tiende a cero el sistema y su comportamiento se aproxima a la situación analógica continua en el tiempo (*Kuo, 1992*). Como criterio general se puede tomar cualquiera de estas restricciones a la hora de elegir el periodo de muestreo:

$$\begin{aligned} T &< \frac{\tau_1}{10} \\ T &< \frac{\tau_{\text{SET}}}{10} \\ \omega_s &> \omega_n \end{aligned} \tag{3.9}$$

donde  $T$  es el periodo de muestreo,  $\tau_1$  es la constante de tiempo principal del sistema,  $\tau_{\text{SET}}$  es el tiempo de establecimiento,  $\omega_s$  es la frecuencia de muestreo y  $\omega_n$  es la frecuencia propia del sistema (*Leigh, 1992; Kuo, 1992*). En todas las medidas se ha empleado un período de muestreo de 0.5 segundos. Se realizó previamente un estudio sobre la influencia del valor de  $T$  utilizado sobre la distorsión del termograma y la pérdida de información, comprobándose que dicho valor es muy apropiado.

Existe la posibilidad de que el sistema de compensación de potencia no actúe con un período de muestreo igual al del sistema de adquisición de datos. Se comprobó nuevamente si esto mejoraba alguna de las características del funcionamiento del dispositivo, llegando a la conclusión de que no había razón alguna para utilizar un período de muestreo diferente en cada subsistema.

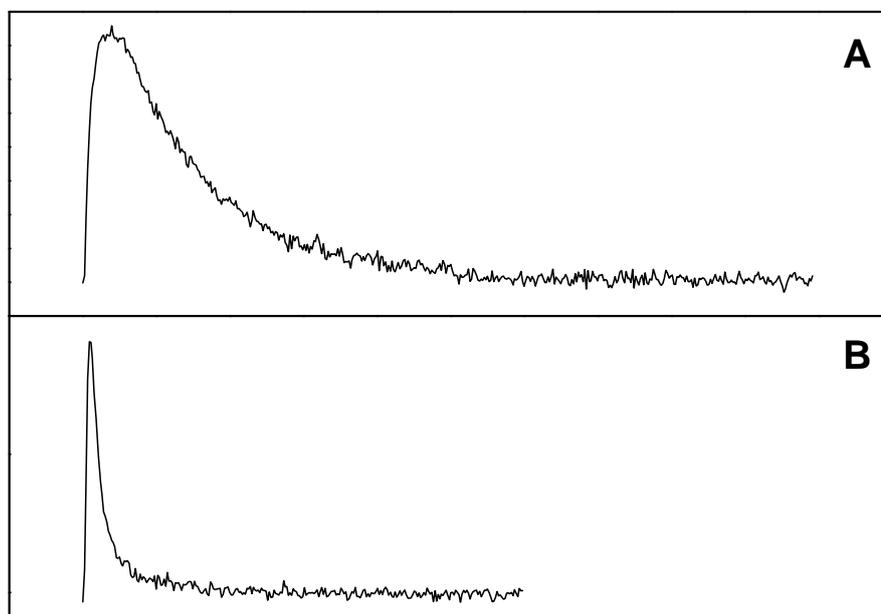
---

#### 4. MODELO FÍSICO-MATEMÁTICO DEL DISPOSITIVO.

Un problema tradicional en Microcalorimetría Isoterma de Valoración, mencionado en la Introducción de esta Memoria, y al que se le ha dedicado mucha atención, es el de la realización de una caracterización precisa del dispositivo, es decir, la determinación de la función de transferencia instrumental (lo que en Teoría de Sistemas se denomina *identificación del sistema*). Esta determinación se lleva a cabo mediante experimentos de calibración eléctrica (señales de potencia generada eléctricamente) o química (reacciones estándar muy bien conocidas). Sin embargo, los parámetros de la función de transferencia obtenidos según ambos métodos rara vez concuerdan, proporcionando el primero valores menores de las constantes de tiempo. En la *Figura 4.1* se muestran dos respuestas típicas, química (A) y eléctrica (B), del microcalorímetro. Corresponden a calores muy diferentes, pero esto no es el hecho relevante. Se observa claramente una diferencia en la forma de ambas curvas: la segunda es más puntiaguda y decae más abruptamente. Por tanto, si se realiza un ajuste no lineal a la parte descendente de ambas, la respuesta eléctrica daría un valor menor de la constante de tiempo principal. La reacción química utilizada es la neutralización de HCl con exceso de NaOH con ClH, que se caracteriza por una cinética de reacción muy rápida. Además, el tiempo de inyección en el experimento químico fue de 0.3 s y la duración del pulso de calor eléctrico es de 1.0 s. Aunque variando la velocidad de agitación se puede conseguir que la respuesta química se parezca a la eléctrica, la velocidad óptima de agitación dependerá principalmente de las dimensiones geométricas y las características físicas de la célula y su contenido (es decir, de los Números de Reynolds, Brinkman, Prandtl, Peclet, etc.), pero también de las características físico-químicas propias de la muestra (ej. si agitamos enérgicamente una disolución de proteína se puede provocar la desnaturalización de ésta). Esto significa que no hay una única velocidad óptima de agitación ni es siempre posible utilizarla. Además, en un experimento químico no se tiene un control tan completo del proceso de generación de calor como en

---

un experimento eléctrico, ya que aparecen efectos cinéticos de mezclado, lo que impide una buena interpretación del termograma (se volverá a insistir sobre este aspecto en el Capítulo dedicado a la caracterización).



*Figura 4.1.* Respuesta típica del microcalorímetro en un experimento químico (A) y en un experimento eléctrico (B).

Normalmente, la diferencia en la estimación de las constantes de tiempo mediante ambos métodos se justifica argumentando que la trayectoria seguida por el flujo de calor desde el lugar de generación del efecto térmico hasta el foco calorífico es distinto en cada caso (debemos recordar que por razones prácticas, la resistencia calefactora empleada en la calibración eléctrica se coloca sobre la pared externa de la célula) (Navarro *et al.*, 1982; Tanaka, 1989a; Zielenkiewicz, 1992). Este hecho es cierto, pero, por otra parte, las constantes de tiempo instrumentales deben ser independientes del tipo de experimento (eléctrico o químico), ya que vienen determinadas por la configuración del dispositivo, es decir, por sus materiales constituyentes y por la disposición de sus elementos y las relaciones entre ellos. Con el fin de conseguir tal independencia, se ha desarrollado un modelo físico-matemático realista, a juzgar por su buena adecuación al sistema real, que tiene en cuenta las diferentes trayectorias y las distintas fuentes de calor posibles.

Una razón importante para intentar determinar la función de transferencia es que el comportamiento del microcalorímetro está representado por dicha función, de forma que si la conocemos, tenemos toda la información posible sobre tal comportamiento y podemos predecir su respuesta ante cualquier señal de entrada. Otra razón de peso para abordar el problema de una caracterización precisa, que se deriva de la anterior, es que la posibilidad de llevar a cabo estudios cinéticos mediante calorimetría depende de la obtención de valores fiables de las constantes de tiempo del microcalorímetro, ya que solamente en dicha situación será posible eliminar la influencia del dispositivo en el termograma obtenido (deconvolución o corrección dinámica). Con la realización de experimentos a distintas temperaturas, los correspondientes termogramas corregidos (termogénesis) permiten evaluar la constante intrínseca de velocidad y la energía de activación del proceso.

El modelo desarrollado a partir de este Capítulo servirá para un microcalorímetro cuyo diseño sea análogo al presentado en esta memoria, independientemente de que el principio de medida sea con o sin compensación de potencia. A partir de la versión general con compensación, simplemente considerando nulos los parámetros de control, se obtiene el modelo sin compensación. La conveniencia de incluir el sistema de compensación de potencia por retroalimentación en el dispositivo experimental ya ha sido sobradamente justificada en los capítulos anteriores. Ahora enumeraremos una serie de características generales de los sistemas retroalimentados y que tendremos oportunidad más tarde de comprobarlas de forma práctica:

- Mejora de la exactitud de la respuesta, reduciendo las constantes de error de posición (*offset*), velocidad y aceleración del sistema sin retroalimentación. La reducción del error de posición es un hecho directamente relacionado con la reducción de la ganancia en estado estacionario del sistema.
- Aparición de una tendencia a la oscilación y de inestabilidades. La retroalimentación puede estabilizar un sistema inestable y desestabilizar un

---

sistema estable.

- Sensibilidad reducida (mayor robustez) frente a variaciones de los parámetros del sistema que se encuentran en la trayectoria directa. Sin embargo, no se ve afectada la sensibilidad respecto de los parámetros de la trayectoria de retroalimentación o una trayectoria que no forma parte de un lazo de retroalimentación.
- Efectos reducidos de perturbaciones externas o ruidos. Esto también depende del origen y lugar de introducción de éstos en el sistema.
- Aumento del ancho de banda. El sistema podrá responder a estímulos cuya frecuencia está fuera del intervalo propio. La extensión del ancho de banda hacia frecuencias mayores equivale a una reducción de las constantes de tiempo.

Partiendo de que se verifica el Principio de Superposición, consideraremos que el dispositivo se puede representar mediante una función de transferencia que relaciona las señales de entrada (termogénesis) y salida (termograma). Estrictamente hablando, no existen los sistemas lineales: todos los sistemas físicos son no lineales en algún grado. Sin embargo, cuando la magnitud de las señales se limita a intervalos en que los componentes exhiben un carácter lineal, el sistema es esencialmente lineal. Se pueden emplear controles no lineales para mejorar el funcionamiento o lograr un control más efectivo, pero tales sistemas son difíciles de tratar. En nuestro caso, debido a que las diferencias de las magnitudes son muy pequeñas, supondremos que todos los elementos del dispositivo se comportan linealmente.

En todo proceso de análisis de un sistema real se necesita una representación idealizada y simplificada de tal sistema, es decir, un modelo. Éste proporciona una visión esquemática del sistema real. En la práctica, la representación matemática exacta de un sistema no siempre es posible, pero, si se parte de suposiciones correctas sobre propiedades del sistema, se puede obtener información muy valiosa por medio de un estudio aproximado. La comparación entre el comportamiento real del sistema y el

predicho mediante el modelo nos indicará la bondad de éste como imagen del primero. El desarrollo de un modelo lleva implícitos dos aspectos diferentes y complementarios (*Rañada, 1994*): el conjunto de hipótesis y razonamientos que permiten formular de forma precisa las ecuaciones dinámicas del sistema (modelo físico) y las ecuaciones dinámicas que hay que resolver (modelo matemático). En el modelo físico habrá que realizar idealizaciones y en el modelo matemático puede ser necesario considerar aproximaciones. Es casi imposible obtener una descripción que no contenga idealizaciones y aproximaciones. Y podemos decir que éstas estarán presentes en una relación de proporcionalidad inversa: cuantas menos idealizaciones, más aproximaciones necesitaremos para tratar el sistema. Por tanto, habrá que establecer un compromiso entre ambas.

En el transcurso del proceso de modelado podemos distinguir tres pasos:

- Selección de los elementos relevantes para el comportamiento del sistema.
- Simplificación de éstos elementos.
- Aplicación de leyes físicas básicas a cada elemento, lo que nos permitirá obtener las ecuaciones dinámicas del sistema y su función de transferencia.

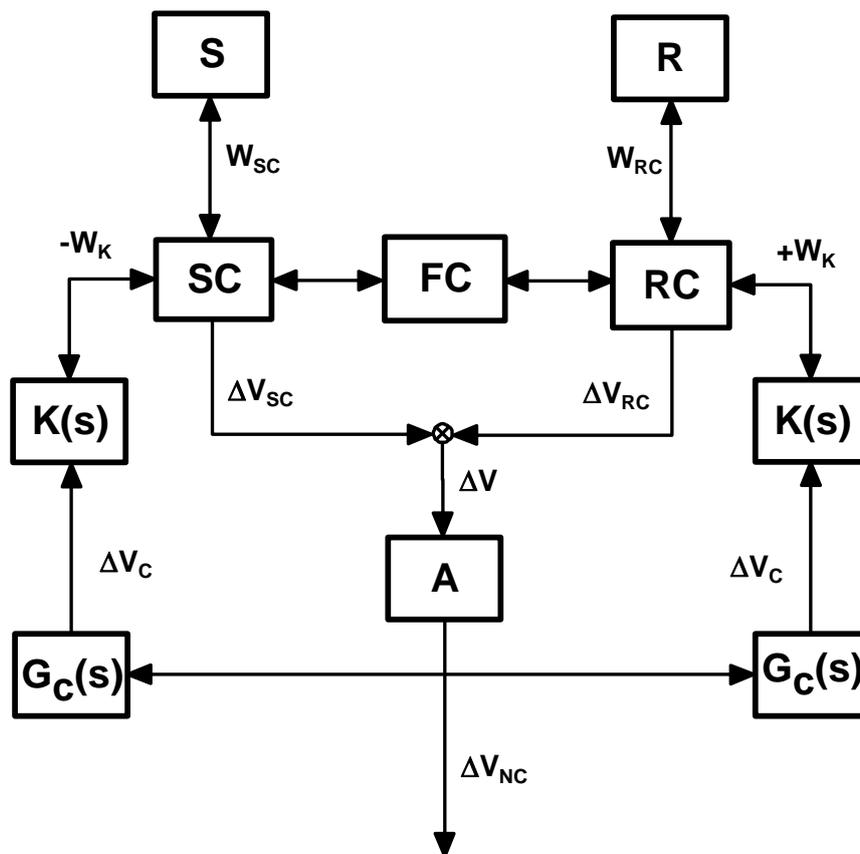
Una vez hechas estas consideraciones, que nos permitirán justificar en gran medida la decisiones que tomaremos, vamos a proceder a detallar el desarrollo del modelo del microcalorímetro. Un modelo de elementos interaccionantes sin compensación de potencia (*Randzio et al., 1980*) y un modelo de elementos sin interacción con compensación de potencia (*García Fuentes, 1994*) son los antecedentes del modelo presentado en este trabajo de investigación.

Dado que nuestro sistema de control es digital, para una correcta descripción deberíamos desarrollar un modelo discreto. Si bien en un sistema no retroalimentado la distinción entre modelo continuo y discreto carece de interés, cuando existe una trayectoria

de retroalimentación en un sistema digital aparecen efectos oscilatorios e inestabilidades. Este tipo de fenómenos también pueden presentarse en un sistema continuo si se considera la existencia de un tiempo de retraso en el sistema, pero, como se verá más adelante, aparecerán dos tipos de regímenes de oscilación muy diferenciados; uno de ellos podrá ser explicado a través del modelo continuo, pero el otro solamente se justificará mediante el modelo discreto. Primero elaboraremos el modelo continuo del microcalorímetro.

#### 4.1. Modelo continuo.

En la *Figura 4.2* se ilustra un diagrama de bloques con los elementos y flujos de señales representativos del sistema.



*Figura 4.2.* Diagrama continuo de bloques del sistema microcalorimétrico.

**S, R** contenido de las células de muestra y referencia

|   |  |
|---|--|
| <b>SC, RC</b>                           | elemento célula-sensor de las secciones de muestra y referencia                          |
| <b>FC</b>                               | foco calorífico  |
| <b>A</b>                                | etapa de amplificación   |
| <b>K(s)</b>                             | función de transferencia de los actuadores de compensación de potencia térmica           |
| <b>G<sub>c</sub>(s)</b>                 | función de transferencia del elemento controlador de la trayectoria de retroalimentación |
| <b>W<sub>SC</sub>, W<sub>RC</sub></b>   | potencia térmica transferida entre la célula y su contenido                              |
| <b>W<sub>K</sub></b>                    | potencia térmica de compensación   |
| <b>ΔV<sub>SC</sub>, ΔV<sub>RC</sub></b> | voltajes generados por los sensores de cada célula                                       |
| <b>ΔV</b>                               | diferencia entre los voltajes generados por cada célula                                  |
| <b>ΔV<sub>NC</sub>, ΔV<sub>C</sub></b>  | voltaje de medida y voltaje de compensación  |

Consideraremos un modelo de parámetros agrupados o constantes localizadas, de forma que cada elemento estará caracterizado por un único valor de cada magnitud física. Se han desarrollado modelos de microcalorímetros de parámetros agrupados y de parámetros distribuidos y conducen a los mismos resultados finales (Navarro *et al.*, 1992; Tanaka, 1992; Tanaka *et al.*, 1996). De esta manera, considerando en principio una única célula, la unidad microcalorimétrica está constituida por tres elementos: muestra, conjunto célula-sensor y foco calorífico (véase la *Figura 4.3*).



*Figura 4.3.* Modelo de unidad microcalorimétrica de tres elementos.

Como la célula está fabricada en oro, apenas introducirá un retraso en la transferencia de calor y su temperatura se hará uniforme rápidamente, por lo cual no hay problema en asociarla con el sensor de temperatura en un único elemento. Cada elemento poseerá propiedades térmicas bien definidas, siendo la capacidad calorífica,  $C$ , y el

---

coeficiente de transferencia de calor,  $\alpha$ , las más relevantes, que se considerarán invariables en el tiempo (la variación que pueda implicar la inyección de reactivo es despreciable). Esta hipótesis significa que el sistema microcalorimétrico es un sistema dinámico autónomo, es decir, un sistema cuyas propiedades y características son invariantes en el tiempo, y las ecuaciones dinámicas diferenciales o de diferencias, dependiendo de que se trate como sistema continuo o discreto, corresponden al tipo denominado *de coeficientes constantes*. Se han desarrollado modelos y métodos de identificación y caracterización para sistemas microcalorimétricos que no son invariantes en el tiempo, donde la capacidad calorífica de la célula se considera como principal parámetro variable que se modifica conforme se realiza la inyección de reactivo valorante (Ortín *et al.*, 1984; Ortín *et al.*, 1986; Rodríguez *et al.*, 1984; Rey *et al.*, 1984a; Rey *et al.*, 1984b; Rey *et al.*, 1985b; Marco *et al.*, 1986). Sin embargo, se ha demostrado que una variación de dicha capacidad calorífica no producirá apenas influencia alguna sobre el funcionamiento del dispositivo. En particular, la constante de calibración no se verá afectada por este hecho (Tanaka, 1987).

Estos tres elementos presentan interacción mutua, hecho que se refleja en el conjunto de ecuaciones que representa el balance energético individual. Para cada elemento:

$$\frac{dH(t)}{dt} = \dot{Q}_{P,INPUT} - \dot{Q}_{P,OUT} = \dot{Q}_P \quad (4.1)$$

donde  $H$  es la entalpía del elemento y  $\dot{Q}_p$  representa la potencia calorífica neta en dicho elemento, ya que se trabajará a presión constante (presión atmosférica). Si suponemos válida la ley de enfriamiento de Newton o de transferencia de calor entre dos cuerpos:

$$C \frac{dT(t)}{dt} = \alpha \Delta T(t) \quad (4.2)$$

donde  $\Delta T(t)$  es la diferencia entre la temperatura del elemento con su entorno,  $C$  es la capacidad calorífica a presión constante del elemento y  $\alpha$  es el coeficiente de transferencia

de calor entre el elemento y sus entorno. El conjunto de ecuaciones diferenciales lineales que obtengamos será resuelto mediante la técnica de la Transformada de Laplace:

$$F(s) = L[f(t)] = \int_0^{+\infty} e^{-st} f(t) dt \Leftrightarrow f(t) = L^{-1}[F(s)] \quad (4.3)$$

Existe una versión modificada de la definición de la Transformada de Laplace que es más coherente con el hecho de considerar que en dicho formalismo todas las funciones y sus derivadas de cualquier orden son nulas para tiempos no positivos ( $t \leq 0^-$ ), pero pueden ser no nulas para tiempos positivos ( $t \geq 0^+$ ) (Tanaka, 1989a).

Como se comentó al inicio, un aspecto muy importante que determinará el comportamiento del instrumento es la existencia de diferentes fuentes de calor y, por tanto, de diferentes trayectorias seguidas por el flujo de calor. El foco de generación del efecto térmico se puede localizar en la propia muestra (reacción química, efecto viscoso, etc.), en la resistencia calefactora sobre la pared externa de la célula (calibración eléctrica) o en los actuadores del sistema de compensación. Utilizaremos los símbolos  $W_S(t)$ ,  $W_E(t)$  y  $W_K(t)$  para representar el flujo de calor procedente de cada fuente (véase la *Figura 4.4*). Esta distinción es esencial para una correcta identificación de los parámetros de la función de transferencia.

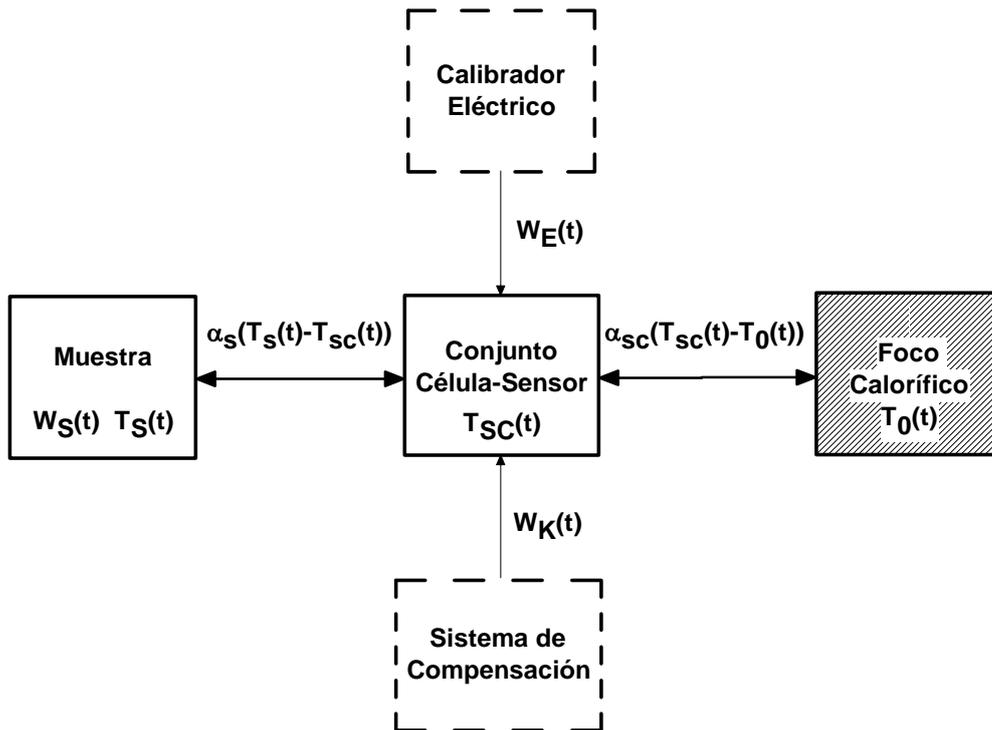


Figura 4.4. Localización de las fuentes de calor.

$T_s(t)$ ,  $T_{sc}(t)$ ,  $T_0(t)$  temperaturas de la muestra, del conjunto sensor-célula y del foco calorífico.

$\alpha_s$ ,  $\alpha_{sc}$  coeficientes de transferencia de calor entre muestra y conjunto sensor-célula y entre conjunto sensor-célula y foco calorífico.

$W_s(t)$ ,  $W_E(t)$ ,  $W_K(t)$  potencias caloríficas generadas por la muestra, por la resistencia calefactora (calibración) del conjunto sensor-célula y por los actuadores de compensación.

En el sistema retroalimentado se pueden distinguir la trayectoria directa (véase la *Figura 4.5.A*) y la trayectoria de retroalimentación (véase la *Figura 4.5.B*). Cada una contiene un grupo de elementos definido y determinados parámetros asociados. Están representadas por la función de transferencia directa y la función de transferencia de retroalimentación, respectivamente. Conociendo éstas, podremos construir la función de transferencia global o función de transferencia en lazo cerrado.

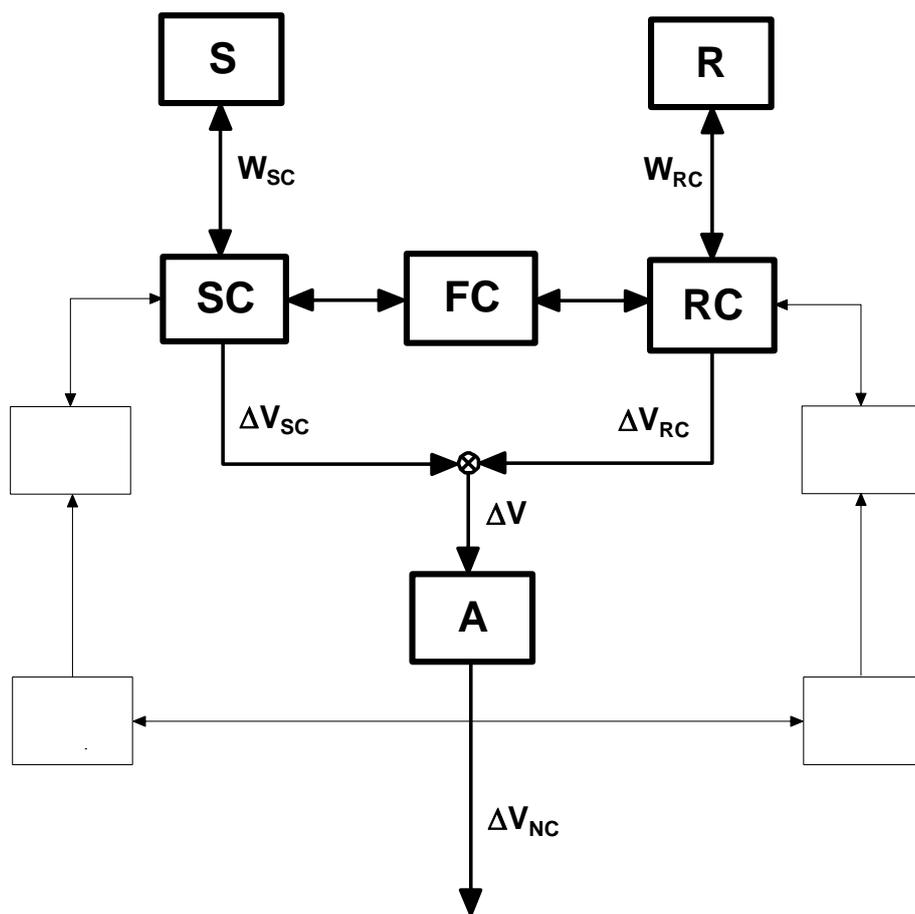


Figura 4.5.A. Trayectoria directa.

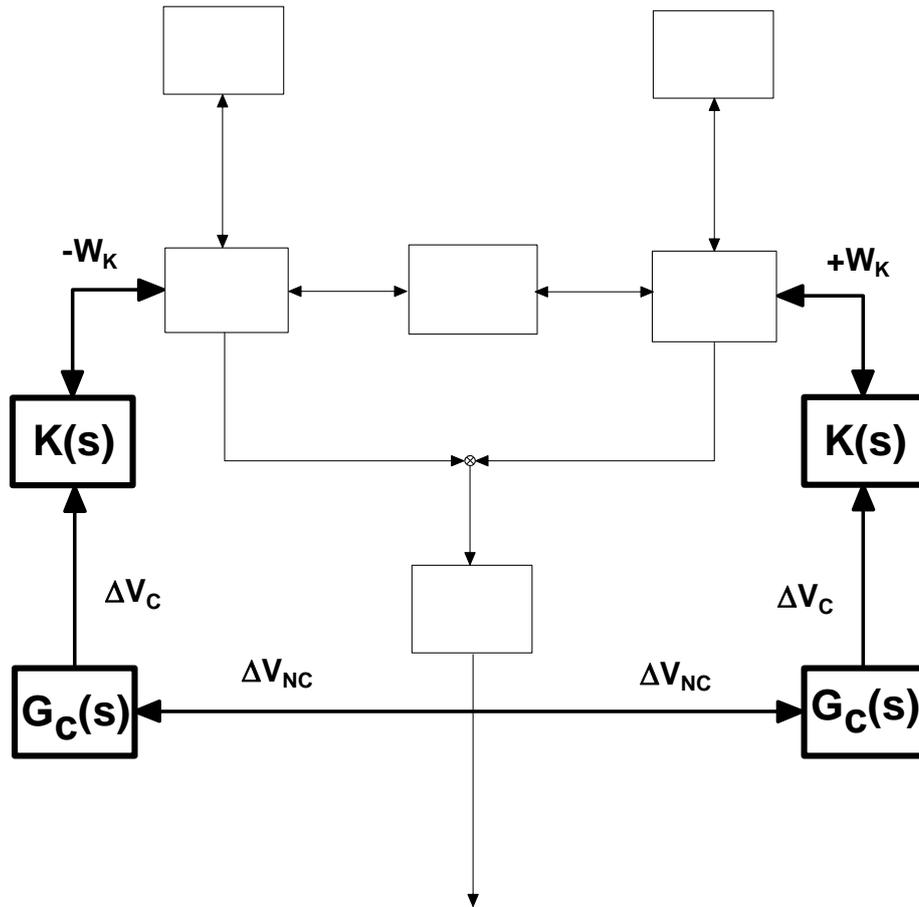


Figura 4.5.B. Trayectoria de retroalimentación.

#### 4.1.1. Función de transferencia directa.

Considerando sólo la célula de muestra (SC), supongamos que se produce un único efecto térmico procedente de la muestra,  $W(t)=W_S(t)$ . La ecuación de balance de potencia conduce al sistema de ecuaciones siguiente:

$$\begin{aligned}
 C_s \frac{dT_s(t)}{dt} &= W(t) - \alpha_s (T_s(t) - T_{SC}(t)) \\
 C_{SC} \frac{dT_{SC}(t)}{dt} &= \alpha_s (T_s(t) - T_{SC}(t)) - \alpha_{SC} (T_{SC}(t) - T_0)
 \end{aligned}
 \tag{4.4}$$

donde  $T_s(t)$ ,  $T_{SC}(t)$  y  $T_0$  son las temperaturas de la muestra, del conjunto célula-sensor y del foco calorífico;  $\alpha_s$  y  $\alpha_{SC}$  son los coeficientes de transferencia de calor entre muestra y

conjunto célula-sensor y entre conjunto célula-sensor y foco calorífico; y  $C_S$  y  $C_{SC}$  son las capacidades caloríficas de la muestra y del conjunto célula-sensor. No se considera ninguna ecuación para el balance de potencia del foco calorífico, ya que es un termostato.

Los tiempos de relajación térmica de los elementos aislados, muestra y conjunto célula-sensor, se obtienen considerando cada elemento en contacto con un termostato y vienen dados por:

$$\tau_s = \frac{C_S}{\alpha_s} \quad \tau_{SC} = \frac{C_{SC}}{\alpha_{SC}} \quad (4.5)$$

Como  $T_0$  es una temperatura constante de referencia, realizamos la siguiente transformación:

$$\begin{aligned} \Delta T_s(t) &= T_s(t) - T_0 \\ \Delta T_{SC}(t) &= T_{SC}(t) - T_0 \end{aligned} \quad (4.6)$$

En el dominio de la Transformada de Laplace, la solución de este sistema, con condiciones iniciales nulas, es:

$$\begin{aligned} \Delta T_s(s) &= \frac{\frac{1}{\alpha_s} \left( 1 + \frac{\alpha_s}{\alpha_{SC}} + \frac{C_{SC}}{\alpha_{SC}} s \right)}{1 + \left( \frac{C_{SC}}{\alpha_{SC}} + \frac{C_S}{\alpha_s} + \frac{C_S}{\alpha_{SC}} \right) s + \frac{C_S C_{SC}}{\alpha_s \alpha_{SC}} s^2} W(s) \\ \Delta T_{SC}(s) &= \frac{\frac{1}{\alpha_{SC}}}{1 + \left( \frac{C_{SC}}{\alpha_{SC}} + \frac{C_S}{\alpha_s} + \frac{C_S}{\alpha_{SC}} \right) s + \frac{C_S C_{SC}}{\alpha_s \alpha_{SC}} s^2} W(s) = g_{2P}(s) W(s) \end{aligned} \quad (4.7)$$

y teniendo en cuenta que los sensores miden  $\Delta T_{SC}(t)$ , ésta se considerará como la señal de salida del subsistema de dos elementos, muestra y conjunto célula-sensor, y  $g_{2P}(s)$  será su función de transferencia.

Supongamos ahora que el efecto térmico se genera directamente sobre el conjunto célula-sensor mediante una calibración eléctrica,  $W(t)=W_E(t)$ . El sistema de ecuaciones diferenciales resultante es:

$$\begin{aligned} C_s \frac{dT_s(t)}{dt} &= \alpha_s (T_{SC}(t) - T_s(t)) \\ C_{SC} \frac{dT_{SC}(t)}{dt} &= W(t) - \alpha_s (T_{SC}(t) - T_s(t)) - \alpha_{SC} (T_{SC}(t) - T_0) \end{aligned} \quad (4.8)$$

y tiene como solución:

$$\begin{aligned} \Delta T_s(s) &= \frac{\frac{1}{\alpha_{SC}}}{1 + \left( \frac{C_{SC}}{\alpha_{SC}} + \frac{C_s}{\alpha_s} + \frac{C_s}{\alpha_{SC}} \right) s + \frac{C_s C_{SC}}{\alpha_s \alpha_{SC}} s^2} W(s) \\ \Delta T_{SC}(s) &= \frac{\frac{1}{\alpha_{SC}} \left( 1 + \frac{C_s}{\alpha_s} s \right)}{1 + \left( \frac{C_{SC}}{\alpha_{SC}} + \frac{C_s}{\alpha_s} + \frac{C_s}{\alpha_{SC}} \right) s + \frac{C_s C_{SC}}{\alpha_s \alpha_{SC}} s^2} W(s) = g_{2P,0}(s) W(s) \end{aligned} \quad (4.9)$$

donde ahora la función de transferencia del subsistema es  $g_{2P,0}(s)$ . Se observa que el hecho de considerar una diferente localización del efecto térmico conduce a una diferente función de transferencia y, por tanto, comportamiento distinto. La primera posee dos polos y la segunda, además de dos polos, contiene un cero. Este cero,  $-z_1$ , posee significado físico: es el inverso del tiempo de relajación térmica de la muestra considerada como elemento no interactuante,  $\tau_s$ . Además, un hecho muy significativo es que los polos de ambas funciones son idénticos, ya que el polinomio característico (denominador) es el mismo. Como estos polos están asociados con las constantes de tiempo, se concluye que, aunque la función de transferencia sea distinta según el origen del efecto térmico (es decir, el microcalorímetro se comporta de distinta manera en una calibración eléctrica y una química), las constantes de tiempo instrumentales serán las mismas, independientemente del tipo de experimento. Este es un resultado con importantes implicaciones prácticas para la caracterización de un

microcalorímetro. Otra cuestión será cómo determinar de manera fiable tales parámetros.

Como los elementos muestra y conjunto célula-sensor son interactuantes, las constantes de tiempo del subsistema no coinciden con las de cada elemento aislado (ec. (4.5)) y viene dadas por:

$$\tau_1 = \frac{1}{p_1} \quad \tau_2 = \frac{1}{p_2} \quad (4.10)$$

donde  $-p_1$  y  $-p_2$  son los polos, reales y distintos, de la función de transferencia, es decir, las raíces del polinomio característico:

$$s^2 + \left( \frac{\alpha_{SC}}{C_{SC}} + \frac{\alpha_S}{C_{SC}} + \frac{\alpha_S}{C_S} \right) s + \frac{\alpha_S \alpha_{SC}}{C_S C_{SC}} = (s + p_1)(s + p_2) = 0 \quad (4.11)$$

y se verifican las siguientes relaciones entre constantes de tiempo:

$$\begin{aligned} \tau_1 \tau_2 &= \tau_S \tau_{SC} \\ \tau_1 + \tau_2 &= \tau_S + \tau_{SC} \left( 1 + \frac{C_S}{C_{SC}} \right) = \tau_S \left( 1 + \frac{\alpha_S}{\alpha_{SC}} \right) + \tau_{SC} \\ \tau_1 &> \tau_S, \tau_{SC} > \tau_2 > 0 \end{aligned} \quad (4.12)$$

que difieren de las expresiones indicadas en la bibliografía (*Randzio et al., 1980*).

La señal que se mide es un voltaje (véase la *Figura 4.1*), ya que los sensores transforman la diferencia de temperatura  $\Delta T_{SC}(t)$  en el voltaje  $\Delta V_{SC}(t)$ :

$$\Delta V_{SC}(s) = \varepsilon_{SC} \Delta T_{SC}(s) \quad (4.13)$$

donde  $\varepsilon_{SC}$  es el coeficiente Seebeck de los sensores. Si consideramos las ecs. (4.7) y (4.9), este voltaje se puede expresar:

---


$$\begin{aligned}\Delta V_{SC}(s) &= \varepsilon_{SC} g_{2P}(s)W(s) \\ \Delta V_{SC}(s) &= \varepsilon_{SC} g_{2P,0}(s)W(s)\end{aligned}\tag{4.14}$$

donde en cada ecuación  $W(s)$  representa  $W_S(s)$  y  $W_E(s)$ , según el caso.

Como el diseño del microcalorímetro está basado en el principio de células gemelas (*twin*), el tratamiento para la célula de referencia (*RC*) es análogo al seguido hasta ahora para la célula de muestra. Si tenemos en cuenta que los sensores de cada célula se conectan en oposición eléctricamente, las contribuciones de los efectos térmicos accidentales al voltaje neto generado por dichos sensores,  $\Delta V(t)$ , se cancelan:

$$\Delta V(s) = \Delta V_{SC}(s) - \Delta V_{RC}(s) = \varepsilon(T_{SC}(s) - T_{RC}(s))\tag{4.15}$$

donde hemos supuesto que:  $\varepsilon_{SC} = \varepsilon_{RC} = \varepsilon$

Este voltaje es amplificado con un factor de ganancia  $A$ , obteniéndose la señal de voltaje de medida, que también denominamos voltaje no compensado,  $\Delta V_{NC}(s)$ :

$$\Delta V_{NC}(s) = A\Delta V(s) = A\varepsilon(T_{SC}(s) - T_{RC}(s))\tag{4.16}$$

observándose que las fluctuaciones temporales en la temperatura del foco calorífico,  $T_0$ , si las hubiese, no afectarían: la medida únicamente depende de la diferencia de temperatura entre ambas células, causada principalmente por la reacción química o la calibración eléctrica.

Para las dos posibles localizaciones de las fuentes de calor:

$$\begin{aligned}\Delta V_{OUT}(s) &= A\varepsilon g_{2P}(s)W(s) = G_{2P}(s)W(s) \\ \Delta V_{OUT}(s) &= A\varepsilon g_{2P,0}(s)W(s) = G_{2P,0}(s)W(s)\end{aligned}\tag{4.17}$$

donde los factores  $G_{2P}(s)$  y  $G_{2P,0}(s)$  son las correspondientes funciones de transferencia

directa del sistema cuando el efecto térmico se genera en la muestra y en el conjunto célula-sensor, respectivamente. La expresión final para ambas funciones directas es:

$$\begin{aligned} G_{2p}(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2)} = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{(1 + \tau_1 s)(1 + \tau_2 s)} \\ G_{2p,0}(s) &= A \frac{\varepsilon}{C_{SC}} \frac{(s + z_1)}{(s + p_1)(s + p_2)} = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{(1 + \tau_s s)}{(1 + \tau_1 s)(1 + \tau_2 s)} \end{aligned} \quad (4.18)$$

#### 4.1.2. Función de transferencia de retroalimentación.

La potencia térmica de compensación generada por el actuador o transductor de retroalimentación (termopilas de compensación), en el dominio del tiempo y en el dominio transformado de Laplace, viene dada por:

$$\begin{aligned} W_K(t) &= \frac{\pi}{R} \Delta V_C(t) + \frac{1}{R} \Delta V_C^2(t) \\ W_K(s) &= \frac{\pi}{R} \Delta V_C(s) + \frac{1}{R} \Delta V_C^2(s) \end{aligned} \quad (4.19)$$

donde  $\Delta V_C$  es el voltaje de compensación (señal de retroalimentación) y  $\pi$  y  $R$  son el coeficiente Peltier y la resistencia eléctrica de dicho transductor. El primer término representa la potencia Peltier y el segundo es la potencia Joule. Tomando un valor de 120 mV para el coeficiente Peltier de una unión semiconductor y de  $8.9 \Omega$  para la resistencia de una termopila y teniendo en cuenta que  $\Delta V_C(t)$  no excederá de 0.5 mV, la potencia Joule representa mucho menos del 0.005 por ciento de la potencia total producida. Por otra parte, la compensación está configurada de modo bilateral, enviando voltajes opuestos a los actuadores de las células. Así, se genera una misma potencia Joule en ambas células, cancelándose su efecto al ser independiente de la polaridad del voltaje. Por tanto, la función de transferencia del transductor de retroalimentación,  $K(s)$ , es:

---


$$W_K(s) = \frac{\pi}{R} \Delta V_C(s) = K(s) \Delta V_C(s) \quad (4.20)$$

El sistema de compensación está controlado a través de un ordenador, que es el mismo que actúa como dispositivo de adquisición de datos. Éste opera como un control digital de retroalimentación y el tipo de control (función de control) se define mediante el algoritmo implementado en el programa de operación. Aunque está claro que el microcalorímetro es un sistema en que aparecen señales analógicas y digitales, debiéndose tratar como un sistema digital, por ahora sólo consideraremos un modelo continuo. El modelo discreto se desarrollará en un sección posterior. La función de transferencia correspondiente al controlador,  $G_C(s)$ , define la función de control o relación entre  $\Delta V_C(s)$  y  $\Delta V_{NC}(s)$ :

$$\Delta V_C(s) = G_C(s) \Delta V_{NC}(s) \quad (4.21)$$

y consideramos que el factor de atenuación que introduce la resistencia eléctrica de la trayectoria de retroalimentación está incluido en dicha función. Finalmente, como los elementos de la trayectoria de retroalimentación no presentan interacción mutua, la función de transferencia de retroalimentación,  $G_{FB}(s)$ , es igual al producto de las funciones de transferencia individuales del transductor y del controlador (véase la *Figura 4.5.B*):

$$\begin{aligned} W_K(s) &= G_{FB}(s) \Delta V_{NC}(s) \\ G_{FB}(s) &= K(s) G_C(s) \end{aligned} \quad (4.22)$$

existiendo, para cada tipo de control que se emplee, una función  $G_{FB}(s)$  diferente. Impondremos la condición de que  $G_C(s)$  corresponda a un elemento lineal, basándonos en las consideraciones expuestas anteriormente.

#### 4.1.3. Función de transferencia en lazo cerrado.

Ahora hay que considerar las dos trayectorias, directa y de retroalimentación, conjuntamente. Teniendo en cuenta que la señal de retroalimentación es una potencia térmica generada por las termopilas de compensación, se genera sobre el conjunto célula-

sensor. Por tanto, para este efecto térmico utilizaremos la función de transferencia directa que contiene dos polos y un cero,  $G_{2P,0}(s)$ . Por otra parte, la potencia térmica Peltier tendrá distinto signo en cada célula, ya que la compensación se realiza simétricamente.

Primero obtendremos la función de transferencia en lazo cerrado para un efecto térmico procedente de la muestra,  $W(s)=W_S(s)$ . La señal resultante del balance de potencia global del sistema es:

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}(s) &= G_{2P}(s)W(s) - G_{2P,0}(s)W_K(s) + G_{2P,0}(s)(-W_K(s)) \\ \Delta V_{NC}(s) &= G_{2P}(s)W(s) - 2G_{2P,0}(s)W_K(s)\end{aligned}\quad (4.23)$$

y si utilizamos la ec. (4.21) y reordenamos los términos llegamos a la expresión buscada:

$$\Delta V_{NC}(s) = \frac{G_{2P}(s)}{1 + 2G_{2P,0}(s)G_{FB}(s)}W(s) = G_S(s)W(s)\quad (4.24)$$

donde  $G_S(s)$  es la función de transferencia de lazo cerrado para un efecto térmico generado en la muestra. El factor 2 aparece por ser bilateral la compensación. Para un sistema con compensación unilateral el factor correspondiente sería la unidad.

Planteando el mismo razonamiento se obtendrá la función de transferencia en lazo cerrado para un efecto térmico producido en el conjunto célula-sensor,  $G_E(s)$ :

$$\Delta V_{NC}(s) = \frac{G_{2P,0}(s)}{1 + 2G_{2P,0}(s)G_{FB}(s)}W(s) = G_E(s)W(s)\quad (4.25)$$

La función  $2G_{2P,0}(s)G_{FB}(s)$  recibe el nombre de función de transferencia en lazo abierto. Es una función muy importante porque a partir de sus propiedades se pueden establecer conclusiones sobre la función de transferencia en lazo cerrado.

Expresando las dos funciones de transferencia en lazo cerrado en función de los polos,  $-p_1$  y  $-p_2$ , y el cero,  $-z_1$ :

---


$$\begin{aligned}
 G_S(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2) + b(s + z_1)G_C(s)} \\
 G_E(s) &= A \frac{\varepsilon}{C_{SC}} \frac{(s + z_1)}{(s + p_1)(s + p_2) + b(s + z_1)G_C(s)}
 \end{aligned}
 \tag{4.26}$$

o en función de las constantes de tiempo:

$$\begin{aligned}
 G_S(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{(1 + \tau_1 s)(1 + \tau_2 s) + a(1 + \tau_s s)G_C(s)} \\
 G_E(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{(1 + \tau_s s)}{(1 + \tau_1 s)(1 + \tau_2 s) + a(1 + \tau_s s)G_C(s)}
 \end{aligned}
 \tag{4.27}$$

donde  $a$  (que es una constante adimensional) y  $b$  son dos parámetros característicos del microcalorímetro:

$$a = 2A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{\pi}{R} \quad b = a \frac{\alpha_{SC}}{C_{SC}}
 \tag{4.28}$$

Ya sólo queda especificar la función de transferencia del controlador,  $G_C(s)$ , para determinar completamente la función de transferencia de lazo cerrado. Si tomamos  $G_C(s)=0$ , la ec. (4.26) corresponderá al microcalorímetro sin compensación, es decir, la función de transferencia global se reduce a la función de transferencia directa.

Las constantes de tiempo del sistema retroalimentado son los polos de la función de transferencia en lazo cerrado, es decir, las raíces del polinomio característico:

$$(s + p_1)(s + p_2) + b(s + z_1)G_C(s) = 0
 \tag{4.29}$$

Por tanto, las nuevas constantes de tiempo del sistema con compensación

dependerán de la función de transferencia del controlador empleado. Claramente se comprueba que si no hay compensación, las constantes de tiempo son las del sistema sin retroalimentación.

Nuevamente se observa que las dos funciones de transferencia obtenidas, que representan el comportamiento del microcalorímetro frente a un calor generado químicamente y eléctricamente (ecs. (4.26) y (4.27)), aunque son distintas, poseen los mismos polos. De esta manera, la respuesta del instrumento será distinta, pero las constantes de tiempo instrumentales serán las mismas, independientemente del experimento considerado.

Para estudiar la dependencia de las constantes de tiempo del sistema retroalimentado respecto de la función de control se pueden emplear dos métodos básicos: la resolución directa de la ecuación característica y la técnica de análisis del Lugar de las Raíces. Este último es un método general para analizar el comportamiento de las raíces de un polinomio en función de uno o varios parámetros de dicho polinomio. En nuestro caso, tales parámetros serán los parámetros del control empleado.

Con el fin de investigar la estabilidad del sistema podremos aplicar los Criterios de Routh y Hurwitz, aunque también el Lugar de las Raíces proporciona tal información.

Si conocemos la función de transferencia del microcalorímetro, podremos predecir la respuesta (termograma) ante cualquier señal de potencia térmica de entrada (termogénesis). Esto será utilizado posteriormente en el capítulo dedicado a la caracterización del dispositivo. Si  $G(s)$  es una de las dos funciones de transferencia y  $W(s)$  es la señal de potencia térmica de entrada, la respuesta del microcalorímetro será:

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}(s) &= G(s)W(s) \\ \Delta V_{NC}(t) &= L^{-1}[G(s)W(s)] = \int_0^t g(t-t')W(t')dt'\end{aligned}\tag{4.30}$$

en el dominio de la frecuencia y del tiempo, respectivamente. La función  $g(t)$  es la

---

transformada inversa de la función de transferencia y recibe el nombre de propagador del sistema.

## 4.2. Modelo discreto.

Antes de todo debemos justificar el interés de elaborar un modelo discreto del microcalorímetro. Si queremos describir de una forma más precisa el dispositivo microcalorimétrico, debemos desarrollar un modelo discreto del sistema, ya que, al coexistir señales analógicas y digitales, el sistema en su conjunto es estrictamente digital. De esta forma, aparecerán rasgos y características de comportamiento típicos de los sistemas digitales que no surgen en los sistemas continuos (ej. relación entre período de muestreo y parámetros de control, región de estabilidad más restringida).

Habrá que considerar que algunos elementos son continuos y otros discretos. Todos los elementos discretos del sistema están contenidos en el ordenador que controla todo el dispositivo (véase la *Figura 4.6*) y que realizará tres tareas fundamentalmente:

- Obtiene información mediante el sistema de adquisición de datos (muestreador y conversor A/D).
- Decide qué acción correctiva hay que realizar (algoritmo de control).
- Ejecuta la acción correctiva (muestreador y conversor D/A).

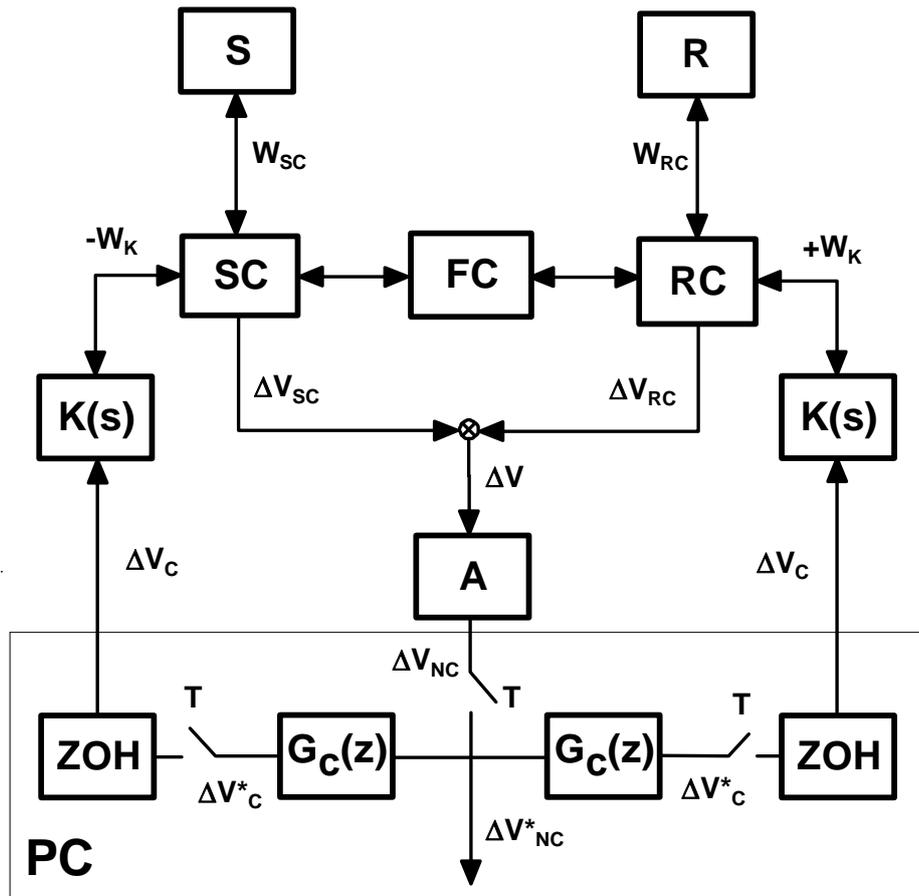


Figura 4.6. Diagrama mixto de bloques del sistema microcalorimétrico.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| $\Delta V^*_{NC}, \Delta V^*_C$ | voltajes de medida y de compensación muestreados   |
| $GC(z)$                         | función de transferencia discreta del elemento controlador de la trayectoria de retroalimentación (algoritmo de control) |
| ZOH                             | elemento de sostenimiento de orden cero (convertor D/A)  |
| T                               | elementos muestreadores (convertor A/D y convertor D/A) sincronizados  |
| PC                              | ordenador personal que contiene los convertores A/D y D/A, los muestreadores y el algoritmo de control                   |

Cuando tenemos en un sistema una combinación de elementos continuos y discretos, es decir, es un sistema mixto discreto-continuo, debemos *discretizar* el sistema. Este procedimiento consiste en sustituir funciones de transferencia y señales continuas por

sus versiones discretas homólogas. Hay que tener en cuenta que es más fácil discretizar una señal continua que hacer continua una señal discreta. Existen varios métodos de discretización: transformación bilineal, solución de la ecuación diferencial continua en cada intervalo de muestreo, utilización de la serie  $\ln z/T$ , correspondencia de polos y ceros, ecuación de diferencias análoga a la ecuación diferencial continua (*Leigh, 1992*). Sin embargo, el más potente de todos como herramienta matemática es el basado en la Transformada Z, existiendo todo un desarrollo teórico basado en este operador, análogo al de la Transformada de Laplace:

$$F(z) = Z[f(k)] = \sum_{k=0}^{\infty} f(k)z^{-k} \quad \Leftrightarrow \quad f(k) = Z^{-1}[F(z)] \quad (4.31)$$

Un muestreador ideal, de periodo  $T$ , es un elemento que convierte función continua en el tiempo  $f(t)$  en una función discreta en el tiempo  $f^*(t)$ :

$$f^*(t) = \sum_{k=-\infty}^{k=\infty} f(t)\delta(t - kT) \quad (4.32)$$

y se define la Transformada Z de  $f(t)$  como la transformada de Laplace de la función  $f^*(t)$ :

$$F(z) \equiv F^*(s) = \int_0^{+\infty} e^{-st} f^*(t) dt \quad (4.33)$$

pudiéndose comprobar fácilmente que esta definición es equivalente a la ec. (4.) si se considera que  $z = \exp(sT)$ .

Según el método de discretización basado en la Transformada Z, si  $F(s)$  es la función de transferencia de un elemento continuo, la función de transferencia discreta de dicho elemento,  $F(z)$ , vendrá dada por (*Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996*):

$$F(z) = Z \left[ L^{-1} [F(s)] \Big|_{t=kT} \right] \quad (4.34)$$

Este método se basa en considerar que se muestrea uniformemente la función  $f(t)$  y a la secuencia resultante  $f(kT)$  se la aplica la Transformada Z. En él se supone implícitamente que se puede realizar una reconstrucción ideal de una señal continua a partir de la señal muestreada. Este modo de discretización se denomina *método de respuesta impulso invariante*, porque considera que la respuesta impulso unitario debe ser la misma en ambos elementos, el continuo y el discreto. Por tanto, conserva las características del funcionamiento en el dominio del tiempo.

Existe otro método similar, denominado *método de respuesta paso invariante*, que supone que la respuesta paso unitario en ambos elementos, continuo y discreto, debe ser la misma (Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996). En este caso:

$$F(z) = (1 - z^{-1}) Z \left[ L^{-1} \left[ \frac{F(s)}{s} \right] \Big|_{t=kT} \right] \quad (4.35)$$

y equivale a considerar que no se puede reconstruir una señal continua a partir de la señal muestreada, por lo que introduce un elemento reconstructor o de sostenimiento de orden cero, cuya función de transferencia es  $G_{ZOH}(s)$ :

$$\begin{aligned} G_{ZOH}(s) &= \frac{1 - e^{-sT}}{s} \\ G_{ZOH}(z) &= 1 \end{aligned} \quad (4.36)$$

Este elemento de sostenimiento actúa de la siguiente forma: recibe una señal muestreada y su respuesta es una señal escalonada que coincide en cada instante de muestreo con la señal discreta y es constante en cada intervalo de muestreo. El conversor D/A del sistema de compensación contiene un elemento de sostenimiento de orden cero. Teniendo en cuenta la ec. (4.36), podemos escribir la ec. (4.35) de la siguiente forma:

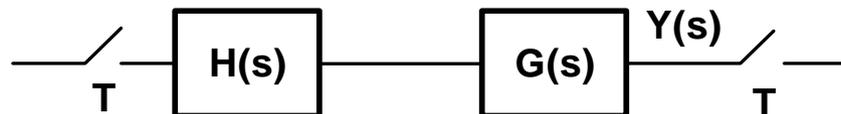
$$F(z) = Z \left[ L^{-1} \left[ F(s) G_{ZOH}(s) \right] \Big|_{t=kT} \right] \quad (4.37)$$

Aunque ambos métodos conservan características del funcionamiento en el dominio del tiempo y los resultados obtenidos con ellos son similares, difieren de forma significativa en un aspecto importante. Sería lógico pensar que si el período de muestreo,  $T$ , tiende a cero, entonces la función  $F(z)$  tiende a  $F(s)$ . Sin embargo, esto sólo se verifica en el segundo método (Kuo, 1992):

$$\begin{aligned} \lim_{T \rightarrow 0} \left[ \mathcal{Z} \left[ L^{-1} [F(s)] \right]_{t=kT} \right] &\neq F(s) \\ \lim_{T \rightarrow 0} \left[ \mathcal{Z} \left[ L^{-1} [G_{\text{ZOH}}(s)F(s)] \right]_{t=kT} \right] &= F(s) \end{aligned} \quad (4.38)$$

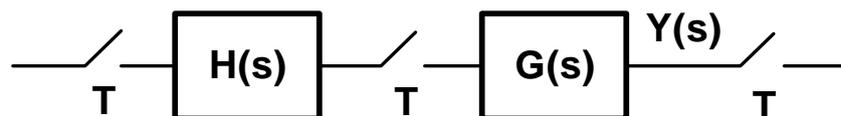
A la hora de discretizar un sistema mixto con funciones de transferencia continuas y discretas, debemos tener en cuenta dos reglas básicas de discretización (Kuo, 1992; Kuo, 1996):

- Cuando dos funciones continuas están conectadas en serie sin muestreadores intermedios, deben considerarse como una sola entidad respecto a la Transformada Z.



$$\begin{aligned} Y(s) &= G(s)H(s) \\ Y(z) = Y^*(s) &= (G(s)H(s))^* \neq G^*(s)H^*(s) = G(z)H(z) \end{aligned} \quad (4.39)$$

- Si existe un muestreador intercalado, deben ser tratadas independientemente respecto a la Transformada Z.



$$\begin{aligned} Y(s) &= G(s)H^*(s) \\ Y(z) = Y^*(s) &= (G(s)H^*(s))^* = G^*(s)H^*(s) = G(z)H(z) \end{aligned} \quad (4.40)$$

### 4.2.1. Respuesta directa.

En la trayectoria abierta sólo se encuentran elementos continuos cuya señal de salida final es muestreada (ver *Figura 4.6*). El procedimiento que hay que seguir es: evaluación de la señal de medida o señal no compensada,  $\Delta V_{NC}(s)$ , y muestreo posterior de dicha señal. Consideraremos primero un efecto térmico generado en la muestra:

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}(s) &= G_{2P}(s)W(s) \\ \Delta V^*_{NC}(s) &= (G_{2P}(s)W(s))^*\end{aligned}\tag{4.41}$$

y finalmente:

$$\Delta V_{NC}(z) = [G_{2P}W](z) = (1 - z^{-1})Z \left[ L^{-1} \left[ \frac{G_{2P}(s)W(s)}{s} \right] \right]_{t=kT}\tag{4.42}$$

pero no se puede factorizar, ya que la señal de potencia térmica de entrada no está muestreada previamente. Por lo tanto no se puede definir una función de transferencia discreta mediante la que podamos obtener la respuesta a cualquier señal de entrada por medio de un producto. Cada vez que queramos calcular una respuesta habrá que realizar una convolución con la señal de entrada. De ahí que esta sección no se denomine función de transferencia directa, sino respuesta directa. Si ahora consideramos un efecto térmico generado en el conjunto célula-sensor, se obtiene:

$$\Delta V_{NC}(z) = [G_{2P,0}W](z) = (1 - z^{-1})Z \left[ L^{-1} \left[ \frac{G_{2P,0}(s)W(s)}{s} \right] \right]_{t=kT}\tag{4.43}$$

---

#### 4.2.2. Respuesta en lazo cerrado.

Ahora tenemos una mezcla de señales continuas y discretas. No será posible evaluar las respuestas directa y de retroalimentación, para después calcular la respuesta en lazo cerrado. Esto se debe a que hay que tener en cuenta cómo están asociados los elementos continuos y discretos entre sí (ecs. (4.39) y (4.40)). En la trayectoria de retroalimentación, el voltaje no compensado,  $\Delta V_{NC}(s)$ , es muestreado y mediante el algoritmo digital de control se evalúa el voltaje muestreado de compensación. Posteriormente, el conversor D/A (que es un elemento de sostenimiento de orden cero) construye el voltaje de compensación  $\Delta V_C(s)$  continuo (a trozos), que es el que utilizan las termopilas de retroalimentación para generar la potencia Peltier de compensación:

$$\Delta V_C^*(s) = G_C^*(s)\Delta V_{NC}^*(s) \quad (4.44)$$

$$\Delta V_C(s) = G_{ZOH}(s)\Delta V_C^*(s) \quad (4.45)$$

$$W_K(s) = K(s)\Delta V_C(s) = K(s)G_{ZOH}(s)G_C^*(s)\Delta V_{NC}^*(s) \quad (4.46)$$

Utilizando la ec. (4.23), obtenemos la respuesta en lazo cerrado:

$$\Delta V_{NC}(s) = G_{2P}(s)W(s) - 2G_{2P,0}(s)K(s)G_{ZOH}(s)\Delta V_C^*(s) \quad (4.47)$$

muestreando esta expresión e incluyendo la función de control (algoritmo digital de control),  $G_C^*(s)$ , según la ec. (4.44) se llega finalmente a la siguiente expresión:

$$\Delta V_{NC}^*(s) = \frac{(G_{2P}(s)W(s))^*}{1 + (2G_{2P,0}(s)K(s)G_{ZOH}(s))^*G_C^*(s)} \quad (4.48)$$

$$\Delta V_{NC}(z) = \frac{[G_{2P}W](z)}{1 + [2G_{2P,0}KG_{ZOH}](z)G_C(z)}$$

En este desarrollo se ha considerado un efecto térmico procedente de la muestra. Si

ahora consideramos un efecto térmico generado en el conjunto célula sensor, obtendremos:

$$\Delta V_{NC}(z) = \frac{[G_{2P,0}W](z)}{1 + [2G_{2P,0}KG_{ZOH}](z)G_C(z)} \quad (4.49)$$

Se demuestra de esta forma que, como consecuencia de la existencia de muestreadores en la trayectoria de retroalimentación, la función de transferencia discreta no es un resultado inmediato. De forma intuitiva se podría pensar que, tanto en el sistema sin compensación como en el sistema con compensación, la relación que conduciría a la obtención de la función de transferencia discreta sería la siguiente:

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}(z) &= G_{2P}(z)W(z) \\ \Delta V_{NC}(z) &= \left[ \frac{G_{2P}}{1 + 2G_{2P,0}KG_{ZOH}G_C} \right](z)W(z) \end{aligned} \quad (4.50)$$

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}(z) &= G_{2P,0}(z)W(z) \\ \Delta V_{NC}(z) &= \left[ \frac{G_{2P,0}}{1 + 2G_{2P,0}KG_{ZOH}G_C} \right](z)W(z) \end{aligned} \quad (4.51)$$

en el caso de un efecto térmico generado en la muestra y generado en elemento sensor-célula, respectivamente. Es decir, la función de transferencia global del sistema retroalimentado sería la transformada Z de la función de transferencia global del sistema continuo retroalimentado. Pero, se observa claramente que estas expresiones no son válidas.

La función  $2(G_{2P,0}KG_{ZOH})(z)G_C(z)$  juega el papel de una función de transferencia en lazo abierto para el sistema discreto y a partir de sus características podremos inferir consecuencias sobre la respuesta en lazo cerrado.

Los numeradores de las ecuaciones que proporcionan la respuesta (ec. (4.48) y (4.49)) dependen de la señal de entrada. Pero, aunque no es posible obtener una función de

transferencia en lazo cerrado, la respuesta impulso unitario (ec. (A1.35)) podrá servir para estudiar la estabilidad y la evolución de las constantes de tiempo en función de los parámetros de control. Si calculamos la respuesta impulso discreta para un efecto térmico procedente de la muestra (ec. 4.49) obtenemos:

$$\Delta V_{NC}(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1 - \frac{p_2}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{p_1}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}}}{1 + b \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} G_C(z) \quad (4.52)$$

Y si consideramos un efecto térmico generado en el conjunto célula-sensor (ec. (4.50)):

$$\Delta V_{NC}(z) = A \frac{\varepsilon}{C_{SC}} \frac{\frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}}}{1 + b \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} G_C(z) \quad (4.53)$$

donde el denominador, que es el mismo en los dos casos, puede ser considerado como el polinomio característico, cuyas raíces serán los polos del sistema discreto. Se observa que la localización de éstos en el plano  $z$  dependerá del tipo de control digital y de los parámetros de este control. Para estudiar la evolución de tales polos utilizaremos el Criterio de Jury y la técnica de análisis del Lugar de las Raíces.

Sólo resta especificar la función de transferencia discreta del control digital,  $G_C(z)$ , para que quede determinada completamente la respuesta en lazo cerrado. Y está claro que si tomamos  $G_C(z)=0$ , se reduce a la respuesta directa. Todas las funciones de transferencia discretas que aparecen en las ecs. (4.49) y (4.50) se calculan mediante las ecs. (4.35) o (4.37), o la ec. (4.34), es decir, aplicando el método de respuesta paso invariante o el método de respuesta impulso invariante. En general, los resultados según uno u otro

método son completamente equivalentes. Sin embargo, si en una convolución de funciones una de ellas es la función de transferencia de un elemento de sostenimiento de orden cero, solamente aplicaremos el método de respuesta impulso invariante.

La función de transferencia del control digital  $G_C(z)$  se obtiene a partir del algoritmo implementado en el sistema de control digital (en nuestro caso, el ordenador). En dicho algoritmo se establece la dependencia de la señal de compensación  $\Delta V_C(kT)$  muestreada y la señal no compensada  $\Delta V_{NC}(kT)$  muestreada:

$$\Delta V_C(kT) = f(\Delta V_C(jT), \Delta V_{NC}(jT); j \leq k) \quad (4.54)$$

que es una ecuación en diferencias finitas. Si el propósito es utilizar un control lineal, esta ecuación debe ser lineal, pudiéndose aplicar la Transformada Z para obtener una expresión en el dominio de la frecuencia:

$$\Delta V_C(Z) = G_C(z) \Delta V_{NC}(z) \quad (4.55)$$

Conviene insistir en que existe una diferencia significativa entre un sistema continuo y uno discreto: en el discreto no siempre es posible obtener una función de transferencia. Esto es debido a que algunas veces, como en nuestro caso, la señal de entrada no se muestrea y no se puede factorizar la respuesta. Para calcular una respuesta a una determinada entrada habrá que convolucionar con la señal de entrada correspondiente. Una vez conocida la respuesta en el dominio  $z$ , se calculará la respuesta en el dominio temporal discreto mediante:

$$\Delta V_{NC}(kT) = Z^{-1}[\Delta V_{NC}(z)] \quad (4.52)$$

En el Capítulo 5 y los Apéndices A.1 y A.2 se presentan los conceptos y herramientas matemáticas que nos permitirán investigar el comportamiento del sistema microcalorimétrico, considerado como sistema continuo o discreto.

## **5. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DEL MICROCALORÍMETRO.**

Conviene detenerse un poco a estudiar las respuestas estándar que se emplean para investigar el comportamiento de un sistema y cómo se particularizan y aplican al dispositivo microcalorimétrico. Primero plantearemos todo para un sistema genérico, concretando luego en el caso de un microcalorímetro. Consideraremos un modelo continuo y uno discreto, desarrollando un conjunto de herramientas con el que abordaremos con éxito el análisis del sistema microcalorimétrico.

Se va a hacer uso del formalismo de la Transformada de Laplace y de la Transformada Z, métodos aplicables a sistemas lineales invariantes en el tiempo. Pero no se va a realizar una exposición completa de dicho formalismo, sino que se van a utilizar las propiedades más relevantes con el fin de elaborar un esquema de análisis aplicable al modelo desarrollado sobre el dispositivo y que permita un estudio exhaustivo de su comportamiento.

### **5.1. Sistema continuo.**

#### *5.1.1. Principios generales.*

Supongamos que  $G(s)$  es la función de transferencia de un sistema,  $X(s)$  es la señal de entrada o estímulo e  $Y(s)$  es la señal de salida o respuesta, todas ellas definidas en el dominio de la frecuencia. Si el sistema es lineal, causal (realizable físicamente) e invariante temporal (autónomo), entre estas funciones se verifican las relaciones siguientes

---

en el dominio del tiempo y de la frecuencia:

$$\begin{aligned}y(t) &= \int_0^t g(t-t')x(t')dt' \\ Y(s) &= G(s)X(s)\end{aligned}\tag{5.1}$$

donde las funciones en mayúscula son las Transformadas de Laplace de las funciones temporales, en minúscula. La función  $g(t)$  recibe el nombre de propagador o función ponderatriz del sistema y relaciona la respuesta del sistema en un instante  $t$  con la entrada en instantes  $t'$  anteriores. Si se conoce la función de transferencia y la entrada del sistema, la respuesta en el dominio de la frecuencia compleja se determina mediante el producto de las primeras. La posterior aplicación de la Transformada Inversa de Laplace permite obtener la respuesta en el dominio del tiempo. De este modo, un sistema físico se puede interpretar de forma abstracta como una aplicación que establece una correspondencia entre la función entrada y la función respuesta. Impondremos la condición de que cualquier señal considerada será nula para tiempos negativos.

Hay tres funciones estándar empleadas como señales de entrada en el análisis de un sistema: impulso unitario, paso unitario y pulso unitario de anchura finita. Su expresión respectiva es:

$$\begin{aligned}x(t) = \delta(t) & \quad X(s) = 1 \\ x(t) = \chi(t) & \quad X(s) = \frac{1}{s} \\ x(t) = \chi(t) - \chi(t - \Delta) & \quad X(s) = \frac{1 - e^{-s\Delta}}{s}\end{aligned}\tag{5.2}$$

donde  $\delta(t)$  es la función Delta de Dirac,  $\chi(t)$  es la función de Heaviside y  $\Delta$  es la duración en el tiempo del pulso. Para simplificar, las llamaremos entrada impulso, paso y pulso, respectivamente. Tendrán asociadas una respuesta impulso, paso y pulso:

$$\begin{aligned}
y_{\delta}(t) &= \int_0^t g(t-t')\delta(t')dt' = g(t) & Y_{\delta}(s) &= G(s) \\
y_{\chi}(t) &= \int_0^t g(t-t')\chi(t')dt' & Y_{\chi}(s) &= G(s)\frac{1}{s} \\
y_{\Delta}(t) &= \int_0^t g(t-t')(\chi(t') - \chi(t' - \Delta))dt' & Y_{\Delta}(s) &= G(s)\frac{1 - e^{-s\Delta}}{s}
\end{aligned} \tag{5.3}$$

existiendo entre dichas respuestas las relaciones siguientes:

$$\begin{aligned}
Y_{\chi}(s) &= Y_{\delta}(s)\frac{1}{s} \\
Y_{\Delta}(s) &= Y_{\chi}(s)(1 - e^{-s\Delta}) = Y_{\delta}(s)\frac{1 - e^{-s\Delta}}{s}
\end{aligned} \tag{5.4}$$

$$\begin{aligned}
y_{\chi}(t) &= \int_0^t y_{\delta}(t')dt' \\
y_{\Delta}(t) &= y_{\chi}(t) - y_{\chi}(t - \Delta) = \int_{t-\Delta}^t y_{\delta}(t')dt'
\end{aligned}$$

de donde se deduce que la respuesta impulso en el dominio de la frecuencia es exactamente la función de transferencia del sistema y en el dominio del tiempo coincide con el propagador del sistema. En este resultado se basa un método de caracterización del dispositivo (caracterizar el sistema significa determinar su función de transferencia): obtención de la respuesta impulso y aplicación de la Transformada de Laplace para conseguir la función de transferencia. Pero esto tiene un serio inconveniente, puesto que la entrada impulso no es físicamente realizable. El procedimiento seguido para subsanar este problema es registrar la respuesta paso y derivar en el dominio del tiempo para llegar a la respuesta impulso, ya que según las ecs. (5.3), la respuesta paso es la función integral de la respuesta impulso. También se puede aplicar directamente la Transformada de Laplace directamente sobre la respuesta paso y obtener  $G(s)/s$ . Otro procedimiento consiste en emplear señales de entrada senoidales y determinar directamente la función de transferencia en el plano  $s$  a través de la respuesta en frecuencia (*Randzio et al., 1980; López Mayorga et al., 1984*). Aunque estas alternativas ya no plantean problemas de irrealizabilidad, sí presentan algunos inconvenientes. Teniendo en cuenta que la señal registrada es en definitiva una señal muestreada o secuencia temporal de datos, afectada de cierto nivel de ruido, surgen problemas de carácter numérico a la hora de evaluar la

---

derivada y de trabajar con señales muestreadas en el dominio de la Transformada de Laplace. Por otra parte, la determinación de la respuesta en frecuencia es un método que consume mucho tiempo. El método de caracterización empleado en esta Memoria es mucho más simple que los mencionados y no posee ninguna de sus desventajas, ya que trabaja siempre en el dominio del tiempo y no conlleva ningún tratamiento de datos numérico, siendo además un procedimiento muy rápido.

Definimos las funciones:

$$\begin{aligned}
 Area(t; \delta) &= \int_0^t y_\delta(t') dt' \\
 Area(t; \Delta) &= \int_0^t y_\Delta(t') dt' \\
 Area(s; \delta) &= Y_\delta(s) \frac{1}{s} = Y_\chi(s) \\
 Area(s; \Delta) &= Y_\Delta(s) \frac{1}{s} = Y_\chi(s) \frac{1 - e^{-s\Delta}}{s} = Y_\delta(s) \frac{1 - e^{-s\Delta}}{s^2}
 \end{aligned} \tag{5.5}$$

demostrándose que la función  $Area(s; \delta)$  coincide con la respuesta paso. Esto es lógico ya que sabemos que esta última es la integral de la respuesta impulso. También definimos los valores límite de las funciones área y de la respuesta paso mediante:

$$\begin{aligned}
 Area(\delta) &= \lim_{t \rightarrow +\infty} [Area(t; \delta)] \\
 Area(\Delta) &= \lim_{t \rightarrow +\infty} [Area(t; \Delta)] \\
 y(+\infty; \chi) &= \lim_{t \rightarrow +\infty} [y_\chi(t)]
 \end{aligned} \tag{5.6}$$

y haciendo uso del *Teorema del Valor Final* de la Transformada de Laplace:

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} [f(t)] = \lim_{s \rightarrow 0} [sF(s)] \tag{5.7}$$

obtenemos los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}
Area(\delta) &= Y_\delta(0) = G(0) \\
Area(\Delta) &= Y_\delta(0)\Delta = G(0)\Delta \\
y(+\infty; \chi) &= Y_\delta(0) = G(0)
\end{aligned} \tag{5.8}$$

siendo  $G(0)$  una constante que representa la ganancia en estado estacionario o ganancia estática del sistema, representándola a lo largo de toda esta Memoria con el símbolo  $K_0$ . Esta ganancia se puede considerar como el valor de la función de transferencia en  $s=0$  o como la integral extendida a todo el tiempo de la respuesta impulso, ya que según la definición de la Transformada de Laplace de una función continua (ec. (4.3)):

$$\lim_{s \rightarrow 0} [F(s)] = \int_0^{+\infty} f(t') dt' \tag{5.9}$$

### 5.1.2. Aplicación a la microcalorimetría.

La utilidad práctica de estos resultados se comprende cuando tenemos en cuenta que en microcalorimetría se evalúa el calor de reacción calculando el área del termograma correspondiente a la respuesta de un microcalorímetro. Entonces, traduzcamos todo lo que se ha visto hasta ahora al lenguaje “microcalorimétrico”. De este modo, la función de transferencia del microcalorímetro es  $G(s)$ , la señal de entrada es la potencia  $W(s)$  y la respuesta es el termograma registrado  $\Delta V_{NC}(s)$ . La señales estándar en microcalorimetría son: impulso de calor  $Q$ , paso de potencia  $W_0$  y pulso de potencia  $W_0$  y anchura  $\Delta$ . Teniendo en cuenta las ecs. (5.2):

$$\begin{aligned}
W(t; \delta) = Q\delta(t) &\Rightarrow \Delta V_{NC}(t; \delta) \\
W(t; \chi) = W_0\chi(t) &\Rightarrow \Delta V_{NC}(t; \chi) \\
W(t; \Delta) = W_0(\chi(t) - \chi(t - \Delta)) &\Rightarrow \Delta V_{NC}(t; \Delta)
\end{aligned} \tag{5.10}$$

$$\begin{aligned}
Area_{NC}(t; \delta) &= \int_0^t \Delta V_{NC}(t'; \delta) dt' \\
Area_{NC}(t; \Delta) &= \int_0^t \Delta V_{NC}(t'; \Delta) dt'
\end{aligned} \tag{5.11}$$

de modo que se obtienen los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}
 Area_{NC}(\delta) &= G(0)Q = K_0Q \\
 Area_{NC}(\Delta) &= G(0)W_0\Delta = K_0W_0\Delta \\
 \Delta V_{NC}(+\infty; \chi) &= G(0)W_0 = K_0W_0
 \end{aligned}
 \tag{5.12}$$

Los métodos de calibración empleados en la práctica en microcalorimetría (*Tanaka, 1983; Della Gatta, 1985; Grønlund, 1991*) se basan en las ecs. (5.12):

- Registro de una serie de respuestas paso y ajuste lineal entre potencia generada,  $W_0$ , y valor en estado estacionario del voltaje medido,  $\Delta V_{NC}(+\infty; \chi)$ .
- Registro de una serie de respuestas pulso y ajuste lineal entre calor generado,  $Q=W_0\Delta$ , y área bajo cada pulso,  $Area_{NC}(\Delta)$ .

La constante de proporcionalidad en los dos casos es la misma,  $K_0$ , la ganancia en estado estacionario del sistema. Realmente no existe un método basado en la respuesta impulso, ya que hemos comentado que la señal de potencia impulso no es realizable físicamente y es una mera herramienta de análisis teórico de sistemas. La constante de calibración,  $K_{CAL}$ , se define a través de la ganancia en estado estacionario como:

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0} = \frac{1}{\lim_{s \rightarrow 0} [G(s)]} = \frac{1}{\int_0^{+\infty} g(t) dt}
 \tag{5.13}$$

y lo hacemos de esta forma para que tenga unidades de  $WV^{-1}$ . Si la señal de voltaje,  $\Delta V_{NC}(t)$ , es multiplicada por dicha constante, se obtiene directamente el termograma de potencia. La convergencia de la integral impropia está garantizada si el sistema es estable (véase Apéndice A1).

Para terminar, aunque no lo hemos visto en el caso genérico, vamos a considerar

una señal de potencia de entrada no estándar indeterminada,  $W(t)$ , que tendrá asociada una respuesta,  $\Delta V_{NC}(t)$ . Están relacionadas a través de la función de transferencia o propagador del sistema microcalorimétrico (ec. (5.1)):

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}(t) &= \int_0^t g(t-t')W(t')dt' \\ \Delta V_{NC}(s) &= G(s)W(s)\end{aligned}\quad (5.14)$$

Definimos una función área genérica:

$$\begin{aligned}Area_{NC}(t) &= \int_0^t \Delta V_{NC}(t')dt' = \int_0^t \int_0^{t'} g(t'-t'')W(t'')dt''dt' \\ Area_{NC}(s) &= \Delta V_{NC}(s) \frac{1}{s} = G(s)W(s) \frac{1}{s}\end{aligned}\quad (5.15)$$

$$\begin{aligned}Area_{NC} &= \lim_{t \rightarrow +\infty} [Area_{NC}(t)] = \int_0^{+\infty} \Delta V_{NC}(t')dt' \\ Area_{NC} &= \lim_{s \rightarrow 0} [s Area_{NC}(s)] = \lim_{s \rightarrow 0} [\Delta V_{NC}(s)] = \lim_{s \rightarrow 0} [G(s)W(s)]\end{aligned}\quad (5.16)$$

y estas ecuaciones nos proporcionan dos procedimientos operativos para evaluar áreas: integrar directamente la respuesta en el dominio del tiempo o evaluar la respuesta en  $s=0$  en el dominio de la frecuencia. Si ahora tenemos en cuenta la ec. (5.9) y que  $W(s)$  es una potencia térmica, la ec. (5.16) quedará:

$$Area_{NC} = \int_0^{+\infty} \Delta V_{NC}(t')dt' = K_0 Q = \frac{1}{K_{CAL}} Q \quad (5.17)$$

siendo  $Q$  el calor total desarrollado durante el efecto térmico descrito por la señal de potencia térmica  $W(t)$ . Se comprueba que la constante de calibración determinada mediante cualquiera de los dos métodos indicados es la misma que aparece en la ecuación (5.17).

Todo lo que se ha desarrollado aquí es válido tanto para la señal compensada y como para la señal no compensada. Para esta última hay que tener en cuenta que:

$$\begin{aligned}\Delta V_C(t) &= \int_0^t g_C(t-t')\Delta V_{NC}(t')dt' \\ \Delta V_C(s) &= G_C(s)\Delta V_{NC}(s)\end{aligned}\tag{5.18}$$

donde  $g_C(t)$  es la respuesta impulso o propagador del sistema de control y  $G_C(s)$  su función de transferencia.

## 5.2. Sistema discreto.

### 5.2.1. Principios generales.

Aunque no se puede obtener una función de transferencia discreta del microcalorímetro porque la expresión de la respuesta no factoriza adecuadamente, vamos a considerar inicialmente un sistema discreto en que esto sí es posible. Una solución posible para este hecho consiste en imaginar un muestreador ficticio para la señal de entrada (*Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996*) y así factoriza dicha expresión. Más tarde se verá que si no hay factorización, bajo ciertas aproximaciones se puede considerar que sí la hay. De todos modos, la imposibilidad de factorizar la respuesta discreta no constituye un problema; únicamente impone la necesidad de convolucionar con cada entrada cada vez que se quiera determinar la respuesta a dicha entrada. Supongamos que  $G(z)$  es la función de transferencia de un sistema,  $X(z)$  es la señal de entrada o estímulo e  $Y(z)$  es la señal de salida o respuesta, definidas en el dominio de la frecuencia. Si el sistema es lineal, causal e invariante temporal (autónomo), entre estas funciones se verifican las relaciones siguientes en el dominio del tiempo (discreto) y de la frecuencia:

$$\begin{aligned}y(kT) &= \sum_{j=0}^k g((k-j)T)x(jT) \\ Y(z) &= G(z)X(z)\end{aligned}\tag{5.19}$$

donde las funciones en mayúscula son las Transformadas Z de las funciones en minúscula,

$k$  y  $j$  son contadores discretos y  $T$  es el período de muestreo de las señales. La función  $g(kT)$  recibe el nombre de propagador del sistema discreto, conectando la respuesta en un instante de muestreo  $kT$  con la entrada en instantes de muestreo  $jT$  anteriores. Si se conoce la función de transferencia y la entrada del sistema, la respuesta en el dominio de la frecuencia se determina mediante el producto de las primeras. La posterior aplicación de la Transformada Z Inversa permite obtener la respuesta en el dominio del tiempo. Impondremos también la condición de que cualquier señal considerada será nula para instantes de muestreo negativos.

Igual que en el caso continuo, hay tres funciones estándar empleadas como señales de entrada en el análisis de un sistema discreto: impulso unitario, paso unitario y pulso unitario de anchura finita. Las correspondientes expresiones son:

$$\begin{aligned} x(kT) &= \delta_{k,0} & X(z) &= 1 \\ x(kT) &= T \sum_{j=0}^{\infty} \delta_{j,0} & X(z) &= T \frac{1}{(1-z^{-1})} \\ x(kT) &= \sum_{j=0}^N \delta_{j,0} & X(z) &= \frac{(1-z^{-N})}{(1-z^{-1})} \end{aligned} \quad (5.20)$$

donde  $\delta_{k,j}$  es la función Delta de Kronecker y  $N$  es la duración del pulso en instantes de muestreo. Para simplificar, las llamaremos entrada impulso, paso y pulso, respectivamente. Aunque parece un poco extraña la definición de la función paso, es conveniente que adopte esta forma según se verá más adelante. Tendrán asociadas una respuesta impulso, paso y pulso, respectivamente:

$$\begin{aligned} y_{\delta}(kT) &= \sum_{j=0}^k g((k-j)T) \delta_{j,0} = g(kT) & Y_{\delta}(z) &= G(z) \\ y_{\chi}(kT) &= T \sum_{j=0}^k g((k-j)T) \sum_{i=0}^{\infty} \delta_{i,j} & Y_{\chi}(z) &= TG(z) \frac{1}{(1-z^{-1})} \\ y_N(kT) &= \sum_{j=0}^k g((k-j)T) \sum_{i=0}^N \delta_{i,j} & Y_N(z) &= G(z) \frac{(1-z^{-N})}{(1-z^{-1})} \end{aligned} \quad (5.21)$$

existiendo entre dichas respuestas las relaciones siguientes:

$$\begin{aligned}
Y_\chi(z) &= TY_\delta(z) \frac{1}{(1-z^{-1})} \\
Y_N(z) &= \frac{1}{T} Y_\chi(z) (1-z^{-N}) = Y_\delta(z) \frac{(1-z^{-N})}{(1-z^{-1})}
\end{aligned}
\tag{5.22}$$

$$\begin{aligned}
y_\chi(kT) &= T \sum_{j=0}^k y_\delta(jT) \\
y_N(kT) &= \frac{1}{T} (y_\chi(kT) - y_\chi((k-N)T)) = \sum_{j=k-N}^k y_\delta(jT)
\end{aligned}$$

de donde se deduce que la respuesta impulso en el dominio de la frecuencia no es otra cosa que la función de transferencia del sistema y en el dominio del tiempo coincide con el propagador.

De forma análoga al caso continuo, definimos las funciones área:

$$\begin{aligned}
Area(kT; \delta) &= T \sum_{j=0}^k y_\delta(jT) \\
Area(kT; N) &= T \sum_{j=0}^k y_N(jT)
\end{aligned}
\tag{5.23}$$

$$\begin{aligned}
Area(z; \delta) &= TY_\delta(z) \frac{1}{(1-z^{-1})} = Y_\chi(z) \\
Area(z; N) &= TY_N(z) \frac{1}{(1-z^{-1})} = Y_\chi(z) \frac{(1-z^{-N})}{(1-z^{-1})} = Y_\delta(z) \frac{(1-z^{-N})}{(1-z^{-1})^2}
\end{aligned}$$

La razón de multiplicar por el período de muestreo,  $T$ , es que interesa que las ecs. (5.23) sean homogéneas dimensionalmente cuando las apliquemos en microcalorimetría. Se observa que la función  $Area(z; \delta)$  coincide con la respuesta paso. La definición de la entrada paso en ec. (5.20) tiene como objetivo que esta propiedad se conserve en sistemas discretos. También definimos los valores límite:

$$\begin{aligned}
Area(\delta) &= \lim_{k \rightarrow +\infty} [Area(kT; \delta)] \\
Area(N) &= \lim_{k \rightarrow +\infty} [Area(kT; N)] \\
y(+\infty; \chi) &= \lim_{k \rightarrow +\infty} [y_{\chi}(kT)]
\end{aligned}
\tag{5.24}$$

y haciendo uso del *Teorema del Valor Final* de la Transformada Z:

$$\lim_{k \rightarrow +\infty} [f(kT)] = \lim_{z \rightarrow 1} [(1 - z^{-1})F(z)]
\tag{5.25}$$

obtenemos los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}
Area(\delta) &= TY_{\delta}(1) = TG(1) \\
Area(N) &= TY_{\delta}(1)N = TG(1)N \\
y(+\infty; \chi) &= TY_{\delta}(1) = TG(1)
\end{aligned}
\tag{5.26}$$

siendo  $G(1)$  una constante que representa la ganancia en estado estacionario o ganancia estática del sistema discreto, representándola a lo largo de toda esta Memoria con el símbolo  $K_0$ . Esta ganancia se puede considerar como el valor de la función de transferencia en  $z=1$  o como la suma extendida a todos los instantes de muestreo de la respuesta impulso, ya que según la definición de la Transformada Z de una secuencia de valores muestreados (ec. (4.31)):

$$\lim_{z \rightarrow 1} [F(z)] = \sum_{k=0}^{\infty} f(kT)
\tag{5.27}$$

### 5.2.2. Aplicación a la microcalorimetría.

Nuevamente, la utilidad de estos resultados se entiende cuando tenemos en cuenta que en microcalorimetría se evalúa el calor de reacción calculando el área del termograma correspondiente a la respuesta del microcalorímetro. Los datos de que dispondremos serán discretos en el tiempo, por lo que para obtener áreas tendremos que sumar datos, básicamente. Existen numerosos algoritmos de integración (trapezoidal, regla de Simpson,

etc.), pero el procedimiento que se obtiene de forma natural con este tratamiento es el de una suma simple de datos.

Supongamos que la función de transferencia del microcalorímetro es  $G(z)$ , la señal de entrada es la potencia  $W(z)$  y la respuesta es  $\Delta V_{NC}(z)$ . Las señales estándar en microcalorimetría son: impulso de potencia  $W_0$ , paso de potencia  $W_0$  y pulso de potencia  $W_0$  y anchura  $N$ . En el sistema continuo, debido a las características especiales de la función Delta de Dirac, dicha función representa un calor total instantáneo concentrado en  $t=0$ . Ahora, todas las funciones discretas poseen las mismas características y están constituídas por uno o más impulsos de potencia. Teniendo en cuenta las ecuaciones anteriores (desde (5.20) en adelante):

$$\begin{aligned}
 W(kT; \delta) &= W_0 \delta_{k,0} & \Rightarrow & \Delta V_{NC}(kT; \delta) \\
 W(kT; \chi) &= W_0 T \sum_{j=0}^{\infty} \delta_{j,0} & \Rightarrow & \Delta V_{NC}(kT; \chi) \\
 W(kT; N) &= W_0 T \sum_{j=0}^N \delta_{j,0} & \Rightarrow & \Delta V_{NC}(kT; N)
 \end{aligned} \tag{5.28}$$

$$\begin{aligned}
 Area_{NC}(kT; \delta) &= T \sum_{j=0}^k \Delta V_{NC}(jT; \delta) \\
 Area_{NC}(kT; N) &= T \sum_{j=0}^k \Delta V_{NC}(jT; N)
 \end{aligned} \tag{5.29}$$

de modo que se obtienen los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}
 Area_{NC}(\delta) &= G(1)W_0T = K_0W_0T \\
 Area_{NC}(N) &= G(1)W_0NT = K_0W_0NT \\
 \Delta V_{NC}(+\infty; \chi) &= G(1)W_0 = K_0W_0
 \end{aligned} \tag{5.30}$$

Los métodos empleados en la calibración de un microcalorímetro se basan en las ecs. (5.30), que constituyen la versión discreta de las ecs. (5.12):

- Registro de una serie de respuestas paso y ajuste lineal entre potencia generada,

$W_0$ , y valor en estado estacionario del voltaje medido,  $\Delta V_{NC}(+\infty; \chi)$ .

- Registro de una serie de respuestas pulso y ajuste lineal entre calor generado,  $Q=W_0NT$ , y área bajo cada pulso de anchura  $N$ ,  $Area_{NC}(N)$ .

La constante de proporcionalidad en los dos casos es la misma,  $K_0$ , que es la ganancia en estado estacionario del sistema. La constante de calibración,  $K_{CAL}$ , se define nuevamente:

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0} = \frac{1}{\lim_{z \rightarrow 1} [G(z)]} = \frac{1}{\sum_0^{+\infty} g(kT)} \quad (5.31)$$

estando garantizada la convergencia de la suma infinita si el sistema es estable (véase Apéndice A1).

Finalmente, vamos a considerar una señal de potencia de entrada no estándar indeterminada,  $W(kT)$ , que tendrá asociada una respuesta,  $\Delta V_{NC}(kT)$ . Están relacionadas a través de la función de transferencia o propagador del sistema microcalorimétrico (ec. (5.19)):

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}(kT) &= \sum_{j=0}^k g((k-j)T)W(jT) \\ \Delta V_{NC}(z) &= G(z)W(z) \end{aligned} \quad (5.32)$$

Definimos una función área genérica:

$$\begin{aligned} Area_{NC}(k) &= T \sum_{j=0}^k \Delta V_{NC}(jT) = T \sum_{j=0}^k \sum_{l=0}^j g((k-l)T)W(lT) \\ Area_{NC}(z) &= T \Delta V_{NC}(z) \frac{1}{(1-z^{-1})} = TG(z)W(z) \frac{1}{(1-z^{-1})} \end{aligned} \quad (5.33)$$

$$\begin{aligned}
Area_{NC} &= \lim_{k \rightarrow +\infty} [Area_{NC}(kT)] = T \sum_{j=0}^{\infty} \Delta V_{NC}(kT) \\
Area_{NC} &= \lim_{z \rightarrow 1} [(1 - z^{-1}) Area_{NC}(z)] = \lim_{z \rightarrow 1} [T \Delta V_{NC}(z)] = \lim_{z \rightarrow 1} [TG(z)W(z)]
\end{aligned}
\tag{5.34}$$

proporcionando estas ecuaciones dos procedimientos operativos para evaluar áreas: sumar en el dominio del tiempo discreto la respuesta o evaluar en  $z=1$  la respuesta en el dominio de la frecuencia, multiplicando luego por el período de muestreo,  $T$ . Si ahora tenemos en cuenta la ec. (5.27) y que  $W(z)$  es una potencia térmica, la ec. (5.34) quedará:

$$Area_{NC} = T \sum_{k=0}^{\infty} \Delta V_{NC}(kT) = K_0 Q = \frac{1}{K_{CAL}} Q
\tag{5.35}$$

siendo  $Q$  el calor total desarrollado durante el efecto térmico descrito por la señal de potencia térmica  $W(kT)$ . Se comprueba que la constante de calibración determinada mediante cualquiera de los dos métodos indicados es la misma que aparece en la ec. (5.30).

Si la respuesta discreta no factoriza adecuadamente, no se puede obtener una función de transferencia discreta. Hay dos posibles soluciones a este problema. Una ya se comentó anteriormente: introducir un muestreador ficticio para la señal de entrada. La otra posibilidad se basa en considerar que tanto  $x(t)$  como  $g(t)$  son constantes en cada intervalo de muestreo:

$$\begin{aligned}
Y(z) &= Z \left[ L^{-1} [Y(s)] \Big|_{t=kT} \right] = Z \left[ L^{-1} [G(s)X(s)] \Big|_{t=kT} \right] = \\
&= Z \left[ \int_0^{kT} g(kT - t') x(t') dt' \right] \cong Z \left[ \sum_{j=0}^k g((k-j)T) x(jT) \right] = \\
&= G(z)X(z)
\end{aligned}
\tag{5.36}$$

Por tanto, con esta aproximación, válida si  $T$  es suficientemente pequeño, todas las ecuaciones anteriores son válidas también en un sistema que no factoriza convenientemente y la respuesta impulso es una buena representación de la posible función de transferencia discreta del sistema. Esta función de transferencia discreta global es la

Transformada Z de la función de transferencia continua global del sistema. Sin embargo, no calcularemos así la respuesta del sistema, ya que el modo correcto se indicó en las ecs. (4.50) y (4.51).

Por ahora hemos supuesto que el muestreo y la reconstrucción de señales son ideales, ya que el método de discretización empleado ha sido el de *respuesta impulso invariante*. Ahora vamos a emplear muestreo y reconstrucción no ideales, introduciendo un elemento de sostenimiento de orden cero. Es decir, aplicaremos el método de discretización de *respuesta paso invariante*:

$$\begin{aligned}
 Y(z) &= Z\left[L^{-1}\left[G_{\text{ZOH}}(s)Y(s)\right]\Big|_{t=kT}\right] = (1-z^{-1})Z\left[L^{-1}\left[\frac{G(s)X(s)}{s}\right]\Big|_{t=kT}\right] = \\
 &= (1-z^{-1})Z\left[L^{-1}\left[Y_{\chi}(s)X(s)\right]\Big|_{t=kT}\right] = \\
 &= (1-z^{-1})Z\left[\int_0^{kT} y_{\chi}(kT-t')x(t')dt'\right] = \\
 &= (1-z^{-1})Z\left[\sum_{j=0}^k y_{\chi}((k-j)T)x(jT)\right] = \\
 &= (1-z^{-1})Y_{\chi}(z)X(z) = TG(z)X(z)
 \end{aligned} \tag{5.37}$$

donde no ha hecho falta hacer ninguna aproximación, ya que el elemento de sostenimiento de orden cero asegura que entre los instantes de muestreo las funciones son constantes. Además, se observa que en el resultado final de ec. (5.37) aparece el período de muestreo (está implícitamente en la señal  $Y(z)$ ) y en la ec. (5.36) no aparece (por tanto, no está incluido en  $Y(z)$ ). Esto significa que cuando haya que evaluar áreas, ya sea en el dominio temporal discreto o en el de la frecuencia, tendremos en cuenta que:

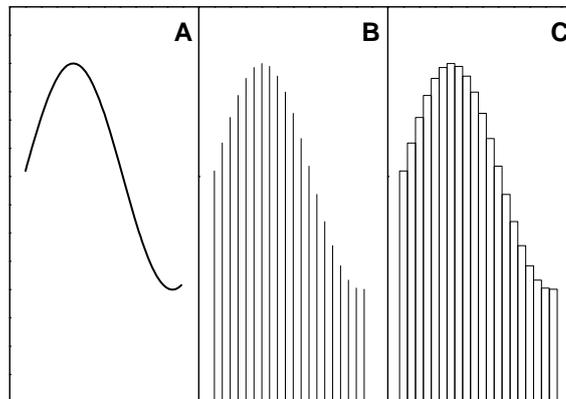
- Si se ha utilizado el método de respuesta impulso invariante o no aparece ningún elemento de sostenimiento de orden cero entre las funciones que han sido convolucionadas, hay que multiplicar por el período de muestreo  $T$ .
- Si se ha utilizado el método de respuesta paso invariante o aparece algún elemento de sostenimiento de orden cero entre las funciones que han sido

---

convolucionadas, no hay que multiplicar por el período de muestreo  $T$ .

Si en el primer caso no se quiere añadir el factor  $T$ , se puede considerar que la señal de entrada no está constituida por una secuencia de impulsos de potencia térmica,  $W(kT)$ , sino una secuencia de impulsos de calor,  $Q(kT)=W(kT)T$ .

Esto se comprende fácilmente si atendemos al efecto del elemento de sostenimiento de orden cero. En la *Figura 5.1* se ilustra cómo, a partir de una señal continua (A), se obtiene una señal muestreada idealmente (B). Esta representación de la señal es suficiente para el primer método, ya que supone que la reconstrucción es también ideal. Sin embargo, en el segundo método aparece un sostenimiento de orden cero que reconstruye la señal creando una señal constante a trozos (C). Para calcular áreas en (B) hay que multiplicar el valor de la señal en cada instante de muestreo por el período de muestreo y sumar, mientras que en (C), se puede integrar (en la versión discretizada, simplemente sumar).



*Figura 5.1.* Muestreo ideal (B) de una señal continua (A) y reconstrucción con elemento de sostenimiento de orden cero (C).

Las ecs. (5.14) y (5.32) constituyen las ecuaciones básicas del método de deconvolución o corrección dinámica (obtención de la termogénesis,  $W$ , a partir del termograma,  $K_{CAL}\Delta V_{NC}$ ) en el dominio del tiempo y de la frecuencia, para sistemas continuos y discretos, respectivamente. Para realizar la deconvolución en el dominio temporal se puede utilizar una versión discretizada de la ecuación diferencial que relaciona la termogénesis con el termograma (ec. (2.5)) o la ec. (5.32), que podría interpretarse como

la versión discretizada de la ec. (5.14):

$$W(kT) = \frac{\Delta V_{NC}(kT) - \sum_{j=0}^{k-1} g((k-j)T)W(jT)}{g(0)} \quad (5.38)$$

$$W(kT) = \frac{\Delta V_{NC}((k+1)T) - \sum_{j=0}^{k-1} g((k-j+1)T)W(jT)}{g(1)}$$

empleando una u otra forma dependiendo de que la respuesta impulso tenga un valor nulo en el instante inicial.

Es evidente el acusado paralelismo y la total equivalencia entre los tratamientos continuo y discreto. Sin embargo, habría que hacer pequeña matización: la ganancia en estado estacionario (o la constante de calibración) debería ser la misma en el sistema tratado como continuo y como discreto. Debido a los efectos característicos de discretización, que no surgen en un sistema continuo, en general se verificará que:

$$K_{0,DISCRETO} = K_{0,CONTINUO} f(T, \{\tau_i, \tau_i^*\}) \quad (5.39)$$

$$\lim_{\substack{T \rightarrow 0 \\ T > \tau_i \\ T > \tau_i^*}} [f(T, \{\tau_i, \tau_i^*\})] = 1$$

donde los parámetros  $\tau_i$  y  $\tau_i^*$  son las constantes de tiempo del dispositivo, asociadas con los polos y los ceros de la función de transferencia, y  $f$  es una función que representa la influencia de la discretización..

En el sistema discreto también podemos aplicar todos estos resultados para analizar la señal compensada  $\Delta V_C(kT)$  sin más que tener en cuenta que ambas son señales muestreadas y que están relacionadas en el dominio del tiempo a través del propagador o respuesta impulso discreta del control digital implementado y en el dominio de la frecuencia mediante la función de transferencia discreta de dicho control. Aquí si se puede

---

hablar de función de transferencia porque todos los elementos que están ahora involucrados son discretos (digitales).

$$\begin{aligned}\Delta V_C(kT) &= \sum_0^k g_C((k-j)T)\Delta V_{NC}(jT) \\ \Delta V_C(z) &= G_C(z)\Delta V_{NC}(z)\end{aligned}\tag{5.40}$$

Conviene aclarar que, si bien hemos utilizado la versión *forward* para definir la función área, también se puede emplear la fórmula *backward*:

$$\begin{aligned}Area_{NC}(k) &= T \sum_{j=0}^{k-1} \Delta V_{NC}(jT) \\ Area_{NC}(z) &= T \Delta V_{NC}(z) \frac{z^{-1}}{(1-z^{-1})}\end{aligned}\tag{5.41}$$

o la fórmula trapezoidal:

$$\begin{aligned}Area_{NC}(k) &= \frac{T}{2} \sum_{j=0}^k (\Delta V_{NC}(jT) + \Delta V_{NC}((j-1)T)) \\ Area_{NC}(z) &= \frac{T}{2} \Delta V_{NC}(z) \left( \frac{1+z^{-1}}{1-z^{-1}} \right)\end{aligned}\tag{5.42}$$

obteniéndose los mismos resultados.

### 5.3. Error en estado estacionario.

Un criterio de evaluación de la efectividad de la retroalimentación en un sistema consiste en analizar el comportamiento de la señal de error,  $e(t)$  o  $E(s)$  (*Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996*). Esta señal de error se define como la diferencia entre la señal de entrada y la señal de retroalimentación. En nuestro caso, al

aplicar este concepto al dispositivo microcalorimétrico tratado como sistema continuo, la señal de error en el dominio de la frecuencia se expresa:

$$E(s) = W(s) - 2K(s)\Delta V_C(s) \quad (5.43)$$

y utilizando las ecs. (4.24) y (4.25) se obtienen las expresiones de la señal de error en el caso de un efecto térmico generado en la muestra ( $S$ ) y en el conjunto célula-sensor ( $E$ ):

$$\begin{aligned} E_S(s) &= \left( 1 - \frac{2K(s)G_C(s)G_{2P}(s)}{1 + 2G_{2P,0}(s)K(s)G_C(s)} \right) W_S(s) \\ E_E(s) &= \left( 1 - \frac{2K(s)G_C(s)G_{2P,0}(s)}{1 + 2G_{2P,0}(s)K(s)G_C(s)} \right) W_E(s) \end{aligned} \quad (5.44)$$

Claramente se observa que, dado un régimen de operación del dispositivo (es decir, fijada la función de transferencia) la señal de error depende únicamente de la señal de entrada, ya que la señal de retroalimentación depende directamente de dicha entrada. Se define el error en estado estacionario:

$$e(+\infty) = \lim_{t \rightarrow +\infty} [e(t)] = \lim_{s \rightarrow 0} [sE(s)] \quad (5.45)$$

En el proceso de análisis de un sistema se emplean tres señales de error estándar: error de posición, error de velocidad y error de aceleración. Corresponden a la señal de error cuando la señal de entrada es una función paso, una función rampa y una función parabólica:

$$\begin{aligned} W(s) = \frac{1}{s} &\Rightarrow E_P(s) \Rightarrow e_P(+\infty) \\ W(s) = \frac{1}{s^2} &\Rightarrow E_V(s) \Rightarrow e_V(+\infty) \\ W(s) = \frac{1}{s^3} &\Rightarrow E_A(s) \Rightarrow e_A(+\infty) \end{aligned} \quad (5.46)$$

---

y nos informan de la capacidad que posee el sistema para compensar en estado estacionario perturbaciones constantes, crecientes linealmente y crecientes cuadráticamente en el tiempo. Por ejemplo, si el error de posición en estado estacionario es nulo, significa que transcurrido un intervalo de tiempo suficientemente grande desde la aplicación de una entrada constante la respuesta del sistema se anula, eliminándose tal perturbación. Asociada a cada error estacionario se define una constante de error del siguiente modo:

$$\begin{aligned}
 e_p(+\infty) &= \frac{1}{1 + K_{EP}} \\
 e_v(+\infty) &= \frac{1}{K_{EV}} \\
 e_A(+\infty) &= \frac{1}{K_{EA}}
 \end{aligned}
 \tag{5.47}$$

y se denominan constantes de error de posición, de velocidad y de aceleración, respectivamente.

El interés del comportamiento de la señal de error descansa en que el voltaje de medida en el microcalorímetro debe ser proporcional a la potencia térmica disipada instantáneamente, de modo que, si se aplica una potencia constante, dicho voltaje debe alcanzar un valor estacionario constante no nulo (ecs. (5.12) y (5.30)). Es decir, la señal de voltaje de medida debe exhibir un error de posición en estado estacionario no nulo y proporcional a la potencia constante de entrada. Como veremos más tarde en el siguiente Capítulo, este será un criterio a la hora de decidir qué señales son útiles como señales de medida en el dispositivo microcalorimétrico.

El valor de los errores de posición, velocidad y aceleración en estado estacionario está directamente relacionado con el hecho de que la función de transferencia en lazo abierto contenga polos en el origen. El número de polos en  $s=0$  sirve como criterio de clasificación de sistemas continuos. Si la función de transferencia en lazo abierto se puede escribir como:

$$2G_{2P,0}(s)K(s)G_C(s) = K' \frac{P_1(s)}{s^l P_2(s)} = K' P(s) s^{-l} \quad (5.48)$$

es decir, posee  $l$  polos en el origen, se dice que el sistema es de *tipo  $l$* . Y se puede demostrar fácilmente que se verifican los resultados expresados en la *Tabla 5.1* (Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996).

*Tabla 5.1.* Errores en estado estacionario y constantes de error para un sistema continuo de tipo  $l$ .

| $l$ | $e_P(+\infty)$ | $K_{EP}$ | $e_P(+\infty)$ | $K_{EV}$ | $e_P(+\infty)$ | $K_{EA}$ |
|-----|----------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|
| 0   | $1/(1+K_{EP})$ | $K'P(0)$ | $\infty$       | 0        | $\infty$       | 0        |
| 1   | 0              | $\infty$ | $1/K_{EV}$     | $K'P(0)$ | $\infty$       | 0        |
| 2   | 0              | $\infty$ | 0              | $\infty$ | $1/K_{EA}$     | $K'P(0)$ |

De forma análoga, en un sistema discreto también podemos considerar la señal de error,  $e(kT)$  o  $E(z)$ , definida como la diferencia entre la señal de entrada y la señal de retroalimentación. En el dominio de la frecuencia esta señal de error se expresa:

$$E(s) = W(s) - 2K(s)G_{ZOH}(s)\Delta V_C^*(s) \quad (5.49)$$

donde el asterisco indica que se trata de una señal muestreada. Utilizando las ecs. (4.48) y (4.49) se obtienen las expresiones de la señal de error en el caso de un efecto térmico generado en la muestra ( $S$ ) y en el conjunto célula-sensor ( $E$ ):

$$E_S(z) = W_S(z) - \frac{2[KG_{ZOH}](z)G_C(z)[G_{2P}W_S](z)}{1 + 2[G_{2P,0}KG_{ZOH}](z)G_C(z)} \quad (5.50)$$

$$E_E(z) = W_E(z) - \frac{2[KG_{ZOH}](z)G_C(z)[G_{2P,0}W_E](z)}{1 + 2[G_{2P,0}KG_{ZOH}](z)G_C(z)}$$

Nuevamente se observa que, dado un régimen de operación del dispositivo (es decir, fijadas las funciones de transferencia de los elementos integrantes del sistema) la señal de error depende únicamente de la señal de entrada, ya que la señal de retroalimentación depende directamente de dicha entrada. Se define el error en estado

---

estacionario:

$$e(+\infty) = \lim_{k \rightarrow +\infty} [e(kT)] = \lim_{z \rightarrow 1} [(1 - z^{-1})E(z)] \quad (5.51)$$

En el proceso de análisis de un sistema discreto se emplean tres señales de error estándar: error de posición, error de velocidad y error de aceleración. Corresponden a la señal de error cuando la señal de entrada es una función paso, una función rampa y una función parabólica:

$$\begin{aligned} W(z) = \frac{z}{z-1} &\Rightarrow E_P(z) \Rightarrow e_P(+\infty) \\ W(z) = \frac{Tz}{(z-1)^2} &\Rightarrow E_V(z) \Rightarrow e_V(+\infty) \\ W(z) = \frac{T^2 z(z+1)}{(z-1)^3} &\Rightarrow E_A(z) \Rightarrow e_A(+\infty) \end{aligned} \quad (5.52)$$

y también nos informan de la capacidad que posee el sistema para compensar en estado estacionario perturbaciones constantes, crecientes linealmente y crecientes cuadráticamente en el tiempo. Asociada a cada error estacionario se define una constante de error del siguiente modo:

$$\begin{aligned} e_P(+\infty) &= \frac{1}{1 + K_{EP}} \\ e_V(+\infty) &= \frac{1}{K_{EV}} \\ e_A(+\infty) &= \frac{1}{K_{EA}} \end{aligned} \quad (5.53)$$

y se denominan constantes de error de posición, de velocidad y de aceleración, respectivamente. Las mismas consideraciones que se discutieron anteriormente para un sistema continuo son válidas ahora para el sistema discreto.

El valor de los errores de posición, velocidad y aceleración en estado estacionario

está directamente relacionado con el hecho de que la función de transferencia en lazo abierto contenga polos iguales a la unidad. El número de polos en  $z=1$  sirve como criterio de clasificación de sistemas discretos. Si la función de transferencia en lazo abierto se puede escribir como:

$$2[G_{2P,0}KG_{ZOH}](z)G_c(z) = K' \frac{P_1(z)}{(z-1)^l P_2(z)} = K'P(z)(z-1)^{-l} \quad (5.54)$$

es decir, posee  $l$  polos en  $z=1$ , se dice que el sistema es de *tipo  $l$* . Se pueden demostrar fácilmente los resultados indicados en la *Tabla 5.2* (Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996).

*Tabla 5.2.* Errores en estado estacionario y constantes de error para un sistema discreto de tipo  $l$ .

| $l$ | $e_P(+\infty)$ | $K_{EP}$ | $e_P(+\infty)$ | $K_{EV}$ | $e_P(+\infty)$ | $K_{EA}$ |
|-----|----------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|
| 0   | $1/(1+K_{EP})$ | $K'P(1)$ | $\infty$       | 0        | $\infty$       | 0        |
| 1   | 0              | $\infty$ | $1/K_{EV}$     | $K'P(1)$ | $\infty$       | 0        |
| 2   | 0              | $\infty$ | 0              | $\infty$ | $1/K_{EA}$     | $K'P(1)$ |

#### 5.4. Controlabilidad y observabilidad.

Dos conceptos fundamentales en Teoría de Sistemas de Control son los de *controlabilidad* y *observabilidad* (Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996). Supongamos que describimos un sistema lineal autónomo mediante el formalismo de las variables de estado y las ecuaciones dinámicas:

$$\begin{aligned} \dot{x}(t) &= Ax(t) + Bu(t) & y(t) &= Cx(t) + Du(t) \\ x((k+1)T) &= Ax(kT) + Bu(kT) & y(kT) &= Cx(kT) + Du(kT) \end{aligned} \quad (5.55)$$

donde  $y(t)$  es el vector de variables de salida (susceptibles de ser medidas) y  $x(t)$  es el

---

vector de estado, es decir, el conjunto mínimo de variables  $x_i(t)$  tales que conocidas en un tiempo  $t_0$  y conocida la entrada  $u(t)$  que se aplica, podemos determinar el estado del sistema en cualquier instante posterior  $t > t_0$ .

Surgen dos cuestiones muy importantes acerca del comportamiento del sistema:

- ¿Es posible físicamente encontrar una entrada  $u(t)$  tal que aplicada durante un tiempo finito provoque que el sistema evolucione hacia un estado final  $x$  cualquiera? En otras palabras, ¿podemos hacer que el sistema se comporte de cualquier forma preestablecida?
- ¿Es posible determinar todas las componentes de  $x$  mediante la medida de  $y$  durante un tiempo finito? Es decir, ¿podemos conocer completamente el estado del sistema?

Una respuesta afirmativa a estas dos preguntas es crucial en cuanto a los propósitos generales de un sistema controlado. Si se responde negativamente a la primera pregunta, no podremos guiarlo para que opere de forma adecuada a las especificaciones de diseño. Y si es respecto a la segunda, no podremos adquirir suficiente información para establecer una acción de control apropiada para conseguir un determinado comportamiento.

Para establecer de una forma más precisa estas dos ideas se definen:

### Controlabilidad

El estado  $x(t_0)$  es controlable si existe una entrada continua a trozos  $u(t)$  que conduce el estado hasta cualquier estado final  $x(t_f)$  en un tiempo finito  $t_f - t_0 \geq 0$ .

Si cada estado  $x(t_0)$  es controlable en tiempo finito, el sistema es completamente controlable o, simplemente, controlable.

### Observabilidad

El estado  $x(t_0)$  es observable si dada cualquier entrada  $u(t)$  existe un tiempo finito  $t_f - t_0 \geq 0$  tal que el conocimiento de  $u(t)$  y de las ecuaciones dinámicas para  $t_0 \leq t \leq t_f$  es

suficiente para determinar  $x(t_0)$ .

Si cada estado  $x(t_0)$  es observable en tiempo finito, el sistema completamente observable o, simplemente observable.

Se puede demostrar que si la función de transferencia de un sistema lineal presenta cancelación de polos y ceros, dicho sistema será no controlable o no observable, dependiendo de como se definan las variables de estado. Por el contrario, si no presenta cancelación de polos y ceros, siempre se puede representar mediante ecuaciones dinámicas como un sistema totalmente controlable y observable.

## 6. TIPOS DE CONTROL PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PRINCIPIO DE MEDIDA POR COMPENSACIÓN DEL EFECTO TÉRMICO.

A partir de los modelos desarrollados en el Capítulo 4 y empleando los métodos y herramientas descritos en el Capítulo 5 y en los Apéndices (Criterio de Routh-Hurwitz, Criterio de Jury y Lugar de las Raíces), vamos a estudiar el comportamiento del microcalorímetro bajo distintos tipos de control para la compensación del efecto térmico. Aunque el dispositivo no controlado (sin compensación) es un caso particular en el cual los parámetros de control son todos nulos, conviene analizar dicho caso para identificar las modificaciones y ventajas introducidas a través de los distintos controles.

### 6.1. Sistemas de control continuos.

En cada caso se va a considerar en primer lugar que el efecto térmico es generado por la muestra. Luego, será interesante estudiar la situación correspondiente a un efecto producido en el conjunto sensor-célula, para contrastar las diferencias que puedan surgir.

Todo el desarrollo se planteará basándose en la señal de voltaje no compensado,  $\Delta V_{NC}(s)$ , que es la señal que se mide. Sin embargo, se puede hacer uso de la señal compensada,  $\Delta V_C(s)$ , sin más que tener en cuenta la relación siguiente:

$$\Delta V_C(s) = G_C(s)\Delta V_{NC}(s) \quad (6.1)$$

#### 6.1.1. Control nulo.

---

6.1.1.a. Efecto térmico generado por la muestra bajo control nulo.

En este primer tipo, que corresponde a un sistema no controlado o no retroalimentado, la función de transferencia del elemento controlador,  $G_C(s)$ , es nula y se verifican las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned}\Delta V_C(t) &= 0 \\ \Delta V_C(s) &= 0 \\ g_C(t) &= 0 \\ G_C(s) &= 0\end{aligned}\tag{6.2}$$

La función de transferencia en lazo cerrado coincide con la función de transferencia directa, ya que un sistema de control nulo equivale a eliminar la trayectoria de retroalimentación. Al ser un sistema cuya función de transferencia en lazo abierto es nula, se puede considerar como un sistema de *tipo 0*. La función de transferencia del microcalorímetro es (ec. (4.18)):

$$G_S(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2)}\tag{6.3}$$

A partir de la ec. (6.3) calculamos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro no controlado, en el dominio de la frecuencia y el dominio del tiempo, respectivamente:

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^\delta(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2)} Q \\ \Delta V_{NC}^\delta(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q \frac{1}{\tau_1 - \tau_2} \left( e^{-t/\tau_1} - e^{-t/\tau_2} \right)\end{aligned}\tag{6.4}$$

$$\Delta V_{NC}^{\chi}(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2)} W_0 \frac{1}{s}$$

$$\Delta V_{NC}^{\chi}(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( 1 - \frac{\tau_1}{\tau_1 - \tau_2} e^{-t/\tau_1} + \frac{\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} e^{-t/\tau_2} \right) \quad (6.5)$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2)} W_0 \frac{1 - e^{-s\Delta}}{s}$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( \left( 1 - \frac{\tau_1}{\tau_1 - \tau_2} e^{-t/\tau_1} + \frac{\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} e^{-t/\tau_2} \right) \right. \\ \left. - \left( 1 - \frac{\tau_1}{\tau_1 - \tau_2} e^{-(t-\Delta)/\tau_1} + \frac{\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} e^{-(t-\Delta)/\tau_2} \right) \chi(t - \Delta) \right) \quad (6.6)$$

que son las respuestas básicas. Si queremos hallar la respuesta a cualquier otra entrada, el procedimiento que hay que seguir es el explicado en el Capítulo 5: evaluar la Transformada

inversa de Laplace del producto de la función de transferencia y la entrada en el dominio de la frecuencia.

La ecuación característica del sistema es el denominador de la función de transferencia:

$$(s + p_1)(s + p_2) = 0 \quad (6.7)$$

siendo los polos,  $-p_1$  y  $-p_2$ , reales y negativos, por lo que están localizados en el semiplano izquierdo del plano  $s$  (ec. (4.11)). Por tanto, el sistema es estable (véase el Apéndice A1). Como no hay ningún parámetro arbitrario en la ecuación característica no se aplicarán los métodos de análisis de estabilidad presentados en los Apéndices.

Si se calculan los errores en estado estacionario del sistema (ecs. (5.44) y (5.46)), se obtiene el siguiente resultado:

---


$$\begin{aligned}
e_p(+\infty) &= 1 \\
e_v(+\infty) &= +\infty \\
e_A(+\infty) &= +\infty
\end{aligned}
\tag{6.8}$$

lo que confirma que el dispositivo microcalorimétrico es un sistema de *tipo 0* y presenta un error estacionario finito y constante cuando la entrada es una señal de potencia constante. Justamente este hecho es el que permite asignar a cada valor de voltaje no compensado, medido desde la línea base, un valor de potencia térmica correspondiente. Esta es una de las formas de realizar una calibración: señal de potencia de entrada constante (paso no unitario) y medida de la deflexión en estado estacionario de la línea base (respuesta paso no unitario).

Evaluando el área correspondiente a las respuestas impulso y pulso, así como el valor límite de la respuesta paso, se obtiene la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración del microcalorímetro (ecs. (5.8) y (5.13)):

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0} = \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}}
\tag{6.9}$$

Como en el microcalorímetro con control nulo únicamente se utiliza la señal no compensada, ya que la señal compensada es idénticamente nula, no deben considerarse las restantes constantes de calibración definidas mediante las ecs. (3.5). De igual modo, es obvio que la fracción de potencia no compensada es la unidad.

#### 6.1.1.b. Efecto térmico producido sobre el conjunto célula-sensor bajo control nulo.

Si ahora consideramos que el efecto térmico se genera en el conjunto célula-sensor las respuestas impulso, paso y pulso resultan ser:

$$\Delta V_{NC}^{\delta}(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q \frac{1}{\tau_1 - \tau_2} \left( \frac{\tau_1 - \tau_S}{\tau_1} e^{-t/\tau_1} - \frac{\tau_2 - \tau_S}{\tau_2} e^{-t/\tau_2} \right) \quad (6.10)$$

$$\Delta V_{NC}^{\chi}(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( 1 - \frac{\tau_1 - \tau_S}{\tau_1 - \tau_2} e^{-t/\tau_1} + \frac{\tau_2 - \tau_S}{\tau_1 - \tau_2} e^{-t/\tau_2} \right) \quad (6.11)$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( \left( 1 - \frac{\tau_1 - \tau_S}{\tau_1 - \tau_2} e^{-t/\tau_1} + \frac{\tau_2 - \tau_S}{\tau_1 - \tau_2} e^{-t/\tau_2} \right) - \left( 1 - \frac{\tau_1 - \tau_S}{\tau_1 - \tau_2} e^{-(t-\Delta)/\tau_1} + \frac{\tau_2 - \tau_S}{\tau_1 - \tau_2} e^{-(t-\Delta)/\tau_2} \right) \chi(t - \Delta) \right) \quad (6.12)$$

Estas ecuaciones son análogas a las ecs. (6.4)-(6.6), apareciendo la constante de tiempo  $\tau_S$  en los coeficientes de los términos exponenciales. Aunque formalmente la diferencia es pequeña, representa un cambio muy importante en las características dinámicas del sistema (respuesta transitoria). Teniendo en cuenta la relación existente entre las constantes de tiempo (ec. (4.12)), se comprueba que la respuesta impulso consiste en una diferencia de exponenciales decrecientes en el tiempo cuando el efecto térmico procede de la muestra y en una suma de exponenciales decrecientes cuando el efecto térmico se genera en el conjunto sensor-célula (véase la *Figura 6.1.A*).

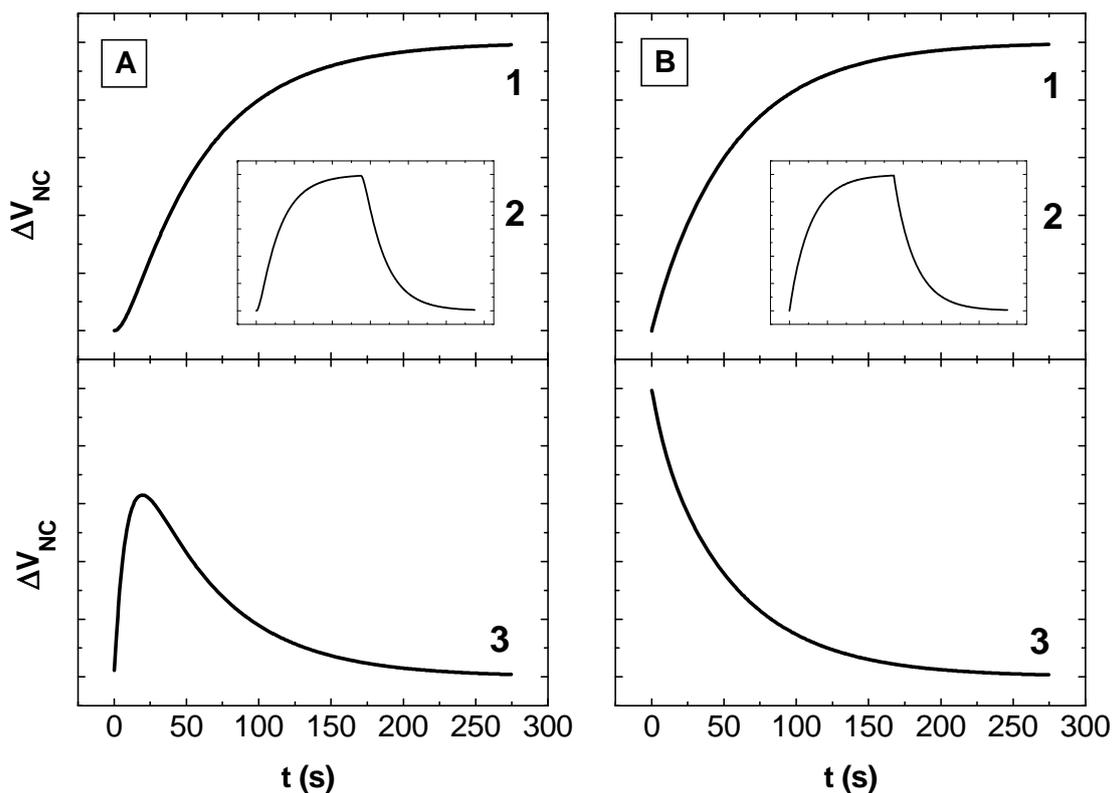


Figura 6.1. Respuestas del microcalorímetro frente a efectos térmicos generados en la muestra (A) y en el elemento sensor-célula (B).

(1) respuesta paso, (2) respuesta pulso, (3) respuesta impulso

Esto provoca que el segundo caso se asemeje a la respuesta impulso de un sistema de primer orden, que es una única exponencial decreciente. Como consecuencia directa, aunque las constantes de tiempo son las mismas en los dos casos, para el efecto generado en la muestra y en el conjunto sensor-célula, el decaimiento hacia la línea base es más rápido en esta última situación. La presencia del cero en la función de transferencia modifica sensiblemente la dinámica del sistema. Así, aun siendo un sistema de segundo orden, se comporta de forma muy parecida a un sistema de primer orden. De un detallado análisis de las respuestas del sistema (ecs. (6.4)-(6.6) y (6.10)-(6.12)) se observa que:

- Cuando el efecto térmico se genera en la muestra la respuesta impulso presenta un valor nulo en el instante inicial, un valor máximo en un tiempo intermedio y un punto de inflexión. La respuesta paso posee pendiente inicial nula y existe punto de inflexión. Es el comportamiento típico de un sistema de 2º orden o

superior.

- Cuando el efecto térmico se genera en el elemento sensor-célula la respuesta impulso presenta un valor no nulo en el instante inicial, un valor máximo en el instante inicial y no aparece punto de inflexión. La respuesta paso posee pendiente inicial no nula y no existe punto de inflexión, por lo que asciende más rápidamente hacia el valor límite estacionario. Es el comportamiento típico de un sistema de primer orden.

Por otra parte, las características estáticas (ganancia en estado estacionario, constantes de calibración, errores en estado estacionario) son iguales en ambas situaciones. De este modo, se demuestra por qué las constantes de tiempo son independientes del tipo de experimento, eléctrico o químico, pero el comportamiento transitorio del microcalorímetro es distinto según el tipo de experimento.

### 6.1.2. Control proporcional.

#### 6.1.2.a. Efecto térmico generado por la muestra bajo control proporcional.

La función de transferencia del elemento controlador,  $G_C(s)$ , es una constante,  $K_P$ , que es la constante de proporcionalidad del control proporcional:

$$\begin{aligned}\Delta V_C(t) &= K_P \Delta V_{NC}(t) \\ \Delta V_C(s) &= K_P \Delta V_{NC}(s) \\ g_C(t) &= K_P \delta(t) \\ G_C(s) &= K_P\end{aligned}\tag{6.13}$$

y está claro que  $K_P$  es un parámetro de control ajustable cuyo valor determinará la eficacia del sistema de compensación. Si  $K_P=0$ , coincide con el control nulo.

La función de transferencia en lazo cerrado del sistema bajo este tipo de control es (ec. (4.24)):

$$G_S(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2) + bK_p(s + z_1)} = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_-)(s + p_+)} \quad (6.14)$$

donde  $-p_+$  y  $-p_-$  son los polos de la función de transferencia del sistema retroalimentado y se pueden expresar en función de los polos del sistema no retroalimentado:

$$p_{\pm} = \frac{(p_1 + p_2 + bK_p) \pm \sqrt{(p_1 + p_2 + bK_p)^2 - 4(p_1 p_2 + bK_p z_1)}}{2} \quad (6.15)$$

observándose claramente en esta ecuación la dependencia de los polos del sistema retroalimentado respecto del parámetro de control  $K_p$ , es decir, se podrá conocer cómo el control proporcional modifica las constantes de tiempo del microcalorímetro. Las nuevas constantes de tiempo del sistema retroalimentado se definen como sigue:

$$\tau_- = \frac{1}{p_-} \quad \tau_+ = \frac{1}{p_+} \quad (6.16)$$

La función de transferencia en lazo abierto,  $2K(s)G_C(s)G_{2P,0}(s)$  posee un cero,  $-z_1$ , y dos polos,  $-p_1$  y  $-p_2$ . No posee polos en  $s=0$ , por lo que el sistema es de *tipo 0*. En este punto, el sistema bajo control proporcional coincide con el sistema no controlado, aunque veremos que, si bien el error en estado estacionario es no nulo en ambos casos, en el sistema controlado será menor.

A partir de la ec. (6.14) calculamos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro bajo control proporcional:

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^{\delta}(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s+p_-)(s+p_+)} Q \\ \Delta V_{NC}^{\delta}(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+aK_P} Q \frac{1}{\tau_- - \tau_+} \left( e^{-t/\tau_-} - e^{-t/\tau_+} \right)\end{aligned}\quad (6.17)$$

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^{\chi}(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s+p_-)(s+p_+)} W_0 \frac{1}{s} \\ \Delta V_{NC}^{\chi}(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+aK_P} W_0 \left( 1 - \frac{\tau_-}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_-} + \frac{\tau_+}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_+} \right)\end{aligned}\quad (6.18)$$

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^{\Delta}(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s+p_-)(s+p_+)} W_0 \frac{1-e^{-s\Delta}}{s} \\ \Delta V_{NC}^{\Delta}(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+aK_P} W_0 \left( \left( 1 - \frac{\tau_-}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_-} + \frac{\tau_+}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_+} \right) \right. \\ &\quad \left. - \left( 1 - \frac{\tau_-}{\tau_- - \tau_+} e^{-(t-\Delta)/\tau_-} + \frac{\tau_+}{\tau_- - \tau_+} e^{-(t-\Delta)/\tau_+} \right) \chi(t-\Delta) \right)\end{aligned}\quad (6.19)$$

y son formalmente idénticas a las respuestas del sistema no controlado (ecs. (6.4)-(6.6)). Tan sólo hay cambios debidos a la aparición de las nuevas constantes de tiempo y de un factor en la ganancia en estado estacionario,  $(1+aK_P)^{-1}$ , que depende del parámetro de control.

La ecuación característica del sistema es:

$$(s+p_1)(s+p_2) + bK_P(s+z_1) = (s+p_-)(s+p_+) = 0 \quad (6.20)$$

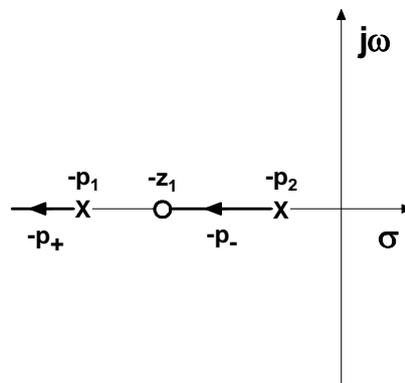
y como hay un parámetro arbitrario,  $K_P$ , se hará uso de los métodos de análisis de estabilidad de sistemas continuos. Aplicando el Criterio de Routh-Hurwitz, aparecen las siguientes condiciones de estabilidad:

$$K_p > -\frac{1}{a} \left( 1 + \frac{\tau_{SC}}{\tau_s} + \frac{\alpha_s}{\alpha_{SC}} \right) = -\frac{1}{a} \left( 1 + \frac{\tau_{SC}}{\tau_s} \left( 1 + \frac{C_s}{C_{SC}} \right) \right) \quad (6.21)$$

$$K_p > -\frac{1}{a}$$

siendo la segunda desigualdad la condición determinante, ya que es la más restrictiva. Se demuestra que el sistema es estable para  $K_p > 0$ . Además, el microcalorímetro admite retroalimentación positiva ( $K_p < 0$ ), es decir, que, por ejemplo, el sistema de compensación aporte calor si el efecto térmico generado es exotérmico, siempre que no se violen las condiciones dadas por las ecs. (6.21). La segunda desigualdad incluida en la ec. (6.21) indica que la ganancia en estado estacionario debe tener un valor finito y positivo.

Aplicando la técnica de análisis del Lugar de las Raíces a la ecuación característica (ec. 6.20) podemos estudiar la influencia del parámetro de control  $K_p$  sobre el comportamiento del microcalorímetro; en concreto, este método nos informa acerca de la evolución de la localización de los polos en el plano  $s$  conforme  $K_p$  varía continuamente, lo que determina la estabilidad y el comportamiento transitorio del sistema. Aunque esto se puede llevar a cabo a través de la resolución directa de la ecuación característica (ec. (6.15)), es mucho más sencillo y metódico hacerlo según esta técnica. En la *Figura 6.2* se ilustra el diagrama del Lugar de las Raíces del microcalorímetro bajo control proporcional, cuando  $K_p$  varía de forma continua entre  $0$  y  $+\infty$ :



*Figura 6.2.* Diagrama del Lugar de las Raíces ( $K_p \geq 0$ ) con control proporcional.

donde la localización de los polos y los ceros se representa mediante los símbolos  $\times$  y  $\circ$ ,

respectivamente. Como se observa, cuando  $K_P=0$  los polos del sistema retroalimentado coinciden con los polos de la función de transferencia en lazo abierto ( $-p_1$  y  $-p_2$ ) y cuando  $K_P=+\infty$  los polos del sistema retroalimentado son los ceros de la función de transferencia en lazo abierto ( $-z_1$  y  $-\infty$ ). De este diagrama se obtienen los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}
 & \text{Im}[p_{\pm}] = 0 \quad \text{Re}[p_{\pm}] > 0 \\
 & 0 < p_1 \leq p_- < z_1 < p_2 \leq p_+ \Rightarrow \tau_1 \geq \tau_- > \tau_s > \tau_2 \geq \tau_+ > 0 \\
 & K_P = 0 \Rightarrow \begin{cases} p_- = p_1 \\ p_+ = p_2 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tau_- = \tau_1 \\ \tau_+ = \tau_2 \end{cases} \quad (6.22) \\
 & K_P \rightarrow +\infty \Rightarrow \begin{cases} p_- \rightarrow z_1 \\ p_+ \rightarrow \infty \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tau_- \rightarrow \tau_s \\ \tau_+ \rightarrow 0 \end{cases}
 \end{aligned}$$

que tienen una fácil interpretación:

- Los polos,  $-p_-$  y  $-p_+$ , son siempre reales, negativos y distintos, por lo que el sistema siempre es estable para  $K_P \geq 0$  (esto ya se encontró mediante el Criterio de Hurwitz) y no presenta en ningún momento comportamiento oscilatorio. En la práctica el microcalorímetro exhibe un comportamiento oscilatorio y después inestable para valores positivos grandes de  $K_P$ . Todo esto sólo se podrá justificar a partir del modelo discreto del dispositivo.
- Las constantes de tiempo,  $\tau_-$  y  $\tau_+$ , son funciones decrecientes del parámetro de control  $K_P$ , siendo siempre menores o iguales que  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , respectivamente.
- Para un valor suficientemente grande de  $K_P$ , el polo  $-p_+$  es despreciable y sólo es preciso tener en cuenta el polo  $-p_-$ , comportándose el sistema como si tuviera una única constante de tiempo prácticamente igual a  $\tau_s$ . De este modo, con una elevada eficiencia de compensación es posible eliminar la inercia térmica del conjunto sensor-célula.

En la *Figura 6.3* se representa el diagrama del Lugar de las Raíces Complementario del microcalorímetro bajo control proporcional, cuando el parámetro de control  $K_P$  varía de

forma continua entre 0 y  $-\infty$ :

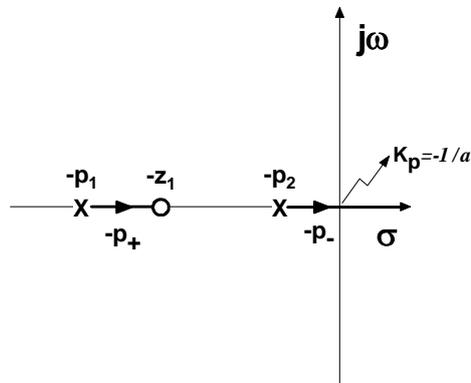


Figura 6.3. Diagrama del Lugar de las Raíces Complementario ( $K_P \leq 0$ ) del microcalorímetro bajo control proporcional.

deduciéndose los resultados que se resumen de la siguiente forma:

$$\begin{aligned}
 \text{Im}[p_{\pm}] &= 0 \\
 0 < p_- \leq p_1 < z_1 < p_+ \leq p_2 &\Rightarrow \tau_- \geq \tau_1 > \tau_s > \tau_+ \geq \tau_2 > 0 \\
 K_P = 0 &\Rightarrow \begin{cases} p_- = p_1 \\ p_+ = p_2 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tau_- = \tau_1 \\ \tau_+ = \tau_2 \end{cases} \\
 K_P \rightarrow -\frac{1}{a} &\Rightarrow \begin{cases} p_- \rightarrow 0 \\ p_+ \rightarrow z_1 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tau_- \rightarrow +\infty \\ \tau_+ \rightarrow \tau_s \end{cases}
 \end{aligned} \tag{6.23}$$

no teniendo sentido continuar hacia valores de  $K_P$  menores que  $-1/a$ , ya que el sistema se vuelve inestable. Estos resultados se interpretan del siguiente modo:

- Los polos,  $-p_-$  y  $-p_+$ , son siempre reales, negativos y distintos mientras  $K_P$  tiene valores entre 0 y  $-1/a$ , por lo que el sistema es estable (esto ya se encontró mediante el Criterio de Hurwitz) y no presenta en ningún momento comportamiento oscilatorio.
- Las constantes de tiempo,  $\tau_-$  y  $\tau_+$ , son funciones crecientes del parámetro de control  $K_P$ , siendo siempre mayores o iguales que  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , respectivamente. En

este caso, el sistema de compensación añade inercia térmica al dispositivo microcalorimétrico.

- Para  $K_P = -1/a$  (límite de estabilidad), la constante  $\tau_+$  es igual a  $\tau_S$  y la constante  $\tau_-$  se hace infinita.

Los errores en estado estacionario del sistema son (ecs. (5.44) y (5.46)):

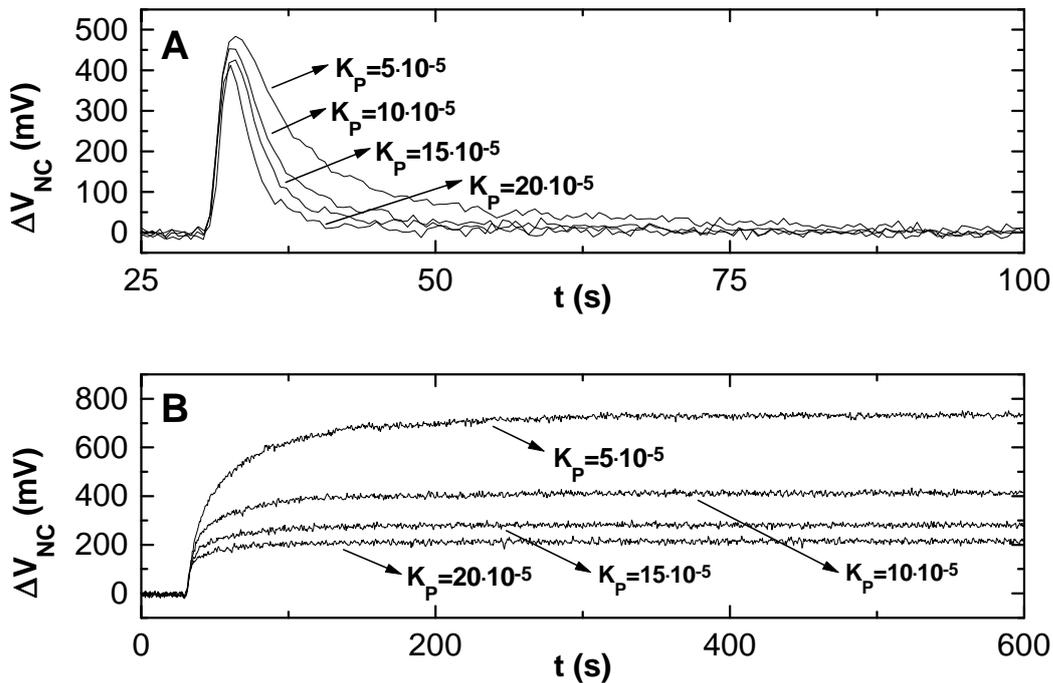
$$\begin{aligned} e_P(+\infty) &= \frac{1}{1 + aK_P} \\ e_V(+\infty) &= +\infty \\ e_A(+\infty) &= +\infty \end{aligned} \tag{6.24}$$

lo que confirma que el dispositivo microcalorimétrico es un sistema de *tipo 0* y presenta un error estacionario finito y constante cuando la entrada es una señal de potencia constante. Como el error de posición es finito, se puede asignar a cada valor de voltaje no compensado, medido desde la línea base, un valor de potencia térmica correspondiente. Esta es una de las formas de realizar una calibración: señal de potencia de entrada constante (paso no unitario) y medida de la deflexión en estado estacionario de la señal calorimétrica respecto a la línea base (respuesta paso no unitario). Sin embargo, el error de posición está modulado por el parámetro de control, de forma que para valores suficientemente grandes de  $K_P$  dicho error es muy pequeño. De aquí se deduce que no interesa utilizar valores demasiado grandes de la constante  $K_P$ , porque bajo esas condiciones el microcalorímetro produciría una señal muy pobre (la señal de voltaje presenta deflexiones muy pequeñas respecto de la línea base) y una relación señal-ruido baja.

Evaluando el área correspondiente a las respuestas impulso y pulso, así como el valor límite de la respuesta paso, se obtiene la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración del microcalorímetro (ecs. (5.8) y (5.13)):

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0} = \frac{1 + aK_P}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \quad (6.25)$$

donde se observa que la constante de calibración depende linealmente del parámetro de control  $K_P$ . Si  $K_P=0$ , la constante de calibración coincide con la del sistema no controlado. Como la ganancia en estado estacionario es decreciente y la constante de calibración es creciente respecto de  $K_P$ , se confirma el resultado obtenido con los errores en estado estacionario: conforme  $K_P$  aumenta, la señal es menor, por lo que no es adecuado emplear valores de  $K_P$  muy elevados. En la *Figura 6.4* se muestra el efecto de  $K_P$  sobre la respuesta del microcalorímetro frente a una entrada pulso (A) y una entrada de potencia constante (B): constantes de tiempo menores (pulsos más estrechos) y ganancia en estado estacionario menor (áreas de pulsos más pequeñas y valores en estado estacionario menores), conforme  $K_P$  aumenta.



*Figura 6.4.* Respuestas pulso (A) y respuestas paso (B) del microcalorímetro bajo control proporcional.

Si tenemos en cuenta la ec. característica (ec. (6.20)) y la expresión de  $K_{CAL}$  (ec. (6.25)) es fácil demostrar que:

$$\tau_- \tau_+ K_{CAL} = \tau_1 \tau_2 K_{CAL} \Big|_{K_P=0} = \tau_S \tau_{SC} K_{NC} = cte \quad (6.26)$$

donde se expresa que el producto de las constantes de tiempo y la constante de calibración para la señal no compensada, para un régimen de compensación dado, mantiene un valor constante e independiente del valor de  $K_P$ . Así, las constantes de tiempo y la constante de calibración están relacionadas a través de una proporcionalidad inversa.

De todo esto se concluye que el control proporcional modifica la función de transferencia global del sistema reduciendo las constantes de tiempo, mejorando el funcionamiento del microcalorímetro. Sin embargo, aparece un efecto no deseado: si  $K_P$  aumenta, se reduce la ganancia en estado estacionario y, consecuentemente, los valores límite de las respuestas paso y las áreas de pulsos en el termograma disminuyen (véase la *Figura 6.4*). Por tanto, hay que llegar a un compromiso entre esos dos efectos para establecer empíricamente un valor de  $K_P$  óptimo.

En el microcalorímetro con control proporcional también interviene la señal compensada, por lo que podemos calcular las diferentes constantes de calibración definidas en el Capítulo 3 (ec. (3.5) y (3.6)):

$$\begin{aligned} K_{CAL}^C &= \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \frac{1+aK_P}{K_P} \\ K_{NC} &= \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \\ K_C &= 2 \frac{\pi}{R} \end{aligned} \quad (6.27)$$

de donde se obtienen las siguientes conclusiones:  $K_{NC}$  es en realidad la constante de calibración del sistema no controlado,  $K_C$  es constante y  $K_{CAL}^C$  no crece linealmente, sino que es decreciente hasta alcanzar un valor límite, igual a  $K_C$ , conforme  $K_P$  aumenta. Se observa que el parámetro adimensional  $a$  es igual al cociente  $K_C/K_{NC}$  entre constantes de

---

calibración. Asimismo, se pueden evaluar las fracciones de potencia compensada y no compensada:

$$\eta_{NC} = \frac{1}{1 + aK_p} \quad \eta_{NC} = \frac{aK_p}{1 + aK_p} \quad (6.28)$$

siendo la primera decreciente y la segunda creciente. Se observa que  $\eta_{NC}$  coincide con el error de posición en estado estacionario.

La interpretación de estos resultados es la siguiente: si suponemos un determinado efecto térmico acompañado de la generación de un calor total  $Q$ , la efectividad de la compensación aumenta paralelamente al valor de  $K_p$ , disminuyendo la señal no compensada (potencia no compensada) y la fracción no compensada, al contrario que la señal compensada (potencia compensada) y la fracción compensada. Por esta razón,  $K_{CAL}$  debe ser creciente y  $K_{CAL}^C$  debe ser decreciente. Para un valor muy elevado de  $K_p$  ( $K_p \rightarrow +\infty$ ), prácticamente toda la potencia es evacuada por el sistema de compensación, siendo nula la potencia no compensada. Es en este momento cuando  $K_{CAL}^C$  toma su valor límite mínimo.

#### 6.1.2.b. Efecto térmico producido sobre el conjunto célula-sensor bajo control proporcional.

Si ahora consideramos que el efecto térmico se genera en el conjunto célula-sensor, todos los resultados son básicamente los mismos. Nuevamente, aparece una ligera variación en las respuestas impulso, paso y pulso, debida a la presencia de un cero en la función de transferencia:

$$\Delta V_{NC}^{\delta}(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1 + aK_p} Q \frac{1}{\tau_- - \tau_+} \left( \frac{\tau_- - \tau_S}{\tau_-} e^{-t/\tau_-} - \frac{\tau_+ - \tau_S}{\tau_+} e^{-t/\tau_+} \right) \quad (6.29)$$

$$\Delta V_{NC}^{\chi}(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1 + aK_P} W_0 \left( 1 - \frac{\tau_- - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_-} + \frac{\tau_+ - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_+} \right) \quad (6.30)$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1 + aK_P} W_0 \left( \left( 1 - \frac{\tau_- - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_-} + \frac{\tau_+ - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_+} \right) - \left( 1 - \frac{\tau_- - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-(t-\Delta)/\tau_-} + \frac{\tau_+ - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-(t-\Delta)/\tau_+} \right) \chi(t - \Delta) \right) \quad (6.31)$$

y la discusión realizada anteriormente sobre el comportamiento transitorio del sistema no controlado en función de la localización de la fuente del efecto térmico se puede aplicar íntegramente ahora, ya que las ecuaciones son formalmente idénticas. El significado físico del cero es el mismo que en el sistema no controlado: está asociado con la constante de tiempo  $\tau_S$ .

### 6.1.2.c. Influencia de la posición de los actuadores de compensación sobre el comportamiento del microcalorímetro.

Sería muy interesante analizar las consecuencias derivadas del hecho de que la potencia térmica de compensación actúe directamente en la muestra (interior de la célula) y no sobre el conjunto sensor-célula, que es como realmente lo hace. En dicho supuesto, en el denominador de la función de transferencia en lazo cerrado, tanto para un efecto térmico generado en la muestra como generado en el conjunto sensor-célula (ecs. (4.24) y (4.25)), no aparecerá la función de transferencia  $G_{2P,0}(s)$ , sino  $G_{2P}(s)$ . Entonces, la función de transferencia en lazo abierto no tendrá ningún cero finito y no tendrá polos en  $s=0$ , por lo que el sistema seguirá siendo de *tipo 0*. La ecuación característica para la nueva configuración del sistema es:

$$(s + p_1)(s + p_2) + aK_P p_1 p_2 = (s + p_-)(s + p_+) = 0 \quad (6.32)$$

donde ahora los polos del sistema retroalimentado vienen dados por:

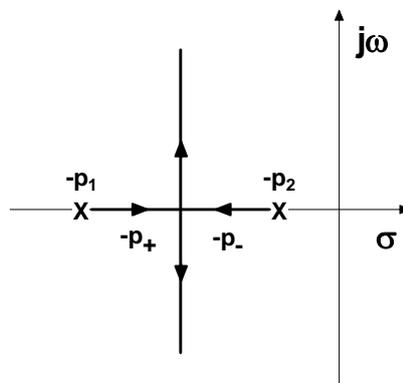
$$p_{\pm} = \frac{p_1 + p_2 \pm \sqrt{(p_1 + p_2)^2 - 4aK_p p_1 p_2}}{2} \quad (6.33)$$

y la función de transferencia en lazo abierto no posee ceros y contiene dos polos,  $-p_1$  y  $-p_2$ . Si aplicamos el Criterio de Routh-Hurwitz obtenemos las siguientes condiciones de estabilidad:

$$\begin{aligned} p_1 + p_2 > 0 & \quad p_1 p_2 > 0 \\ K_p > -\frac{1}{a} \end{aligned} \quad (6.34)$$

que nuevamente nos informan de que el sistema es estable para todo valor positivo de  $K_p$  y el límite de estabilidad ( $K_p = -1/a$ ) es el mismo que antes. Las dos primeras condiciones se satisfacen automáticamente, ya que el sistema no retroalimentado es estable.

Para investigar la evolución de los polos sobre el plano  $s$  se aplica la técnica del Lugar de las Raíces. En la *Figura 6.5* se muestra el diagrama del Lugar de las Raíces ( $K_p \geq 0$ ) para el microcalorímetro cuando la potencia de compensación se libera en la muestra:



*Figura 6.5.* Diagrama del Lugar de las Raíces ( $K_p \geq 0$ ) del microcalorímetro bajo control proporcional, cuando la potencia de compensación se libera en la muestra directamente.

y a partir de este diagrama se deducen los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}
 K_p < \frac{(p_1 - p_2)^2}{4ap_1p_2} &\Rightarrow \text{Im}[p_{\pm}] = 0 \\
 K_p > \frac{(p_1 - p_2)^2}{4ap_1p_2} &\Rightarrow \text{Im}[p_{\pm}] \neq 0 \\
 0 < \text{Re}[p_1] \leq \text{Re}[p_-] < \text{Re}[p_+] \leq \text{Re}[p_2] &\Rightarrow \tau_1 \geq \tau_- > \tau_+ \geq \tau_2 > 0 \quad (6.35) \\
 K_p = 0 &\Rightarrow \begin{cases} p_- = p_1 \\ p_+ = p_2 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tau_- = \tau_1 \\ \tau_+ = \tau_2 \end{cases} \\
 K_p \rightarrow +\infty &\Rightarrow \begin{cases} \text{Re}[p_{\pm}] = \frac{p_1 + p_2}{2} \\ \text{Im}[p_{\pm}] \rightarrow \pm\infty \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tau_{\pm} = \frac{2\tau_1\tau_2}{\tau_1 + \tau_2} \\ \omega = \pm \frac{\sqrt{4aK_p\tau_1\tau_2 - (\tau_1 - \tau_2)^2}}{2\tau_1\tau_2} \end{cases}
 \end{aligned}$$

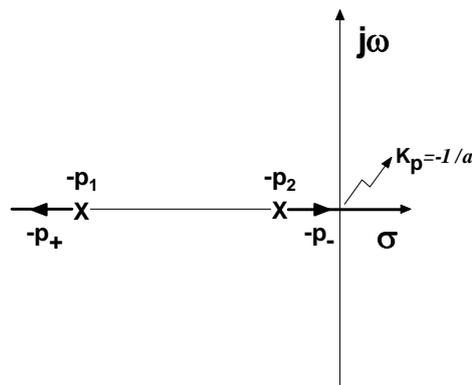
que se resumen en los siguientes puntos:

- Los polos,  $-p_-$  y  $-p_+$ , poseen siempre parte real negativa, por lo que el sistema es estable (esto ya se encontró mediante el Criterio de Hurwitz). Debido a que a partir de un valor de  $K_p$  los polos son complejos conjugados teniendo parte imaginaria no nula, el sistema presenta comportamiento oscilatorio con frecuencia característica  $\omega$ .
- La constante de tiempo  $\tau_-$  es decreciente respecto del parámetro de control  $K_p$ , pero  $\tau_+$  es función creciente, siendo siempre mayores o iguales que  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , respectivamente. En este caso, el sistema de compensación añade inercia térmica al dispositivo microcalorimétrico.

Por tanto, en el caso de que la potencia de compensación actúe directamente sobre la muestra, aparecerá un comportamiento oscilatorio para valores de  $K_p$  no demasiado elevados. Por otra parte, no habrá una reducción efectiva de las constantes de tiempo. Esto demuestra que el hecho de que la potencia de compensación se genere en el conjunto sensor-célula, lejos de ser una limitación de diseño, es una estrategia de diseño muy apropiada y recomendable. Nótese además que todo esto no depende de la localización del

efecto térmico que se quiere cuantificar (calibración eléctrica o reacción química), sino que únicamente depende de la localización de los actuadores de compensación. La interpretación de este resultado es que se debe realizar la compensación en el mismo lugar (elemento del sistema) que aquél en que se realiza la medida de la potencia generada por el efecto térmico. Si no, no habrá un buen control debido al hecho de que el efecto de la compensación no se detectaría instantáneamente, sino que existiría un tiempo de retraso adicional (tiempo que tarda en detectarse dicho efecto mediante el sistema de medida). Este tiempo de retraso es el responsable del comportamiento oscilatorio.

Para finalizar, en la *Figura 6.6* se muestra el diagrama del Lugar de las Raíces Complementario ( $K_p \leq 0$ ) cuando la potencia de compensación se libera directamente en la muestra:



*Figura 6.6.* Diagrama del Lugar de las Raíces Complementario ( $K_p \leq 0$ ) del microcalorímetro bajo control proporcional, cuando la potencia de compensación se libera en la muestra directamente.

obteniéndose los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}
& \text{Im}[p_{\pm}] = 0 \\
& 0 < p_- \leq p_1 < p_2 \leq p_+ \Rightarrow \tau_- \geq \tau_1 > \tau_2 \geq \tau_+ > 0 \\
& K_p = 0 \Rightarrow \begin{cases} p_- = p_1 \\ p_+ = p_2 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tau_- = \tau_1 \\ \tau_+ = \tau_2 \end{cases} \\
& K_p \rightarrow -\frac{1}{a} \Rightarrow \begin{cases} p_- \rightarrow 0 \\ p_+ \rightarrow p_1 + p_2 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tau_- \rightarrow +\infty \\ \tau_+ \rightarrow \frac{\tau_1 \tau_2}{\tau_1 + \tau_2} \end{cases}
\end{aligned} \tag{6.36}$$

donde tampoco tiene sentido disminuir el valor de  $K_p$  más allá del límite de estabilidad.

### 6.1.3. Control proporcional-derivativo.

El control proporcional es el tipo de control lineal más simple que se puede emplear, pero, como hemos demostrado, la señal en estado estacionario decrece conforme aumenta la eficacia del controlador provocando una reducción de la relación señal-ruido. Para suplir estas deficiencias se incluye a veces un término derivativo en la función de control. Dicho término tendrá en cuenta la tendencia que presenta la señal de medida, creciente o decreciente y en qué cuantía, para *predecir* los valores futuros y llevar a cabo una compensación más eficiente. Sin embargo, puede presentar limitaciones, principalmente por dos motivos:

- Las señales que se manejan son señales muestreadas y hay que evaluar una derivada numérica. ¿Qué fórmula de aproximación numérica se emplea para emular la derivación continua?
- Si queremos trabajar con alta sensibilidad, nos situaremos cerca del límite de detección del instrumento. Las señales estarán afectadas de un nivel de ruido importante que es amplificado en el cálculo de la derivada, empobreciéndose la relación señal-ruido.

Estos inconvenientes proceden de la implementación digital del control derivativo, aunque también el segundo punto afecta a los sistemas analógicos y es una de las principales razones por las que el control proporcional-derivativo apenas se utiliza en los sistemas de control. Vamos a suponer que el control es implementado analógicamente. La función de transferencia del elemento controlador,  $G_C(s)$ , adopta la forma:

$$\begin{aligned}\Delta V_C(t) &= K_P \Delta V_{NC}(t) + K_D \frac{d\Delta V_{NC}(t)}{dt} \\ \Delta V_C(s) &= (K_P + K_D s) \Delta V_{NC}(s) \\ g_C(t) &= K_P \delta(t) - K_D \delta'(t) \\ G_C(s) &= K_P + K_D s\end{aligned}\tag{6.37}$$

donde  $K_D$  es la constante de derivación y se ha hecho uso de las propiedades que verifica la distribución Delta de Dirac y sus derivadas. Claramente  $K_P$  y  $K_D$  son parámetros de control ajustables cuyos valores determinarán la eficacia del sistema de compensación. Si bien  $K_P$  es adimensional,  $K_D$  posee dimensiones de tiempo. Si  $K_D=0$ , el sistema de control se reduce al proporcional y si, además,  $K_P=0$ , el sistema de control coincide con el control nulo. Este tipo de controlador corresponde a un compensador de retroalimentación *por adelanto*. La forma funcional indicada en las ecs. (6.37) corresponde al control diseñado en paralelo o sin interacción. El control implementado con interacción obedecería a la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}\Delta V_C(t) &= K_P \left( \Delta V_{NC}(t) + K_D \frac{d\Delta V_{NC}(t)}{dt} \right) \\ G_C(s) &= K_P (1 + K_D s)\end{aligned}\tag{6.38}$$

y aunque esta distinción no tiene consecuencias, salvo una redefinición de los parámetros de control, sí es importante en el ámbito de la Ingeniería de Sistemas de Control en cuanto al análisis y ajuste del sistema sometido a estudio.

La función de transferencia en lazo cerrado del sistema bajo este tipo de control es (ec. (4.24)):

$$G_s(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2) + b(K_P + K_D s)(s + z_1)} = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{(1 + bK_D)} \frac{p_1 p_2}{(s + p_-)(s + p_+)} \quad (6.39)$$

donde  $-p_+$  y  $-p_-$  son los polos de la función de transferencia del sistema retroalimentado y se pueden expresar en función de los polos del sistema no retroalimentado:

$$p_{\pm} = \frac{(p_1 + p_2 + b(K_P + K_D z_1)) \pm \sqrt{(p_1 + p_2 + b(K_P + K_D z_1))^2 - 4(1 + bK_D)(p_1 p_2 + bK_P z_1)}}{2(1 + bK_D)} \quad (6.40)$$

observándose la dependencia de los polos del sistema retroalimentado respecto de los parámetros de control,  $K_P$  y  $K_D$ . Las constantes de tiempo del sistema retroalimentado se definen del modo indicado en la ec. (6.16).

La función de transferencia en lazo abierto,  $2K(s)G_C(s)G_{2P,0}(s)$  posee dos ceros,  $-z_1$  y  $-K_P/K_D$ , y dos polos,  $-p_1$  y  $-p_2$ . No posee polos en  $s=0$ , por lo que el sistema es de *tipo 0*. En este punto, el sistema bajo control proporcional-derivativo coincide con los controles ya estudiados.

### 6.1.3.a. Efecto térmico generado por la muestra bajo control proporcional-derivativo.

A partir de la ec. (6.39) calculamos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro bajo control proporcional-derivativo:

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}^{\delta}(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1 + bK_D} \frac{p_1 p_2}{(s + p_-)(s + p_+)} Q \\ \Delta V_{NC}^{\delta}(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1 + aK_P} Q \frac{1}{\tau_- - \tau_+} \left( e^{-t/\tau_-} - e^{-t/\tau_+} \right) \end{aligned} \quad (6.41)$$

$$\Delta V_{NC}^Z(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+bK_D} \frac{p_1 p_2}{(s+p_-)(s+p_+)} W_0 \frac{1}{s} \quad (6.42)$$

$$\Delta V_{NC}^Z(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+aK_P} W_0 \left( 1 - \frac{\tau_-}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_-} + \frac{\tau_+}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_+} \right)$$

$$\Delta V_{NC}^\Delta(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+bK_D} \frac{p_1 p_2}{(s+p_-)(s+p_+)} W_0 \frac{1-e^{-s\Delta}}{s}$$

$$\Delta V_{NC}^\Delta(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+aK_P} W_0 \left( \left( 1 - \frac{\tau_-}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_-} + \frac{\tau_+}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_+} \right) \right. \quad (6.43)$$

$$\left. - \left( 1 - \frac{\tau_-}{\tau_- - \tau_+} e^{-(t-\Delta)/\tau_-} + \frac{\tau_+}{\tau_- - \tau_+} e^{-(t-\Delta)/\tau_+} \right) \chi(t-\Delta) \right)$$

y son formalmente idénticas a las respuestas del sistema no controlado (ecs. (6.4)-(6.6)) y a las del sistema con control proporcional (ecs. (6.17)-(6.19)). Las constantes de tiempo dependen de los valores de los parámetros de control,  $K_P$  y  $K_D$ . Sin embargo, la ganancia en estado estacionario sólo depende de  $K_P$ . Aquí se vislumbra ya una de las ventajas que incluye el control proporcional-derivativo: con la ayuda de  $K_D$  será posible modificar las constantes de tiempo sin alterar la ganancia en estado estacionario. Con el control proporcional puro esto no es posible.

La ecuación característica del sistema es:

$$(s+p_1)(s+p_2) + b(K_P + K_D s)(s+z_1) = (1+K_D s)(s+p_-)(s+p_+) = 0 \quad (6.44)$$

y como hay dos parámetros arbitrarios,  $K_P$  y  $K_D$ , se hará uso de los métodos de análisis de estabilidad de sistemas continuos. Aplicando el Criterio de Routh-Hurwitz, aparecen las siguientes condiciones de estabilidad:

$$\begin{aligned} \frac{K_D}{\tau_{SC}} &> -\frac{1}{a} \\ K_P + \frac{K_D}{\tau_S} &> -\frac{1}{a} \left( 1 + \frac{\tau_{SC}}{\tau_S} + \frac{\alpha_S}{\alpha_{SC}} \right) = -\frac{1}{a} \left( 1 + \frac{\tau_{SC}}{\tau_S} \left( 1 + \frac{C_S}{C_{SC}} \right) \right) \\ K_P &> -\frac{1}{a} \end{aligned} \quad (6.45)$$

Aunque también se obtienen estas tres desigualdades en sentido contrario (< en vez de >), se eligen las indicadas para que el sistema sea estable cuando  $K_D=0$ . En una situación normal ( $\tau_{SC} \gg \tau_S$ ,  $\alpha_S \gg \alpha_{SC}$ ), las desigualdades determinantes son la primera y la tercera. El límite de estabilidad para  $K_P$  es el mismo que en el control proporcional y el mismo que para  $K_D$ . Se demuestra que el sistema es estable para  $K_P > 0$  y  $K_D > 0$ . Sin embargo, el microcalorímetro es inestable para valores positivos elevados de  $K_P$  y  $K_D$ . Este hecho únicamente se puede explicar mediante el modelo discreto del microcalorímetro, ya que es un fenómeno típico de retroalimentación en sistemas digitales. Por otra parte, el microcalorímetro admite retroalimentación positiva ( $K_P < 0$  y  $K_D < 0$ ), siempre que no se violen las condiciones dadas por las ecs. (6.45).

Aplicando la técnica de análisis del Lugar de las Raíces a la ecuación característica (ec. 6.20) estudiaremos la influencia de los parámetros de control,  $K_P$  y  $K_D$ , sobre el comportamiento del microcalorímetro. Como tenemos dos parámetros, tendremos que esbozar lo que se conoce como Contorno de las Raíces. Ahora se ven las ventajas que aporta esta técnica, ya que investigar la evolución de los polos del sistema a través de la resolución directa de la ecuación característica (ec. (6.40)) es mucho más complicado y tedioso. Para construir el Contorno del Lugar de las Raíces, primero se supone que  $K_D$  es nulo y se elaboran los diagramas del Lugar de las Raíces considerando únicamente  $K_P$  como parámetro variable. Luego, a partir de estos diagramas se fabrican los diagramas del Lugar de las Raíces teniendo en cuenta valores no nulos del parámetro  $K_D$ . En la *Figura 6.7* se ilustran los diagramas (No Complementario y Complementario) del Lugar de las Raíces del microcalorímetro bajo control proporcional-derivativo cuando  $K_D$  es nulo.

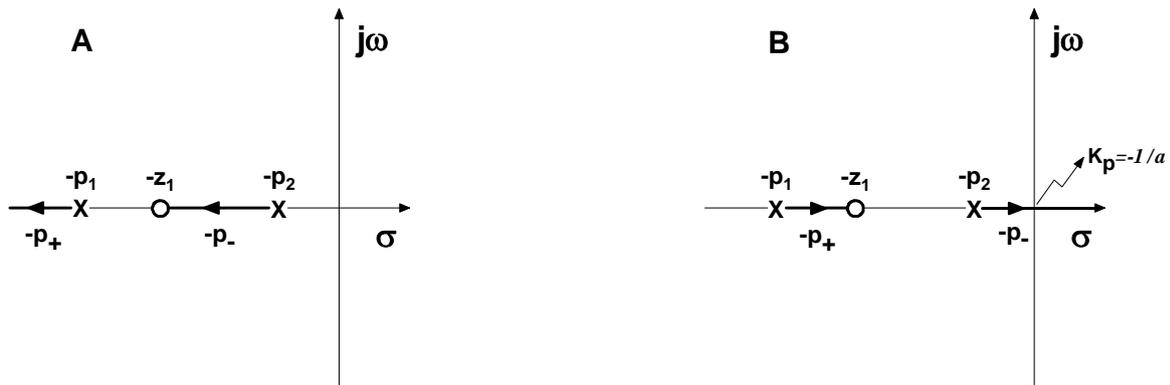


Figura 6.7. Diagrama del Lugar de las Raíces No Complementario ( $K_P \geq 0$ ) (A) y Complementario ( $K_P \leq 0$ ) (B), cuando  $K_D = 0$ .

siendo estos diagramas los mismos que los presentados en las Figuras 6.2 y 6.3 (es lógico: si  $K_D$  es nulo, el control será proporcional puro), por lo que la interpretación es idéntica a la ya realizada. Ahora, para cada uno de estos diagramas, se construyen los diagramas del Lugar de las Raíces No Complementario ( $K_D \geq 0$ , véase la Figura 6.8) y Complementario ( $K_D \leq 0$ , véase la Figura 6.9) para el parámetro  $K_D$ .

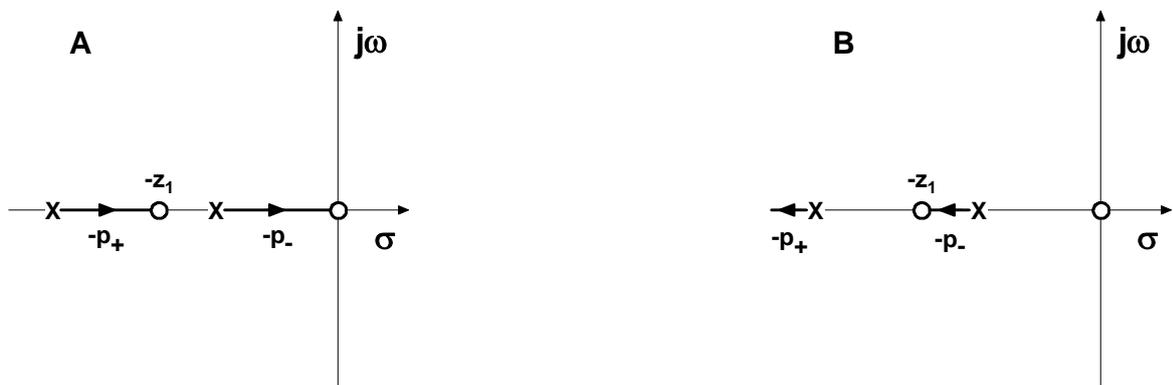


Figura 6.8. Diagrama del Lugar de las Raíces No Complementario ( $K_D \geq 0$ ) (A) y Complementario ( $K_D \leq 0$ ) (B), obtenidos a partir del diagrama del Lugar de las Raíces para el parámetro  $K_P$  (Figura 6.7.A).

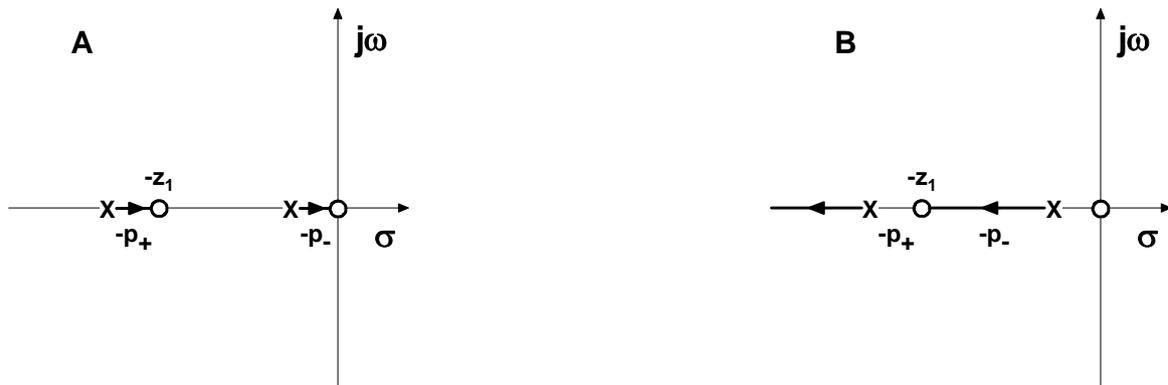


Figura 6.9. Diagrama del Lugar de las Raíces No Complementario ( $K_D \geq 0$ ) (A) y Complementario ( $K_D \leq 0$ ) (B), obtenidos a partir del diagrama del Lugar de las Raíces Complementario para el parámetro  $K_P$  (Figura 6.7.B).

teniendo estos diagramas una fácil interpretación:

- Los polos,  $-p_-$  y  $-p_+$ , son siempre reales, negativos y distintos, por lo que si el sistema es estable bajo control proporcional, la inclusión del término derivativo no lo desestabiliza. Sin embargo, si el sistema es inestable bajo control proporcional, el control derivativo no lo estabiliza. Además, no presenta en ningún momento comportamiento oscilatorio. En la práctica el microcalorímetro exhibe un comportamiento oscilatorio e inestable para valores positivos grandes de  $K_P$  y  $K_D$ . Todo esto sólo se podrá justificar a partir del modelo discreto del dispositivo.
- Dado un valor fijo de  $K_P$ , que no viole la estabilidad del sistema, las constantes de tiempo son funciones crecientes de  $K_D$ . Por tanto, lo que interesa es utilizar valores negativos del parámetro  $K_D$ .
- Para un valor dado de  $K_P$  y un valor suficientemente pequeño (negativo) de  $K_D$ , el polo  $-p_+$  es despreciable. El sistema se comportará como si tuviera una única constante de tiempo prácticamente igual a  $\tau_s$ . De este modo, con una elevada eficiencia de compensación es posible eliminar la inercia térmica del conjunto

---

sensor-célula. Lo importante es que para conseguir este objetivo no es necesario un valor muy grande de  $K_P$ , sino que  $K_D$  se ocupa de disminuir las constantes de tiempo. De este modo, la ganancia en estado estacionario no tiene por qué reducirse mucho.

Los errores en estado estacionario del sistema bajo control proporcional-derivativo son (ecs. (5.44) y (5.46)):

$$\begin{aligned} e_P(+\infty) &= \frac{1}{1 + aK_P} \\ e_V(+\infty) &= +\infty \\ e_A(+\infty) &= +\infty \end{aligned} \tag{6.46}$$

lo que confirma que el dispositivo microcalorimétrico es un sistema de *tipo 0* y presenta un error estacionario finito y constante cuando la entrada es una señal de potencia constante. Como el error de posición es finito, se puede asignar a cada valor de voltaje no compensado medido desde la línea base, un valor de potencia térmica correspondiente. Sin embargo, igual que ocurría para el control proporcional, el error de posición está modulado por el parámetro de control, de forma que para valores suficientemente grandes de  $K_P$  dicho error es muy pequeño. De aquí se deduce que no interesa utilizar valores demasiado grandes de la constante  $K_P$ .

Evaluando el área correspondiente a las respuestas impulso y pulso, así como el valor límite de la respuesta paso, se obtiene la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración del microcalorímetro (ecs. (5.8) y (5.13)):

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0} = \frac{1 + aK_P}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \tag{6.47}$$

donde se observa que la constante de calibración es la misma que para el microcalorímetro bajo control proporcional. Es independiente de  $K_D$ , dependiendo únicamente de  $K_P$ . Si

$K_P=0$ , la constante de calibración coincide con la del sistema no controlado.

Si tenemos en cuenta la ec. característica (ec. (6.44)) y la expresión de  $K_{CAL}$  (ec. (6.47)) es fácil demostrar que:

$$\tau_- \tau_+ K_{CAL} = \tau_1 \tau_2 (1 + a \tau_{SC} K_D) K_{CAL} \Big|_{K_P=0} = \tau_s \tau_{SC} (1 + a \tau_{SC} K_D) K_{NC} \quad (6.48)$$

por lo que el producto de las constantes de tiempo y la constante de calibración para la señal no compensada, mantiene un valor constante e independiente del valor de  $K_P$ , para un valor fijo de  $K_D$ . Así, las constantes de tiempo y la constante de calibración están relacionadas a través de una proporcionalidad inversa.

De todo esto se concluye que el control proporcional-derivativo modifica la función de transferencia global del sistema reduciendo las constantes de tiempo, mejorando el funcionamiento del microcalorímetro. El efecto concomitante no deseado que aparecía con el control proporcional, que consiste en la disminución de la ganancia en estado estacionario, se puede evitar. Se dispone de dos parámetros independientes con los que se puede modificar de forma casi independiente la ganancia en estado estacionario y las constantes de tiempo. En principio, es posible tomar dos valores de  $K_P$  y  $K_D$  tales que la ganancia en estado estacionario no se reduzca demasiado y las constantes de tiempo sean suficientemente pequeñas.

En el microcalorímetro con control proporcional-derivativo también interviene la señal compensada, por lo que podemos calcular las diferentes constantes de calibración definidas en el Capítulo 3 (ec. (3.5) y (3.6)):

$$\begin{aligned}
K_{CAL}^C &= \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \frac{1 + aK_p}{K_p} \\
K_{NC} &= \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \\
K_C &= 2 \frac{\pi}{R}
\end{aligned} \tag{6.49}$$

que son idénticas a las obtenidas para el control proporcional, ya que son independientes de  $K_D$ , y de donde se sacan las mismas conclusiones. Asimismo, se pueden evaluar las fracciones de potencia compensada y no compensada:

$$\eta_{NC} = \frac{1}{1 + aK_p} \quad \eta_{NC} = \frac{aK_p}{1 + aK_p} \tag{6.50}$$

también idénticas a las encontradas para el control proporcional. Se observa que  $\eta_{NC}$  nuevamente coincide con el error de posición en estado estacionario.

### 6.1.3.b. Efecto térmico producido sobre el conjunto célula-sensor bajo control proporcional-derivativo.

Si ahora consideramos que el efecto térmico se genera en el conjunto célula-sensor, todos los resultados son básicamente los mismos. Nuevamente, aparece una ligera variación en las respuestas impulso, paso y pulso, debida a la presencia de un cero en la función de transferencia:

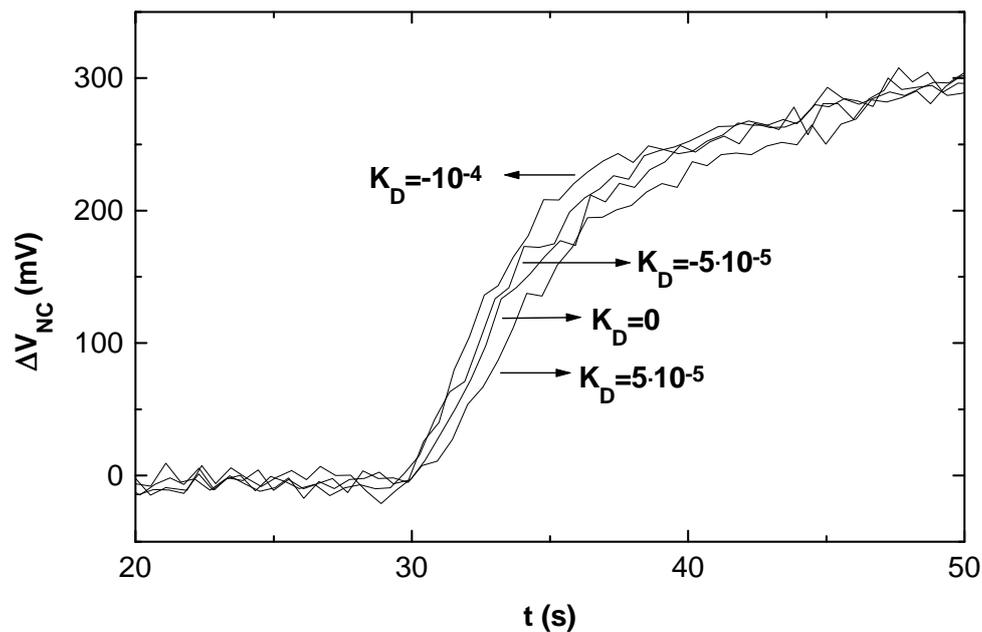
$$\Delta V_{NC}^\delta(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1 + aK_p} Q \frac{1}{\tau_- - \tau_+} \left( \frac{\tau_- - \tau_S}{\tau_-} e^{-t/\tau_-} - \frac{\tau_+ - \tau_S}{\tau_+} e^{-t/\tau_+} \right) \tag{6.51}$$

$$\Delta V_{NC}^z(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+aK_P} W_0 \left( 1 - \frac{\tau_- - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_-} + \frac{\tau_+ - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_+} \right) \quad (6.52)$$

$$\Delta V_{NC}^\Delta(t) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{1+aK_P} W_0 \left( \left( 1 - \frac{\tau_- - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_-} + \frac{\tau_+ - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-t/\tau_+} \right) - \left( 1 - \frac{\tau_- - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-(t-\Delta)/\tau_-} + \frac{\tau_+ - \tau_S}{\tau_- - \tau_+} e^{-(t-\Delta)/\tau_+} \right) \chi(t-\Delta) \right) \quad (6.53)$$

y la discusión realizada anteriormente sobre el comportamiento transitorio del sistema, no controlado y bajo control proporcional, en función de la localización de la fuente del efecto térmico se puede aplicar íntegramente de nuevo, ya que las ecuaciones son formalmente idénticas. El significado físico del cero sigue siendo el mismo: está asociado con la constante de tiempo  $\tau_S$ .

En la *Figura 6.10* se muestra la respuesta paso del microcalorímetro para un mismo valor de  $K_P$  y distintos valores de  $K_D$ , donde se puede evaluar el efecto del parámetro de control  $K_D$  sobre las constantes de tiempo.



---

*Figura 6.10.* Respuestas paso para diferentes valores de  $K_D$ .

observándose que la ganancia en estado estacionario no se ve afectada y surge una pequeña variación de las constantes de tiempo, ya que el perfil de subida varía muy poco. Aún siendo débil este efecto, está de acuerdo con lo esperado: valores más pequeños (negativos) de  $K_D$  producen una subida ligeramente más rápida (constantes de tiempo menores) y valores mayores (positivos) de  $K_D$  producen una subida ligeramente más lenta (constantes de tiempo mayores). Cabría pensar que valores absolutos de  $K_D$  ( $K_D < 0$ ) mayores que el límite superior mostrado en la *Figura 6.10* permitirían conseguir una reducción significativa de las constantes de tiempo; no obstante, hay que indicar que si  $K_D$  alcanza el valor de  $-2 \cdot 10^{-4}$  el sistema es inestable, por lo que no se podrá conseguir una mejora efectiva real respecto del control proporcional, aunque los resultados teóricos así lo apuntaban.

#### *6.1.4. Control proporcional-integral.*

Para eliminar el inconveniente que aparece en el control proporcional (reducción de la ganancia en estado estacionario conforme aumenta la eficacia de la compensación), se incluyó el término derivativo en la función de control. Sin embargo, aunque teóricamente es una buena idea como acabamos de ver, en la práctica, debido a las características del dispositivo (parámetros instrumentales), no constituye una mejora significativa del comportamiento del microcalorímetro bajo control proporcional.

Otra opción es considerar un término integrador en la función de control. De este modo, en la señal de voltaje compensado se va acumulando la información de los instantes pasados. La función de transferencia del elemento controlador,  $G_C(s)$ , es:

$$\begin{aligned}\Delta V_C(t) &= K_P \Delta V_{NC}(t) + K_I \int_0^t \Delta V_{NC}(t') dt' \\ \Delta V_C(s) &= \left( K_P + \frac{K_I}{s} \right) \Delta V_{NC}(s) \\ g_C(t) &= K_P \delta(t) + K_I \chi(t) \\ G_C(s) &= K_P + \frac{K_I}{s}\end{aligned}\tag{6.54}$$

donde  $K_I$  es la constante de integración.  $K_P$  y  $K_I$  son parámetros de control ajustables cuyos valores determinarán la eficacia del sistema de compensación. El parámetro  $K_I$  posee dimensiones de tiempo<sup>-1</sup>. Si  $K_I=0$ , el sistema de control se reduce al proporcional y si, además,  $K_P=0$ , coincidirá con el control nulo. Si  $K_I/K_P > 0$  este controlador es un compensador de retroalimentación *por atraso* y si  $K_I/K_P < 0$  es un compensador *por adelanto*. Se ha elegido nuevamente el algoritmo de control en paralelo o sin interacción. El control implementado con interacción obedecería a la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}\Delta V_C(t) &= K_P \left( \Delta V_{NC}(t) + K_I \int_0^t \Delta V_{NC}(t') dt' \right) \\ G_C(s) &= K_P \left( 1 + \frac{K_I}{s} \right)\end{aligned}\tag{6.55}$$

La función de transferencia en lazo cerrado del sistema bajo este tipo de control es (ec. (4.24)):

$$G_S(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2}{(s + p_1)(s + p_2) + b \left( K_P + \frac{K_I}{s} \right) (s + z_1)} = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2 s}{(s + p')(s + p'')(s + p''')}\tag{6.56}$$

donde  $-p'$ ,  $-p''$  y  $-p'''$  son los polos de la función de transferencia del sistema retroalimentado. Son las raíces, dependientes de los parámetros de control,  $K_P$  y  $K_I$ , de la ecuación característica:

$$s(s + p_1)(s + p_2) + b(K_p s + K_I)(s + z_1) = (s + p')(s + p'')(s + p''') = 0 \quad (6.57)$$

Teniendo en cuenta que, al ser cúbica la ecuación característica, un polo será real y dos de los polos serán reales o complejos conjugados, las constantes de tiempo del sistema retroalimentado se definen del siguiente modo:

$$\tau' = \frac{1}{p'} \quad \tau'' = \frac{1}{\text{Re}[p'']} \quad \tau''' = \frac{1}{\text{Re}[p''']} \quad (6.58)$$

correspondiendo la parte imaginaria de los dos polos complejos conjugados a una frecuencia de oscilación,  $\omega$ .

La función de transferencia en lazo abierto,  $2K(s)G_C(s)G_{2P,0}(s)$ , contiene tres polos,  $-p_1$ ,  $-p_2$  y  $0$ , y posee dos ceros,  $-z_1$  y  $-K_I/K_P$ . Como presenta un polo en  $s=0$ , el sistema es de *tipo 1*. En este punto, el sistema bajo control proporcional-integral difiere respecto de los anteriores controles analizados.

#### 6.1.4.a. Efecto térmico generado por la muestra bajo control proporcional-integral.

A partir de la ec. (6.56) calculamos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro bajo control proporcional-integral:

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}^\delta(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2 s}{(s + p')(s + p'')(s + p''')} Q \\ \Delta V_{NC}^\delta(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} Q \left( \frac{1}{(\tau'' - \tau')(\tau' - \tau''')} e^{-t/\tau'} \right. \\ &\quad \left. + \frac{1}{(\tau''' - \tau'')( \tau'' - \tau') } e^{-t/\tau''} + \frac{1}{(\tau' - \tau''')( \tau''' - \tau'' )} e^{-t/\tau'''} \right) \end{aligned} \quad (6.59)$$

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^z(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2 s}{(s+p')(s+p'')(s+p''')} W_0 \frac{1}{s} \\ \Delta V_{NC}^z(t) &= -A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} W_0 \left( \frac{\tau'}{(\tau''-\tau')(\tau'-\tau''')} e^{-t/\tau'} \right. \\ &\quad \left. + \frac{\tau''}{(\tau'''-\tau'')(\tau''-\tau')} e^{-t/\tau''} + \frac{\tau'''}{(\tau'-\tau'')(\tau'''-\tau'')} e^{-t/\tau'''} \right)\end{aligned}\quad (6.60)$$

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^\Delta(s) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{p_1 p_2 s}{(s+p')(s+p'')(s+p''')} W_0 \frac{1-e^{-s\Delta}}{s} \\ \Delta V_{NC}^\Delta(t) &= -A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} W_0 \left( \left( \frac{\tau'}{(\tau''-\tau')(\tau'-\tau''')} e^{-t/\tau'} \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + \frac{\tau''}{(\tau'''-\tau'')(\tau''-\tau')} e^{-t/\tau''} + \frac{\tau'''}{(\tau'-\tau'')(\tau'''-\tau'')} e^{-t/\tau'''} \right) \right. \\ &\quad \left. - \left( \frac{\tau'}{(\tau''-\tau')(\tau'-\tau''')} e^{-(t-\Delta)/\tau'} + \frac{\tau''}{(\tau'''-\tau'')(\tau''-\tau')} e^{-(t-\Delta)/\tau''} \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + \frac{\tau'''}{(\tau'-\tau'')(\tau'''-\tau'')} e^{-(t-\Delta)/\tau'''} \right) \chi(t-\Delta) \right)\end{aligned}\quad (6.61)$$

donde se ha considerado que los tres polos son reales. Si dos de ellos son complejos conjugados se obtienen las siguientes respuestas:

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^\delta(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} \frac{1+\omega^2\tau''^2}{\tau'\tau''^2} Q \left( -\frac{1}{\tau'} e^{-t/\tau'} \right. \\ &\quad \left. + \frac{1}{\omega} e^{-t/\tau''} \left( \left( \omega^2 + \frac{1}{\tau''^2} - \frac{1}{\tau'\tau''} \right) \text{sen}(\omega t) + \frac{1}{\tau'\tau''} \text{cos}(\omega t) \right) \right)\end{aligned}\quad (6.62)$$

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^z(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} \frac{1+\omega^2\tau''^2}{(\tau'-\tau'')^2 + \omega^2\tau'^2\tau''^2} W_0 \left( e^{-t/\tau'} \right. \\ &\quad \left. + e^{-t/\tau''} \left( \frac{\tau''-\tau'}{\tau'\tau''} \text{sen}(\omega t) - \text{cos}(\omega t) \right) \right)\end{aligned}\quad (6.63)$$

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}^{\Delta}(t) = & A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} \frac{1 + \omega^2 \tau''^2}{(\tau' - \tau'')^2 + \omega^2 \tau'^2 \tau''^2} W_0 \left( \left( e^{-t/\tau'} \right. \right. \\ & \left. \left. + e^{-t/\tau''} \left( \frac{\tau'' - \tau'}{\tau' \tau''} \text{sen}(\omega t) - \text{cos}(\omega t) \right) \right) \right) \\ & - \left( e^{-(t-\Delta)/\tau'} + e^{-(t-\Delta)/\tau''} \left( \frac{\tau'' - \tau'}{\tau' \tau''} \text{sen}(\omega(t-\Delta)) - \text{cos}(\omega(t-\Delta)) \right) \right) \chi(t-\Delta) \end{aligned} \quad (6.64)$$

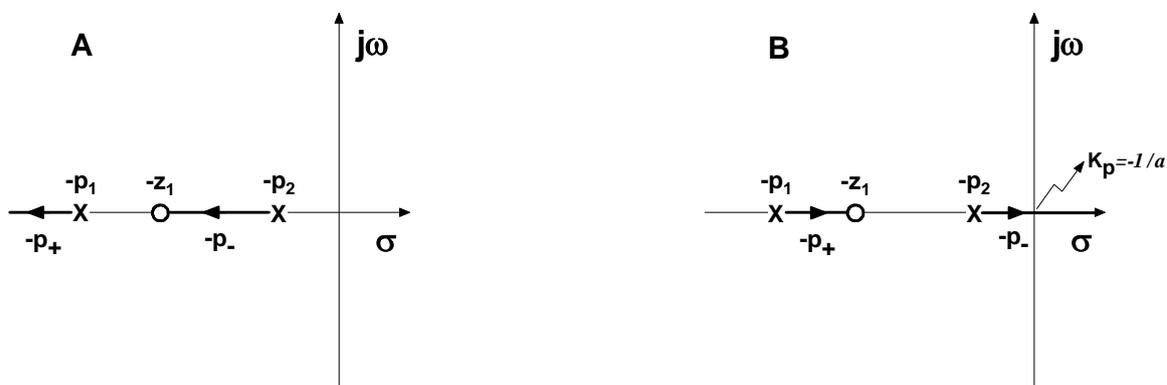
Como hay dos parámetros arbitrarios,  $K_P$  y  $K_D$ , se hará uso de los métodos de análisis de estabilidad de sistemas continuos. Aplicando el Criterio de Routh-Hurwitz, aparecen las siguientes condiciones de estabilidad:

$$\begin{aligned} K_P &> -\frac{1}{a} \left( 1 + \frac{\tau_{SC}}{\tau_S} + \frac{\alpha_S}{\alpha_{SC}} \right) = -\frac{1}{a} \left( 1 + \frac{\tau_{SC}}{\tau_S} \left( 1 + \frac{C_S}{C_{SC}} \right) \right) \\ K_P + K_I \tau_S &> -\frac{1}{a} \\ K_I &> 0 \end{aligned} \quad (6.65)$$

Se demuestra que el sistema es estable para  $K_P > 0$  y  $K_I > 0$ . Sin embargo, el microcalorímetro es inestable para valores positivos elevados de  $K_P$  y  $K_I$ . Este hecho solamente tendrá justificación a través del modelo discreto del microcalorímetro, ya que es un fenómeno típico de retroalimentación en sistemas discretos. El valor límite mínimo permitido para  $K_P$  es menor bajo control proporcional-integral que bajo control proporcional puro.

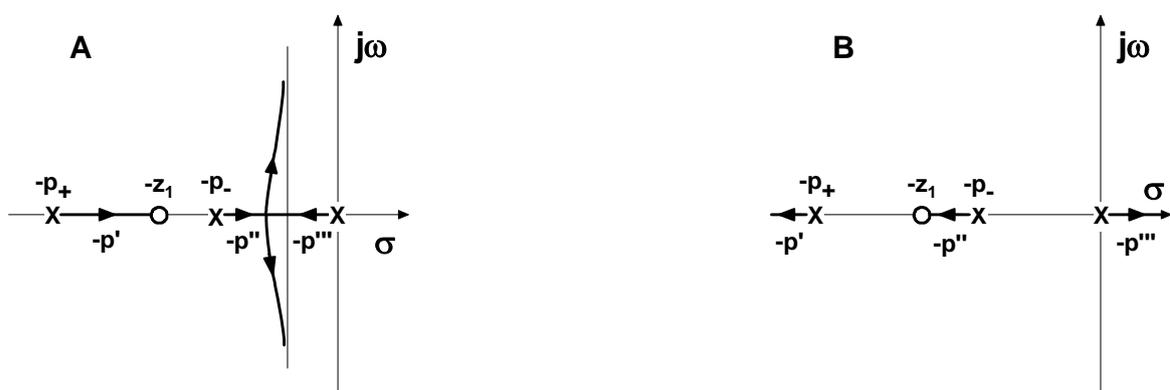
Aplicando la técnica de análisis del Lugar de las Raíces a la ecuación característica (ec. 6.57) estudiaremos la influencia de los parámetros de control,  $K_P$  y  $K_I$ , sobre el comportamiento del microcalorímetro. Como tenemos dos parámetros, tendremos que recurrir al Contorno de las Raíces. Para construir el Contorno del Lugar de las Raíces, primero se supone que  $K_I$  es nulo y se elaboran los diagramas del Lugar de las Raíces considerando únicamente  $K_P$  como parámetro variable. Luego, a partir de estos diagramas se fabrican los diagramas del Lugar de las Raíces teniendo en cuenta valores no nulos del

parámetro  $K_I$ . En la *Figura 6.11* se ilustran los diagramas (No Complementario y Complementario) del Lugar de las Raíces del microcalorímetro bajo control proporcional-integral cuando  $K_I$  es nulo:



*Figura 6.11.* Diagrama del Lugar de las Raíces No Complementario ( $K_P \geq 0$ ) (A) y Complementario ( $K_P \leq 0$ ) (B), cuando  $K_I = 0$ .

siendo estos diagramas los mismos que los presentados en las *Figuras 6.2* y *6.3* (si  $K_I$  es nulo, el control será proporcional puro). Ahora, para cada uno de estos diagramas, se construyen los diagramas del Lugar de las Raíces No Complementario ( $K_I \geq 0$ , véase la *Figura 6.12*) y Complementario ( $K_I \leq 0$ , véase la *Figura 6.13*) para el parámetro  $K_I$ .



*Figura 6.12.* Diagrama del Lugar de las Raíces No Complementario ( $K_I \geq 0$ ) (A) y Complementario ( $K_I \leq 0$ ) (B), obtenidos a partir del diagrama del Lugar de las Raíces para el parámetro  $K_P$  (*Figura 6.11.A*).

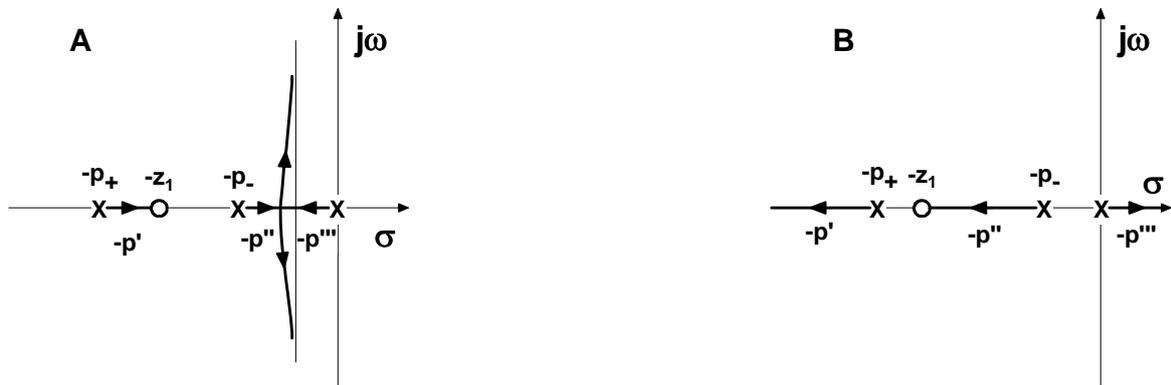


Figura 6.13. Diagrama del Lugar de las Raíces No Complementario ( $K_I \geq 0$ ) (A) y Complementario ( $K_I \leq 0$ ) (B), obtenidos a partir del diagrama del Lugar de las Raíces Complementario para el parámetro  $K_P$  (Figura 6.11.B).

teniendo estos diagramas la siguiente interpretación:

- Los polos son siempre reales, negativos y distintos para  $K_I$  menor que un valor crítico,  $K_{I,CRIT}$ . Para valores mayores que  $K_{I,CRIT}$ , dos polos constituyen un par complejo conjugado, por lo que el sistema presenta un comportamiento oscilatorio con frecuencia creciente y coeficiente de amortiguamiento decreciente. Si el sistema es estable bajo control proporcional, la inclusión del término integral no lo desestabiliza (siempre y cuando  $K_I \geq 0$ , ya que si  $K_I < 0$ , el sistema automáticamente es inestable). En la práctica el microcalorímetro exhibe un comportamiento inestable para valores positivos grandes de  $K_P$  y  $K_I$ . Esto sólo se podrá justificar a partir del modelo discreto del dispositivo.
- El centro de las asíntotas es negativo:  $\sigma_I = 1/2(z_1 - (p_- + p_+))$ . En una situación normal en que los valores de los polos  $-p_{\pm}$  son muy diferentes, las asíntotas estarán localizadas a la izquierda de  $-p_-$  (y no a la derecha, como se ha dibujado en las Figuras 6.12 y 6.13), por lo que se producirá una reducción efectiva de las constantes de tiempo.

- El parámetro  $K_{I,CRIT}$  es función creciente de  $K_P$ . Por tanto, el valor que debe tomar  $K_I$  para que el sistema presente comportamiento oscilatorio es más elevado cuanto mayor sea  $K_P$ . En otras palabras, si el sistema se comporta de modo oscilante, aumentando  $K_P$  se podrán eliminar las oscilaciones. Para unos valores dados de  $K_P$  y  $K_I$  tales que el comportamiento es oscilatorio, el factor de amortiguamiento disminuye si aumenta  $K_I$ .

Los errores en estado estacionario del sistema bajo control proporcional-integral son (ecs. (5.44) y (5.46)):

$$\begin{aligned} e_p(+\infty) &= 0 \\ e_v(+\infty) &= \frac{1}{aK_I} \\ e_A(+\infty) &= +\infty \end{aligned} \tag{6.66}$$

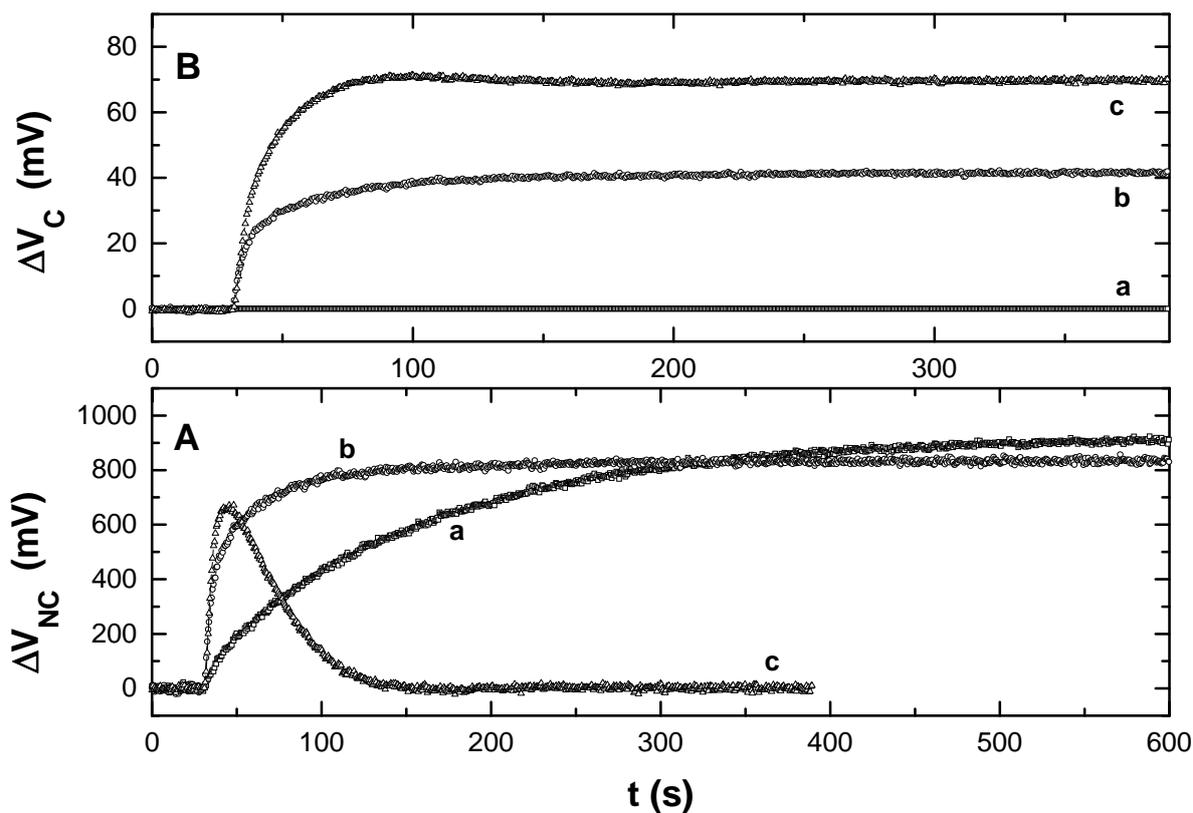
lo que confirma que el dispositivo microcalorimétrico es un sistema de *tipo 1* y presenta un error estacionario nulo cuando la entrada es una señal de potencia constante. Al ser nulo dicho error, no se puede asignar a cada valor de voltaje no compensado, medido desde la línea base, un valor de potencia térmica. Esto significa que la señal no compensada no contiene la información sobre la potencia térmica desarrollada.

Evaluando el área correspondiente a las respuestas impulso y pulso, así como el valor límite de la respuesta paso, se obtiene la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración del microcalorímetro (ecs. (5.8) y (5.13)):

$$\begin{aligned} K_0 &= 0 \\ K_{CAL} &= +\infty \end{aligned} \tag{6.67}$$

donde se observa que la constante de calibración diverge, ya que la ganancia en estado estacionario del sistema es nula. Esto está en relación directa con el hecho de que el error de posición es nulo. La interpretación de todo esto es que el sistema consigue compensar y

cancelar cualquier señal de potencia constante, por lo que el error de posición es nulo (véase la *Figura 6.14*). Debido a esto, cualquier valor de potencia tiene asociado un valor de voltaje no compensado nulo (véase la *Figura 6.14*) y a cualquier calor medido mediante la señal no compensada le corresponde un área nula en el termograma (véase la *Figura 6.15*). Por tanto, no hay una correspondencia unívoca entre calor y área o entre potencia y voltaje, no se puede emplear el método de calibración usual, la señal no compensada no es adecuada como señal de medida y no se puede definir una constante de calibración  $K_{CAL}$ .



*Figura 6.14.* Respuesta del microcalorímetro frente a una entrada de potencia constante bajo diferentes controles.

a) control nulo, b) control proporcional, c) control proporcional-integral.

(A) señal no compensada, (B) señal compensada.

Una consecuencia directa de esto es que no hace falta ajustar la línea base a cero si aparece un *offset*, ya que automáticamente el sistema bajo control proporcional-integral anula cualquier desviación de la línea base.

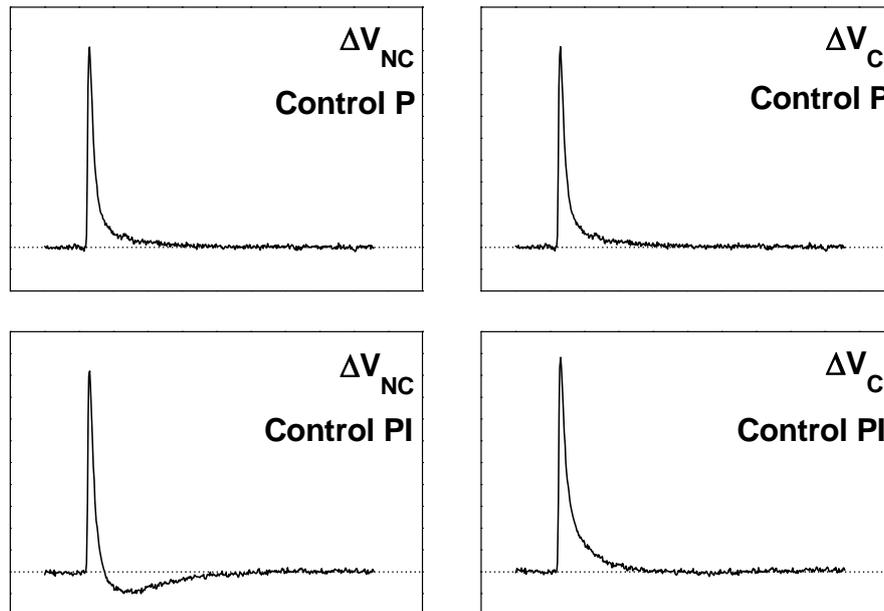


Figura 6.15. Respuestas pulso del sistema bajo control proporcional (P) y control proporcional-integral (PI).

Teniendo en cuenta la ec. característica (ec. (6.57)) es fácil demostrar que si los polos son reales se verifica:

$$\tau' \tau'' \tau''' K_I = \frac{\tau_1 \tau_2}{a} = \frac{\tau_s \tau_{sc}}{a} \quad (6.68)$$

de modo que el producto de las tres constantes de tiempo únicamente depende del parámetro  $K_I$ , a través de una proporcionalidad inversa. Y si hay polos complejos la relación análoga es:

$$\frac{\tau' \tau''^2}{(1 + \omega^2 \tau''^2)} K_I = \frac{\tau_1 \tau_2}{a} = \frac{\tau_s \tau_{sc}}{a} \quad (6.69)$$

Como alternativa a la no adecuación del voltaje no compensado como señal de medida existe la opción de realizar la medida utilizando el voltaje de compensación. La

relación existente entre ambos voltajes (6.1) permite encontrar la función de transferencia para esta señal:

$$\Delta V_C(s) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{(K_P s + K_I) p_1 p_2}{(s + p')(s + p'')(s + p''')} W(s) \quad (6.70)$$

siendo no nula la ganancia en estado estacionario. Por tanto, el error de posición para esta señal es no nulo y la respuesta paso presenta un valor límite estacionario no nulo (véase la *Figura 6.14*) y la respuesta pulso presenta un valor de área no nulo (véase la *Figura 6.15*). La constante de calibración para la señal compensada es el inverso de dicha ganancia:

$$K_{CAL}^C = 2 \frac{\pi}{R} \quad (6.71)$$

Éste es el valor que posee la constante de calibración  $K_C$  y el valor mínimo que alcanza  $K_{CAL}^C$  en el sistema bajo control proporcional, en el límite  $K_P \rightarrow +\infty$  (situación de máxima eficiencia de compensación, imposible de conseguir con el control proporcional). Si evaluamos las fracciones de potencia compensada y no compensada:

$$\eta_{NC} = 0 \quad \eta_C = 1 \quad (6.72)$$

nuevamente se obtienen los valores límite de máxima eficiencia (límite  $K_P \rightarrow +\infty$ ) que eran inalcanzables a través del control proporcional: toda la potencia térmica desarrollada por el efecto térmico es evacuada por el sistema de compensación. Este resultado era de esperar, ya que el valor estacionario del voltaje no compensado en respuestas paso es nulo y el área el voltaje no compensado en respuestas pulso también es nula. Ahora,  $\eta_{NC}$  también coincide con el error de posición en estado estacionario. Estos resultados sugieren que el control proporcional-integral constituye el caso límite del control proporcional cuando  $K_P \rightarrow +\infty$ .

Para contrastar el control proporcional y el proporcional-integral debemos emplear como referencia las características de la señal compensada, ya que en estos dos tipos de

control dicha señal sirve como señal de medida. Si comparamos entonces la constante  $K_{CAL}^C$  de ambos controles observa que:

- En el control proporcional-integral  $K_{CAL}^C$  es independiente de los parámetros de control.
- En el control proporcional-integral  $K_{CAL}^C$  tiene el mínimo valor que podría alcanzar en el control proporcional puro.

y de esta última aseveración se deduce que:

- El valor estacionario del voltaje de compensación para una entrada de potencia constante es mayor en el sistema bajo control proporcional-integral.
- El área de un pulso de calor es mayor en el sistema bajo control proporcional integral (véase la *Figura 6.16*).

Estas dos afirmaciones son consecuencia directa de que la ganancia en estado estacionario para el voltaje de compensación es mayor en el sistema bajo control proporcional-integral. Por tanto, la relación señal-ruido debe ser mejor en el sistema bajo control proporcional-integral, si además se tiene en cuenta que la operación de integración no añade ruido a la señal, a diferencia de la operación de derivación.

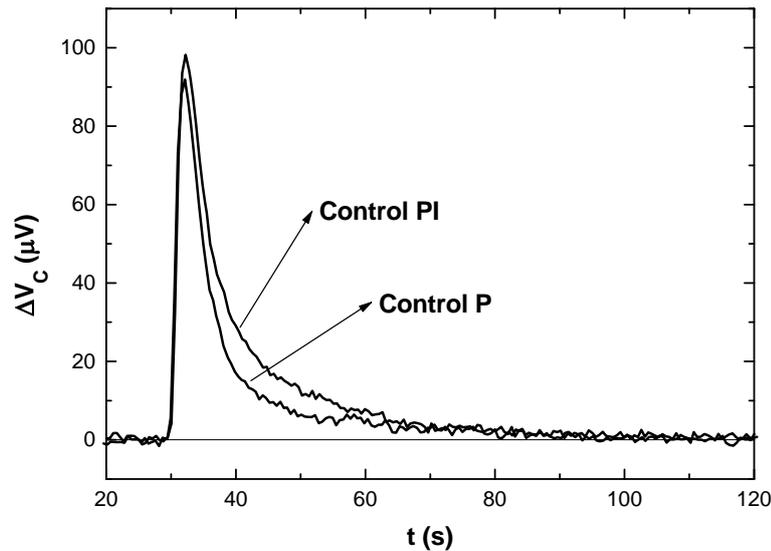


Figura 6.16. Respuesta pulso bajo control proporcional (P) y bajo control proporcional-integral (PI).

De todo esto se concluye que el control proporcional-integral introduce mejoras notables respecto a las ya aportadas por los controles proporcional y proporcional-derivativo. Podemos resumirlas brevemente:

- Eficacia 100% del sistema de compensación.
- Mejor relación señal-ruido.
- Reducción de las constantes de tiempo.
- Constante de calibración independiente de los parámetros de control.

y que se deberán traducir en una mayor sensibilidad, tanto estática como dinámica, y en una mayor eficacia global del dispositivo microcalorimétrico.

En las Figuras 6.17 y 6.18 se muestra una serie de respuestas pulso y respuestas paso del microcalorímetro para distintos valores de los parámetros de control  $K_P$  y  $K_I$ . En ellas se pueden observar todas las características que se dedujeron anteriormente:

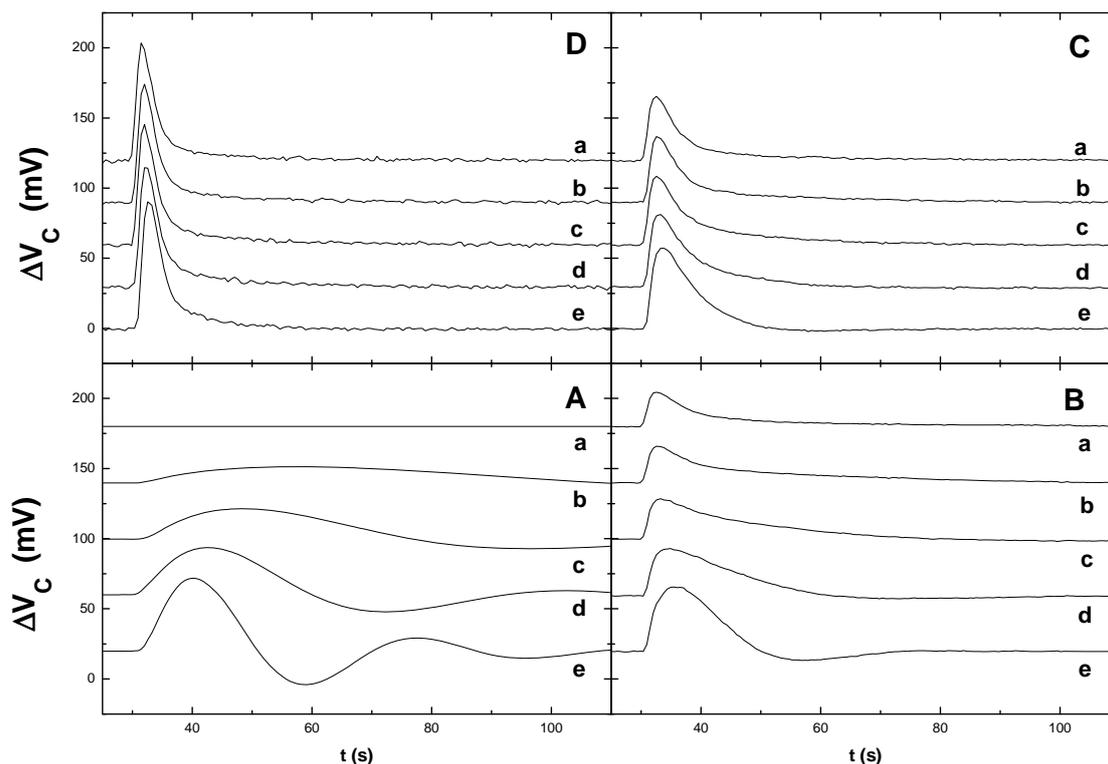


Figura 6.17. Respuestas del microcalorímetro frente a un pulso de calor.

A)  $K_p=0$ , B)  $K_p=5 \cdot 10^{-4}$ , C)  $K_p=10 \cdot 10^{-5}$ , D)  $K_p=20 \cdot 10^{-5}$

a)  $K_I=0$ , b)  $K_I=0.2 \cdot 10^{-5}$ , c)  $K_I=0.5 \cdot 10^{-5}$ , d)  $K_I=10^{-5}$ , e)  $K_I=2 \cdot 10^{-5}$

- Conforme  $K_I$  aumenta, el coeficiente de amortiguamiento disminuye.
- Las constantes de tiempo decrecen si aumenta  $K_p$ . Para valores mayores de  $K_p$  los pulsos son más agudos y estrechos, y las respuestas paso alcanzan más rápidamente el nivel estacionario.
- Para un valor dado de  $K_p$ , las constantes de tiempo decrecen si  $K_I$  aumenta.
- El área de las respuestas pulso y el valor en estado estacionario de las respuestas paso son insensibles a variaciones de  $K_p$  y  $K_I$ . Por tanto, ni la ganancia en estado estacionario ni la constante de calibración dependen de los parámetros de control. Hay una reducción de la relación señal-ruido debida solamente a un incremento del nivel de ruido.

- El nivel de ruido está determinado únicamente por  $K_P$
- Para un valor dado de  $K_P$ , existe un valor crítico  $K_{I,CRIT}$  tal que: si  $K_I > K_{I,CRIT}$  el sistema presenta comportamiento oscilatorio y si  $K_I < K_{I,CRIT}$  no presenta tal característica. Además, este valor crítico es mayor si aumenta  $K_P$ .

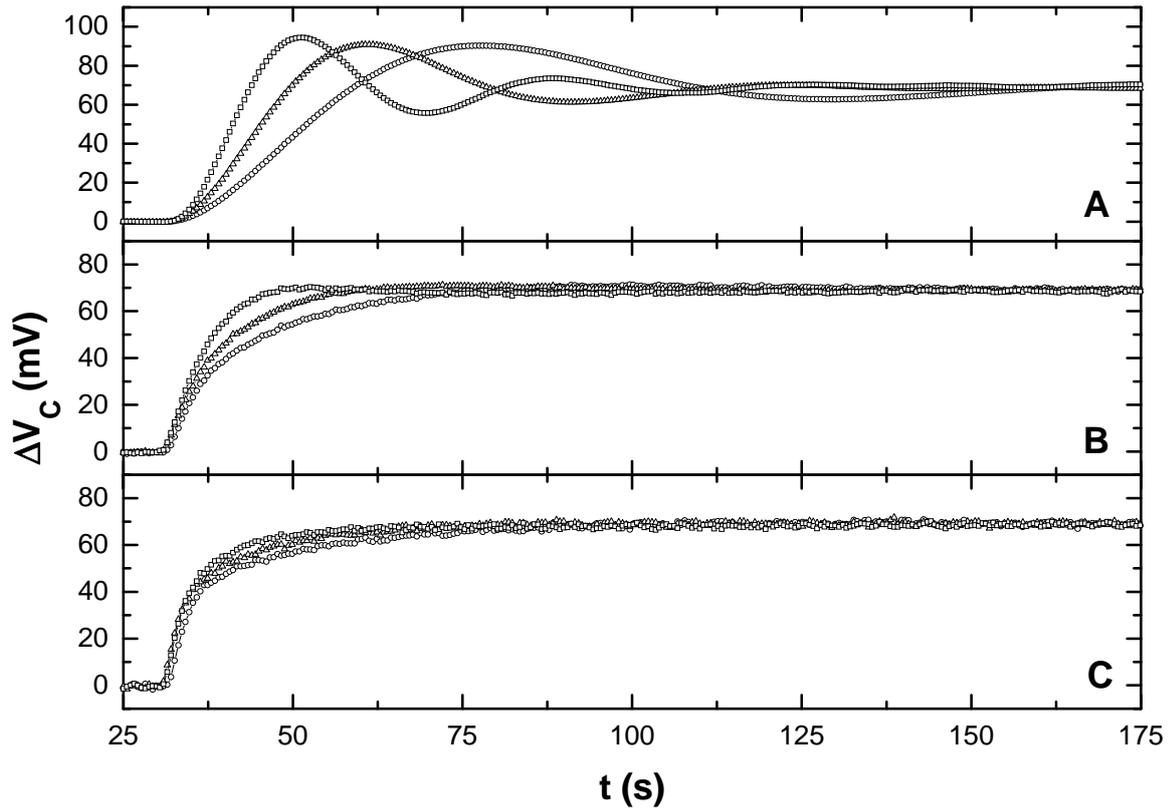


Figura 6.18. Respuestas del microcalorímetro frente a un paso de potencia.

A)  $K_P=0$ , B)  $K_P=10^{-4}$ , C)  $K_P=2 \cdot 10^{-4}$   
 (O)  $K_I=0.5 \cdot 10^{-5}$ , ( $\Delta$ )  $K_I=10^{-5}$ , ( $\square$ )  $K_I=2 \cdot 10^{-5}$

Antes se mencionó que la señal de voltaje no compensado no era adecuada para la medida con este tipo de control. No obstante, si consideramos la respuesta paso (ec. (6.60)) y evaluamos el área encerrada por la curva se obtiene el siguiente resultado:

$$Area_{NC}(\chi) = \int_0^{+\infty} \Delta V_{NC}^{\chi}(t) dt = \lim_{s \rightarrow 0} [s \Delta V_{NC}^{\chi}(s)] = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} W_0 \quad (6.73)$$

de lo que se comprueba que dicha área es proporcional a la potencia térmica constante desarrollada. Este hecho significa que podemos calibrar el dispositivo microcalorimétrico con respuestas paso utilizando la señal no compensada. La constante de calibración que relaciona la potencia térmica desarrollada y el área del termograma es  $K_{CAL}^C K_I$ .

*6.1.4.b. Efecto térmico producido sobre el conjunto célula-sensor bajo control proporcional-integral.*

Finalmente, podemos calcular las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro cuando el efecto térmico se produce en el conjunto sensor-célula, suponiendo que los tres polos son reales:

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^{\delta}(s) &= A \frac{\varepsilon}{C_{SC}} \frac{s(s+z_1)}{(s+p')(s+p'')(s+p''')} Q \\ \Delta V_{NC}^{\delta}(t) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} Q \left( \frac{(\tau' - \tau_s)}{\tau'(\tau'' - \tau')(\tau' - \tau''')} e^{-t/\tau'} \right. \\ &\quad \left. + \frac{(\tau'' - \tau_s)}{\tau''(\tau''' - \tau'')(\tau'' - \tau')} e^{-t/\tau''} + \frac{(\tau''' - \tau_s)}{\tau'''(\tau' - \tau''')(\tau''' - \tau'')} e^{-t/\tau'''} \right)\end{aligned}\quad (6.74)$$

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^{\lambda}(s) &= A \frac{\varepsilon}{C_{SC}} \frac{s(s+z_1)}{(s+p')(s+p'')(s+p''')} W_0 \frac{1}{s} \\ \Delta V_{NC}^{\lambda}(t) &= -A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} W_0 \left( \frac{(\tau' - \tau_s)}{(\tau'' - \tau')(\tau' - \tau''')} e^{-t/\tau'} \right. \\ &\quad \left. + \frac{(\tau'' - \tau_s)}{(\tau''' - \tau'')(\tau'' - \tau')} e^{-t/\tau''} + \frac{(\tau''' - \tau_s)}{(\tau' - \tau''')(\tau''' - \tau'')} e^{-t/\tau'''} \right)\end{aligned}\quad (6.75)$$

$$\begin{aligned}
\Delta V_{NC}^{\Delta}(s) &= A \frac{\varepsilon}{C_{SC}} \frac{s(s+z_1)}{(s+p')(s+p'')(s+p''')} W_0 \frac{1-e^{-s\Delta}}{s} \\
\Delta V_{NC}^{\Delta}(t) &= -A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} W_0 \left( \left( \frac{(\tau' - \tau_S)}{(\tau'' - \tau')(\tau' - \tau''')} e^{-t/\tau'} \right. \right. \\
&\quad \left. \left. + \frac{(\tau'' - \tau_S)}{(\tau''' - \tau'')(\tau'' - \tau')} e^{-t/\tau''} + \frac{(\tau''' - \tau_S)}{(\tau' - \tau'')(\tau''' - \tau'')} e^{-t/\tau'''} \right) \right. \\
&\quad \left. - \left( \frac{(\tau' - \tau_S)}{(\tau'' - \tau')(\tau' - \tau''')} e^{-(t-\Delta)/\tau'} + \frac{(\tau'' - \tau_S)}{(\tau''' - \tau'')(\tau'' - \tau')} e^{-(t-\Delta)/\tau''} \right. \right. \\
&\quad \left. \left. + \frac{(\tau''' - \tau_S)}{(\tau' - \tau'')(\tau''' - \tau'')} e^{-(t-\Delta)/\tau'''} \right) \chi(t - \Delta) \right) \quad (6.76)
\end{aligned}$$

donde se puede reconocer fácilmente que la influencia del cero  $-z_1$  sobre el comportamiento transitorio del microcalorímetro consiste en disminuir el tiempo de respuesta. Aunque las constantes de tiempo son las mismas que las correspondientes a una respuesta frente a un efecto térmico procedente de la muestra, la respuesta ahora es más rápida.

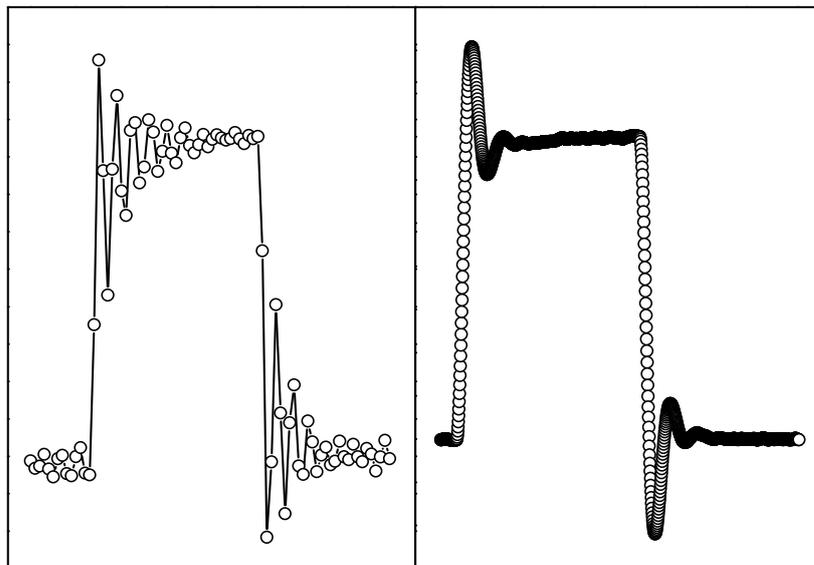
## 6.2. Sistemas de control discretos.

Las razones por las que es conveniente realizar un análisis del comportamiento del microcalorímetro tratado como sistema discreto son tres, principalmente. En primer lugar, es un sistema digital, ya que el controlador empleado en la retroalimentación es digital. Por tanto, para hacer un estudio riguroso el modelo desarrollado debe ser discreto. En segundo lugar, el hecho de ser un sistema discreto impone restricciones más severas en cuanto a los valores permitidos (sistema estable y no oscilatorio) de los parámetros de control. Esto se deriva de la existencia de un tiempo de retraso, el período de muestreo, que provoca que la actuación de la señal de compensación no sea instantánea. En último lugar, es un hecho comprobado que el sistema microcalorimétrico exhibe un comportamiento oscilatorio para valores elevados de  $K_P$  y se vuelve inestable para valores grandes de  $K_P$ ,  $K_D$  y  $K_I$ . Sin embargo, los modelos continuos no pueden dar explicación a tales comportamientos. Esto

sólo se podrá justificar acudiendo a modelos discretos.

En cuanto al comportamiento oscilatorio hay que distinguir dos tipos de regímenes. En la *Figura 6.19* se muestran dos respuestas paso del microcalorímetro bajo control proporcional (A) y bajo control proporcional integral (B). En ellas se observa un comportamiento oscilatorio del sistema, pero presentan características diferentes:

- (A) No tiene explicación según el modelo continuo.  
El período de oscilación equivale a unos pocos (en este caso 4) períodos de muestreo.
- (B) Tiene explicación según el modelo continuo.  
El período de oscilación contiene muchos períodos de muestreo.



*Figura 6.19.* Comportamiento oscilatorio del microcalorímetro bajo control proporcional (A) y bajo control proporcional-integral (B).

En vista de estos dos tipos de regímenes tan diferentes de oscilación podemos hablar de *oscilación discreta* en el primer caso y *oscilación continua* en el segundo. El primer tipo sólo encuentra justificación a partir de un desarrollo discreto del sistema, al

---

contrario que el segundo tipo, que se puede explicar con un desarrollo continuo.

De todos modos, hay que advertir que si el sistema verifica las condiciones de estabilidad y no oscilación, continuas y discretas, el comportamiento considerado como sistema continuo o discreto es el mismo, por lo que las respuestas serán prácticamente idénticas (nótese que todas las gráficas anteriores que muestran respuestas del microcalorímetro han sido obtenidas con el sistema real, que es discreto).

Todo el desarrollo se basa en la señal de voltaje no compensado,  $\Delta V_{NC}(z)$ , que es la señal que se mide. Sin embargo, se puede hacer uso de la señal compensada,  $\Delta V_C(z)$ , teniendo en cuenta la relación siguiente:

$$\Delta V_C(z) = G_C(z)\Delta V_{NC}(z) \quad (6.77)$$

### 6.2.1. Control discreto nulo.

Este primer tipo corresponde a un sistema no controlado o no retroalimentado, por lo que la función de transferencia del elemento controlador,  $G_C(z)$ , es nula y se verifican las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned} \Delta V_C(kT) &= 0 \\ \Delta V_C(z) &= 0 \\ g_c(kT) &= 0 \\ G_C(z) &= 0 \end{aligned} \quad (6.78)$$

Ahora, por las razones ya aducidas (no factoriza adecuadamente la respuesta del sistema), no podemos hablar de función de transferencia en lazo cerrado, sino de respuesta en lazo cerrado. Sin embargo, sí podremos considerar la función de transferencia en lazo

abierto,  $(2G_{2P,0}KG_{ZOH})(z)G_C(z)$ , que en este caso es nula y se puede decir que el sistema es de tipo 0.

### 6.2.1.a. Efecto térmico generado por la muestra bajo control nulo.

A partir de la ec. (4.48) calculamos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro no controlado, utilizando el método de respuesta paso invariante (véase el Capítulo 4):

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^{\delta}(z) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q_0 \left( 1 - \frac{p_2}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{p_1}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ \Delta V_{NC}^{\delta}(kT) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q_0 \left( \delta_{k,0} - \frac{\tau_1}{\tau_1 - \tau_2} \left( 1 - e^{T/\tau_1} \right) e^{-kT/\tau_1} \right. \\ &\quad \left. + \frac{\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \left( 1 - e^{T/\tau_1} \right) e^{-kT/\tau_1} \right)\end{aligned}\quad (6.79)$$

$$\begin{aligned}\Delta V_{NC}^z(z) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( \frac{T}{z-1} - \frac{p_1 + p_2}{p_1 p_2} + \frac{p_2}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{p_1}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ \Delta V_{NC}^z(kT) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( T - (\tau_1 + \tau_2 + T) \delta_{k,0} + \frac{\tau_1^2}{\tau_1 - \tau_2} \left( 1 - e^{T/\tau_1} \right) e^{-kT/\tau_1} \right. \\ &\quad \left. - \frac{\tau_2^2}{\tau_1 - \tau_2} \left( 1 - e^{T/\tau_2} \right) e^{-kT/\tau_2} \right)\end{aligned}\quad (6.80)$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} (1 - z^{-N}) W_0 \left( \frac{T}{z-1} - \frac{p_1 + p_2}{p_1 p_2} + \frac{p_2}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{p_1}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(kT) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( \left( T - (\tau_1 + \tau_2 + T) \delta_{k,0} + \frac{\tau_1^2}{\tau_1 - \tau_2} \left( 1 - e^{T/\tau_1} \right) e^{-kT/\tau_1} \right. \right.$$

$$\left. - \frac{\tau_2^2}{\tau_1 - \tau_2} \left( 1 - e^{T/\tau_2} \right) e^{-kT/\tau_2} \right)$$

$$\left. - \left( T - (\tau_1 + \tau_2 + T) \delta_{k-N,0} + \frac{\tau_1^2}{\tau_1 - \tau_2} \left( 1 - e^{T/\tau_1} \right) e^{-(k-N)T/\tau_1} \right. \right.$$

$$\left. - \frac{\tau_2^2}{\tau_1 - \tau_2} \left( 1 - e^{T/\tau_2} \right) e^{-(k-N)T/\tau_2} \right) \chi((k-N)T)$$

(6.81)

que son las respuestas básicas. Si queremos hallar la respuesta a cualquier otra entrada, el procedimiento que hay que seguir es el explicado en el Capítulo 5 y deconvolucionar con dicha señal de entrada.

La ecuación característica del sistema es el denominador de la respuesta impulso:

$$\left( z - e^{-T/\tau_1} \right) \left( z - e^{-T/\tau_2} \right) = 0 \quad (6.82)$$

estando los polos localizados dentro del círculo unidad del plano  $z$ , ya que tanto  $T$  como las constantes de tiempo,  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , tienen valores positivos. Por tanto, el sistema es estable (véase el Apéndice A1).

Si se calculan los errores en estado estacionario del sistema (ecs. (5.50) y (5.52)), se obtiene el siguiente resultado:

$$\begin{aligned} e_p(+\infty) &= 1 \\ e_V(+\infty) &= +\infty \\ e_A(+\infty) &= +\infty \end{aligned} \quad (6.83)$$

lo que confirma que el dispositivo microcalorimétrico es un sistema de *tipo 0* y presenta un error estacionario finito y constante cuando la entrada es una señal de potencia constante. Nuevamente, este hecho es el que permite establecer una correspondencia unívoca entre potencia térmica desarrollada y voltaje no compensado.

Evaluando el área correspondiente a las respuestas impulso y pulso, así como el valor límite de la respuesta paso, se obtiene la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración del microcalorímetro (ecs. (5.26) y (5.30)):

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0} = \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \quad (6.84)$$

que coincide con la constante de calibración del sistema tratado como continuo. Como en el microcalorímetro con control nulo únicamente se utiliza la señal no compensada, ya que la señal compensada es idénticamente nula, no se considerarán las restantes constantes de calibración definidas mediante las ecs. (3.5). De igual modo, es obvio que la fracción de potencia no compensada es la unidad.

Si en vez de emplear el método de respuesta paso invariante hubiésemos discretizado mediante el método de respuesta impulso invariante, el valor de la constante de calibración sería un poco distinto. Las respuestas impulso, paso y pulso serán entonces:

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}^{\delta}(z) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q_0 \frac{p_1 p_2}{p_2 - p_1} \left( \frac{z}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{z}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ \Delta V_{NC}^{\delta}(kT) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q_0 \frac{1}{\tau_1 - \tau_2} \left( e^{-kT/\tau_1} - e^{-kT/\tau_2} \right) \end{aligned} \quad (6.85)$$

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}^{\lambda}(z) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( \frac{z}{z-1} - \frac{p_2}{p_2 - p_1} \frac{z}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{p_1}{p_2 - p_1} \frac{z}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ \Delta V_{NC}^{\lambda}(kT) &= A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( 1 - \frac{\tau_1}{\tau_1 - \tau_2} e^{-kT/\tau_1} + \frac{\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} e^{-kT/\tau_2} \right) \end{aligned} \quad (6.86)$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 (1 - z^{-N}) \left( \frac{z}{z-1} - \frac{p_2}{p_2 - p_1} \frac{z}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{p_1}{p_2 - p_1} \frac{z}{z - e^{-p_2 T}} \right)$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(kT) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( \left( 1 - \frac{\tau_1}{\tau_1 - \tau_2} e^{-kT/\tau_1} + \frac{\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} e^{-kT/\tau_2} \right) \right. \quad (6.87)$$

$$\left. - \left( 1 - \frac{\tau_1}{\tau_1 - \tau_2} e^{-(k-N)T/\tau_1} + \frac{\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} e^{-(k-N)T/\tau_2} \right) \chi((k-N)T) \right)$$

donde se observa el gran parecido con las respuestas impulso, paso y pulso del sistema continuo. Si evaluamos el área de la respuesta pulso y el valor en estado estacionario de la respuesta paso se obtiene la misma constante de calibración que en el sistema continuo y también igual que la indicada en la ec. (6.84) para el sistema no controlado. Pero al evaluar el área de la respuesta impulso se obtiene la siguiente constante de calibración:

$$K_{CAL} = \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \frac{(\tau_1 - \tau_2) \left( 1 - e^{-T/\tau_1} \right) \left( 1 - e^{-T/\tau_2} \right)}{T \left( e^{-T/\tau_1} - e^{-T/\tau_2} \right)} \quad (6.88)$$

que no coincide con la del sistema continuo, apareciendo un efecto debido a la discretización. Sin embargo, recordando la ec. (5.39) se encuentra que:

$$\lim_{\substack{T \rightarrow 0 \\ T > \tau_i}} \left[ \frac{(\tau_1 - \tau_2) \left( 1 - e^{-T/\tau_1} \right) \left( 1 - e^{-T/\tau_2} \right)}{T \left( e^{-T/\tau_1} - e^{-T/\tau_2} \right)} \right] = 0 \quad (6.89)$$

y el efecto de discretización se hace despreciable cuando  $T$  es muy pequeño comparado con las constantes de tiempo del dispositivo microcalorimétrico. En el dispositivo microcalorimétrico tiene un valor de 0.99998 cuando  $K_p = 10^{-4}$ . En general, este efecto de discretización surge cuando se utiliza el método de respuesta impulso invariante. Si, como es el caso nuestro, se discretiza mediante el método de respuesta paso invariante, no aparecerá tal efecto.

*6.2.1.b. Efecto térmico producido sobre el conjunto célula-sensor bajo control nulo.*

Si ahora considerásemos que el efecto térmico se genera en el conjunto célula-sensor, todos los resultados son básicamente los mismos. Tan sólo aparece una ligera variación en las respuestas impulso, paso y pulso, representando la corrección, comentada ya anteriormente, que introduce el cero  $-z_I$ . Esta modificación consiste siempre en correcciones del tipo  $\tau_i - \tau_s$ , disminuyendo de forma efectiva el tiempo de respuesta sin cambiar el valor de las constantes de tiempo.

A partir de este momento, solamente evaluaremos las respuestas del dispositivo en el dominio de la frecuencia. No lo haremos en el dominio del tiempo discreto debido a que las expresiones discretas son más complicadas que las obtenidas para el sistema continuo y oscurecen el tratamiento. A la hora aplicar las ecuaciones de las respuestas en la caracterización del sistema microcalorimétrico emplearemos las respuestas continuas. De todos modos, la información relevante se obtiene en el dominio de la frecuencia: evaluación de áreas y valores en estado estacionario y condiciones de estabilidad.

### 6.2.2. Control discreto proporcional.

La función de transferencia del elemento controlador,  $G_C(z)$ , es una constante,  $K_P$ , que es la constante de proporcionalidad del control proporcional:

$$\begin{aligned}\Delta V_C(kT) &= K_P \Delta V_{NC}(kT) \\ \Delta V_C(z) &= K_P \Delta V_{NC}(z) \\ g_C(kT) &= K_P \delta_{k,0} \\ G_C(z) &= K_P\end{aligned}\tag{6.90}$$

y  $K_P$  es el parámetro de control ajustable cuyo valor determinará la eficacia del sistema de compensación. Si  $K_P=0$ , coincide con el control nulo.

La función de transferencia en lazo abierto,  $(2G_{2P,0}KG_{ZOH})(z)G_C(z)$ , no posee polos en  $z=1$ , por lo que el sistema es de *tipo 0*. Aunque el sistema bajo control proporcional pertenece al mismo tipo que el sistema no controlado, veremos el error en estado estacionario es menor en el sistema controlado.

### 6.2.2.a. Efecto térmico generado por la muestra bajo control proporcional.

A partir de la ec. (4.48) calculamos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro bajo control proporcional, utilizando el método de discretización de respuesta paso invariante:

$$\Delta V_{NC}^{\delta}(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q_0 \frac{1 - \frac{p_2}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{p_1}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}}}{1 + bK_P \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \quad (6.91)$$

$$\Delta V_{NC}^{\lambda}(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \frac{\frac{T}{z-1} - \frac{p_1 + p_2}{p_1 p_2} + \frac{p_2}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{p_1}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}}}{1 + bK_P \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \quad (6.92)$$

$$\Delta V_{NC}^{\Delta}(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 (1 - z^{-N}) \frac{\frac{T}{z-1} - \frac{p_1 + p_2}{p_1 p_2} + \frac{p_2}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{p_1}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}}}{1 + bK_P \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \quad (6.93)$$

La ecuación característica del sistema es el denominador de la respuesta impulso discreta:

$$1 + bK_p \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z - 1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z - 1}{z - e^{-p_2 T}} \right) = 0 \quad (6.94)$$

y reordenando esta expresión se llega a:

$$(z - e^{-p_1 T})(z - e^{-p_2 T}) + bK_p K(z - z^*) = 0 \quad (6.95)$$

donde se han realizado las siguientes identificaciones:

$$K = \frac{(z_1 - p_1)(1 + e^{-p_2 T})}{p_1(p_2 - p_1)} + \frac{(p_2 - z_1)(1 + e^{-p_1 T})}{p_2(p_2 - p_1)} - \frac{z_1(e^{-p_1 T} + e^{-p_2 T})}{p_1 p_2} \quad (6.96)$$

$$z^* = \frac{p_2(z_1 - p_1)e^{-p_2 T} + (p_2 - z_1)e^{-p_1 T} - z_1(p_2 - p_1)e^{-p_1 T}e^{-p_2 T}}{p_2(z_1 - p_1)(1 + e^{-p_2 T}) + (p_2 - z_1)(1 + e^{-p_1 T}) - z_1(p_2 - p_1)(e^{-p_1 T} + e^{-p_2 T})}$$

verificándose las siguientes relaciones:

$$K > 0 \quad (6.98)$$

$$0 < z^* < e^{-p_2 T} < e^{-p_1 T} < 1$$

por lo que la función de transferencia en lazo abierto posee un cero real,  $z^*$ , y dos polos reales,  $\exp(-p_1 T)$  y  $\exp(-p_2 T)$ , positivos y menores que la unidad, siendo el cero menor que los polos.

Como hay un parámetro arbitrario,  $K_p$ , se hará uso de los métodos de análisis de estabilidad de sistemas continuos. Aplicando el Criterio de Jury (véase el Apéndice A1), aparecen las siguientes condiciones de estabilidad:

$$\begin{aligned}
K_P &> -\frac{1}{a} \\
K_P &< \frac{1}{a} \frac{(p_2 - p_1)(1 + e^{-p_1 T})(1 + e^{-p_2 T})}{\left(2 \frac{p_1 p_2}{z_1} (e^{-p_1 T} - e^{-p_2 T}) + p_2(1 - e^{-p_2 T})(1 + e^{-p_1 T}) - p_1(1 - e^{-p_1 T})(1 + e^{-p_2 T})\right)} \\
\left| e^{-p_1 T} e^{-p_2 T} (1 + aK_P) - aK_P \frac{1}{z_1(p_2 - p_1)} (p_2(z_1 - p_1)e^{-p_2 T} + p_1(p_2 - z_1)e^{-p_1 T}) \right| &< 1 \\
\left| e^{-p_1 T} e^{-p_2 T} (1 + aK_P) - aK_P \frac{1}{z_1(p_2 - p_1)} (p_2(z_1 - p_1)e^{-p_2 T} + p_1(p_2 - z_1)e^{-p_1 T}) + 1 \right| &> \\
\left| -(1 + aK_P)(e^{-p_1 T} + e^{-p_2 T}) + aK_P \left( \frac{p_2(z_1 - p_1)}{z_1(p_2 - p_1)} (1 + e^{-p_1 T}) + \frac{p_1(p_2 - z_1)}{z_1(p_2 - p_1)} (1 + e^{-p_2 T}) \right) \right| &
\end{aligned} \tag{6.99}$$

Se observa que ahora hay un límite superior para  $K_P$  que antes, en el sistema continuo, no existía. Por tanto, el sistema se volverá inestable para valores grandes de  $K_P$ , hecho que surge en la práctica y que no se podía predecir con lo visto hasta ahora. Si llamamos  $K_{P,MAX}$  al valor máximo permitido para  $K_P$  indicado en la segunda desigualdad se puede demostrar que dicho valor es una función decreciente del período de muestreo. Esto significa que cuanto mayor sea el período de muestreo (tiempo de retraso en la trayectoria de retroalimentación) menor será el valor máximo permitido para el parámetro  $K_P$ , que modula la ganancia de retroalimentación.

Aplicando la técnica de análisis del Lugar de las Raíces a la ecuación característica (ecs. (6.94) o (6.95)) podemos estudiar la influencia del parámetro de control  $K_P$  sobre el comportamiento del microcalorímetro, ya que este método nos informa sobre de la evolución de la localización de los polos en el plano  $z$  conforme  $K_P$  varía continuamente, lo que determina la estabilidad y el comportamiento transitorio del sistema. En la *Figura 6.20* se ilustra el diagrama del Lugar de las Raíces del microcalorímetro bajo control proporcional, cuando  $K_P$  varía de forma continua entre  $0$  y  $+\infty$ :

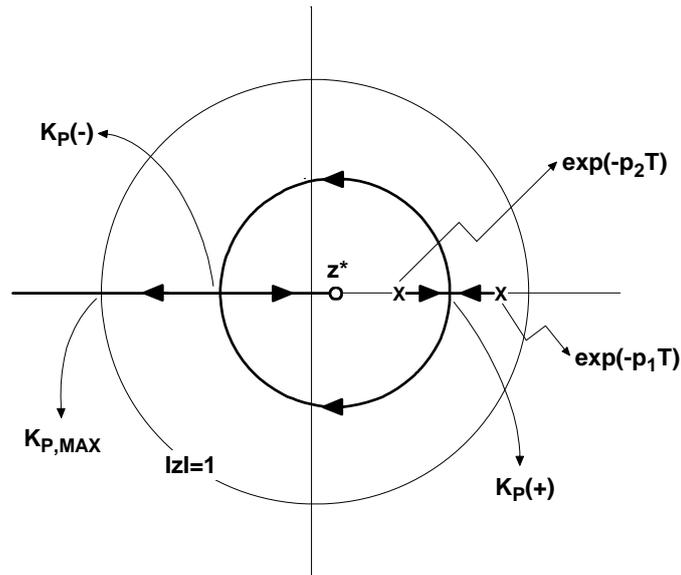


Figura 6.20. Diagrama del Lugar de las Raíces ( $K_P \geq 0$ ) con control proporcional.

donde la localización de los polos y los ceros se representa mediante los símbolos  $\times$  y  $\circ$ , respectivamente. Como se observa, cuando  $K_P=0$  los polos del sistema retroalimentado coinciden con los polos de la función de transferencia en lazo abierto y cuando  $K_P=+\infty$  los polos del sistema retroalimentado son los ceros de la función de transferencia en lazo abierto. Los puntos de ruptura del diagrama,  $K_P(\pm)$  vienen dados por:

$$K_P(\pm) = z^* \left( 1 \pm \sqrt{1 + \frac{e^{-p_1 T} e^{-p_2 T}}{z^{*2}} - \frac{e^{-p_1 T} + e^{-p_2 T}}{z^*}} \right) \quad (6.100)$$

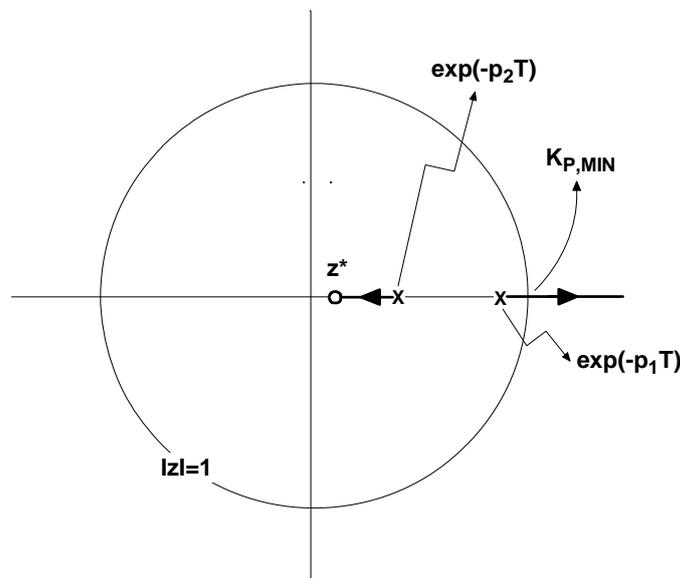
De este diagrama se obtienen los siguientes resultados:

- Para valores de  $K_P$  menores que  $K_{P,MAX}$  los polos poseen módulo menor que la unidad. Por tanto, el sistema es estable.
- Para valores de  $K_P$  menores que  $K_P(+)$  los polos son reales y positivos, por lo que el sistema no exhibe comportamiento oscilatorio.
- Para valores de  $K_P$  entre  $K_P(+)$  y  $K_P(-)$  los polos constituyen un par complejo conjugado, teniendo el microcalorímetro un comportamiento oscilatorio cuya

frecuencia es  $\omega=(\varphi_Z/2\pi)\omega_S$ , donde  $\varphi_Z$  es el argumento de los polos y  $\omega_S$  es la frecuencia de muestreo. Como ejemplo, si tenemos en cuenta la *Figura 6.19.A*, se observa que para los valores empleados de  $K_P$  y  $T$ , el período de oscilación es 4 veces mayor que el de muestreo, por lo que los polos serán conjugados y estarán situados en el eje imaginario.

- Para valores de  $K_P$  entre  $K_{P(-)}$  y  $K_{P,MAX}$  los polos son reales y negativos y el microcalorímetro se comporta de modo oscilatorio con una frecuencia igual a la mitad de la frecuencia de muestreo.
- Para valores de  $K_P$  moderados hay una disminución efectiva de las constantes de tiempo.

En la *Figura 6.21* se representa el diagrama del Lugar de las Raíces Complementario del microcalorímetro bajo control proporcional, cuando el parámetro de control  $K_P$  varía de forma continua entre 0 y  $-\infty$ :



*Figura 6.21.* Diagrama del Lugar de las Raíces Complementario ( $K_P \leq 0$ ) del microcalorímetro bajo control proporcional.

que ofrece los siguientes resultados:

- Para valores de  $K_P$  mayores que  $K_{P,MIN} = -1/a$ , los polos poseen módulo menor que la unidad, siendo el sistema estable. Si  $K_P$  disminuye por debajo de dicho valor crítico, el sistema se vuelve inestable.
- Para ningún valor de  $K_P$  negativo el sistema exhibe comportamiento oscilatorio.
- Se produce un aumento de las constantes de tiempo.

Los errores en estado estacionario del sistema son (ecs. (5.50) y (5.52)):

$$\begin{aligned}
 e_p(+\infty) &= \frac{1}{1 + aK_P} \\
 e_V(+\infty) &= +\infty \\
 e_A(+\infty) &= +\infty
 \end{aligned}
 \tag{6.101}$$

lo que confirma que el dispositivo microcalorimétrico es un sistema de *tipo 0* y presenta un error estacionario finito y constante cuando la entrada es una señal de potencia constante. Como el error de posición es finito, se puede asignar a cada valor de voltaje no compensado, medido desde la línea base, un valor de potencia térmica correspondiente. Esta es una de las formas de realizar una calibración: señal de potencia de entrada constante (paso no unitario) y medida de la deflexión en estado estacionario de la línea base (respuesta paso no unitario). Para valores suficientemente grandes de  $K_P$  el error de posición es muy pequeño. De aquí se deduce que no interesa utilizar valores demasiado grandes de la constante  $K_P$ , ya que se traduciría en que el microcalorímetro produciría una señal muy pobre (ganancia en estado estacionario pequeña) y una relación señal-ruido baja.

Evaluando el área correspondiente a las respuestas impulso y pulso, así como el valor límite de la respuesta paso, se obtiene la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración del microcalorímetro (ecs. (5.26) y (5.31)):

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0} = \frac{1 + aK_p}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \quad (6.102)$$

donde se observa que la constante de calibración es la misma que para el sistema continuo controlado proporcionalmente y depende linealmente del parámetro de control  $K_p$ . Si  $K_p=0$ , la constante de calibración coincide con la del sistema no controlado. Como la ganancia en estado estacionario es decreciente y la constante de calibración es creciente respecto de  $K_p$ , se confirma el resultado obtenido con los errores en estado estacionario: conforme  $K_p$  aumenta, la señal es menor, por lo que no es adecuado emplear valores de  $K_p$  muy elevados (véase la *Figura 6.4*).

En el microcalorímetro con control proporcional también interviene la señal compensada, por lo que podemos calcular las diferentes constantes de calibración definidas en el Capítulo 3 (ec. (3.5) y (3.6)):

$$\begin{aligned} K_{CAL}^C &= \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \frac{1 + aK_p}{K_p} \\ K_{NC} &= \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \\ K_C &= 2 \frac{\pi}{R} \end{aligned} \quad (6.103)$$

de donde se obtienen las mismas conclusiones que para el sistema continuo bajo control proporcional. Asimismo, se pueden evaluar las fracciones de potencia compensada y no compensada:

$$\eta_{NC} = \frac{1}{1 + aK_p} \quad \eta_{NC} = \frac{aK_p}{1 + aK_p} \quad (6.104)$$

observándose que  $\eta_{NC}$  coincide con el error de posición en estado estacionario.

6.2.2.b. *Efecto térmico producido sobre el conjunto célula-sensor bajo control proporcional.*

Si ahora considerásemos que el efecto térmico se genera en el conjunto célula-sensor, todos los resultados son básicamente los mismos, salvo la modificación introducida por el cero  $-z_1$ . Tan sólo cambia el comportamiento transitorio, conservándose las características estáticas o permanentes.

6.2.2.c. *Influencia de la posición de los actuadores de compensación sobre el comportamiento del microcalorímetro.*

Sería muy interesante analizar de nuevo las consecuencias derivadas del hecho de que la potencia térmica de compensación actúe directamente en la muestra (interior de la célula) y no sobre el conjunto sensor-célula, que es como realmente lo hace. En dicho supuesto, la ecuación característica es:

$$1 + aK_p \left( 1 - \frac{p_2}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_1T}} + \frac{p_1}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_2T}} \right) = 0 \quad (6.105)$$

y reordenando términos llegamos a:

$$(z - e^{-p_1T})(z - e^{-p_2T}) + aK_p K (z - z^*) = 0 \quad (6.106)$$

donde se han realizado las siguientes identificaciones:

$$K = \frac{p_1(1 - e^{-p_2T}) - p_2(1 - e^{-p_1T})}{p_2 - p_1} \quad (6.107)$$

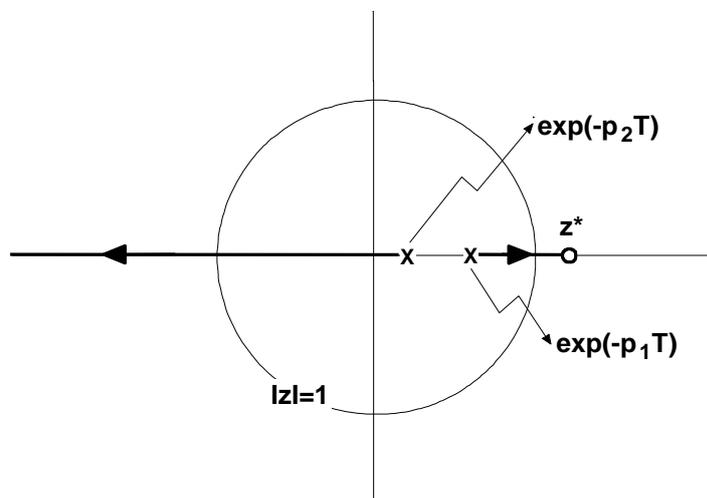
$$z^* = \frac{(p_2 - p_1)e^{-p_1T}e^{-p_2T} + p_1e^{-p_1T} - p_2e^{-p_2T}}{p_1(1 - e^{-p_2T}) - p_2(1 - e^{-p_1T})}$$

verificándose las siguientes relaciones:

$$K > 0$$

$$0 < e^{-p_2T} < e^{-p_1T} < 1 < z^*$$
(6.108)

por lo que la función de transferencia en lazo abierto posee un cero real,  $z^*$ , y dos polos reales,  $\exp(-p_1T)$  y  $\exp(-p_2T)$ , todos positivos. Los polos son menores que la unidad, pero el cero es mayor. En la *Figura 6.22* se muestra el diagrama del Lugar de las Raíces para el microcalorímetro cuando la señal de compensación actúa directamente sobre la muestra:



*Figura 6.22.A.* Diagrama del Lugar de las Raíces del microcalorímetro bajo control proporcional cuando la señal de compensación actúa sobre la muestra.

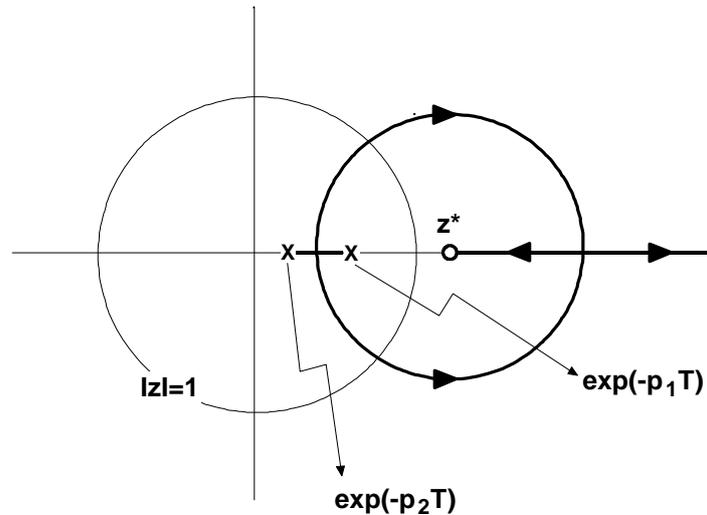


Figura 6.22.B. Diagrama del Lugar de las Raíces complementario del microcalorímetro bajo control proporcional cuando la señal de compensación actúa sobre la muestra.

y a partir de estos diagramas se deducen los siguientes resultados:

- Para valores positivos de  $K_P$  no hay una reducción efectiva de las constantes de tiempo, ya que si una sí disminuye, la otra aumenta y sobrepasa el límite de estabilidad.
- De presentar el sistema comportamiento oscilatorio con valores positivos de  $K_P$ , siempre lo hará con una frecuencia igual a la mitad de la frecuencia de muestreo.
- Cuando  $K_P$  es negativo también aumentan las constantes de tiempo y aparece comportamiento oscilatorio con distintas frecuencias antes de convertirse el microcalorímetro en un sistema inestable.

Nuevamente se demuestra que el hecho de que la potencia de compensación se genere en el conjunto sensor-célula, lejos de ser una limitación de diseño, es una estrategia de diseño muy apropiada y recomendable.

### 6.2.3. Control discreto proporcional-derivativo.

En este caso es necesario utilizar una aproximación numérica para la operación de derivación. Existe una primera forma que consiste en una ecuación de diferencias finitas:

$$f'(kT) \cong \frac{f(kT) - f((k-1)T)}{T} \quad (6.109)$$

que tiene la ventaja de su simplicidad, que se traducirá en una función de transferencia del controlador digital muy sencilla, pero el inconveniente de que aumentará el nivel de ruido. Para evitar este problema se pueden emplear, entre otras muchas, dos aproximaciones que complicarán la ecuación de transferencia del controlador, pero no alterarán el nivel de ruido original de la señal:

$$\begin{aligned} f'(kT) &\cong \frac{f(kT) + 3f((k-1)T) - 3f((k-2)T) - f((k-3)T)}{6T} \\ f'(kT) &\cong \frac{2f(kT) + f((k-1)T) - f((k-3)T) - 2f((k-4)T)}{10T} \end{aligned} \quad (6.110)$$

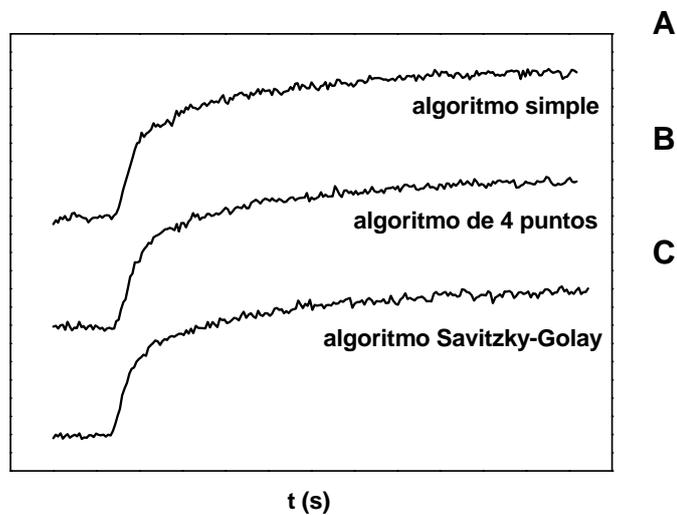
La primera de las ecs. (6.110) recibe el nombre de *algoritmo de 4 puntos* (Leigh, 1992) y la segunda corresponde a una de las versiones del *algoritmo de Savitzky-Golay* para evaluar la derivada de primer orden (Savitzky et al., 1964). La utilización de los puntos extremos en el algoritmo de Savitzky-Golay (Gorry, 1990) no introdujo mejora alguna. Si ahora añadimos el término proporcional obtenemos la función de control para cada caso considerado en el dominio discreto del tiempo:

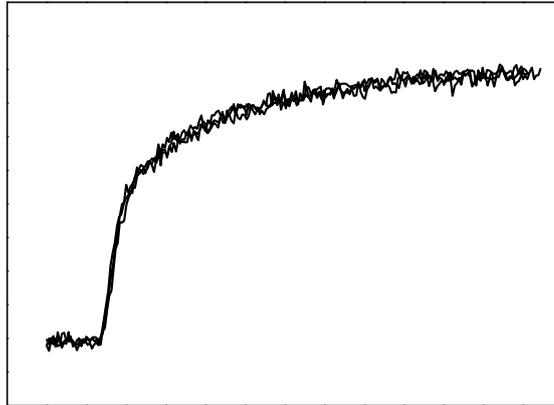
$$\begin{aligned} \Delta V_C(kT) &\cong K_P \Delta V_{NC}(kT) + \frac{K_D}{T} (\Delta V_{NC}(kT) - \Delta V_{NC}((k-1)T)) \\ \Delta V_C(kT) &\cong K_P \Delta V_{NC}(kT) + \frac{K_D}{6T} (\Delta V_{NC}(kT) + 3\Delta V_{NC}((k-1)T) - \\ &\quad - 3\Delta V_{NC}((k-2)T) - \Delta V_{NC}((k-3)T)) \\ \Delta V_C(kT) &\cong K_P \Delta V_{NC}((k-2)T) + \frac{K_D}{10T} (2\Delta V_{NC}(kT) + \Delta V_{NC}((k-1)T) - \\ &\quad - \Delta V_{NC}((k-3)T) - 2\Delta V_{NC}((k-4)T)) \end{aligned} \quad (6.111)$$

de las cuales se obtiene la función de transferencia del control digital:

$$\begin{aligned}
 G_C(z) &= K_p + \frac{K_D}{T} \frac{z-1}{z} \\
 G_C^{4ptos}(z) &= K_p + \frac{K_D}{6T} \frac{z^3 + 3z^2 - 3z - 1}{z^3} \\
 G_C^{SG}(z) &= K_p z^{-2} + \frac{K_D}{10T} \frac{2z^4 + z^3 - z - 2}{z^4}
 \end{aligned}
 \tag{6.112}$$

donde se comprueba que este tipo de control va a complicar en gran medida los cálculos. Para comprobar el efecto suavizador del algoritmo de 4 puntos y del algoritmo de Savitzky-Golay, en la *Figura 6.23* se muestra la respuesta paso del microcalorímetro bajo control proporcional-derivativo utilizando los tres métodos indicados. Se observa un débil efecto de suavizamiento cuando se emplean el algoritmo de 4 puntos y el de Savitzky-Golay, pero no de una forma determinante de modo que excluyan al algoritmo de dos puntos.





*Figura 6.23.* Respuesta paso del microcalorímetro bajo control proporcional-derivativo.  
 (A) aproximación de 2 puntos (B) aproximación de 4 puntos (C) aproximación de Savitzky-Golay.

Como en la práctica la aproximación de dos puntos de la derivada no es muy diferente de las otras aproximaciones (véase la *Figura 6.23*) y como las otras dos expresiones dan lugar a una función de transferencia bastante más compleja, vamos a considerar solamente el algoritmo de dos puntos. De todos modos, si se considerasen las otras dos aproximaciones, el tratamiento es similar al que veremos ahora.

$$\begin{aligned}\Delta V_C(kT) &= K_P \Delta V_{NC}(kT) + \frac{K_D}{T} (\Delta V_{NC}(kT) - \Delta V_{NC}((k-1)T)) \\ \Delta V_C(z) &= \left( K_P + \frac{K_D}{T} \frac{z-1}{z} \right) \Delta V_C(z)\end{aligned}\tag{6.113}$$

$$\begin{aligned}g_C(kT) &= K_P \delta_{k,0} + \frac{K_D}{T} (\delta_{k,0} - \delta_{k-1,0}) \\ G_C(z) &= K_P + \frac{K_D}{T} \frac{z-1}{z}\end{aligned}$$

donde  $K_P$  y  $K_D$  son los parámetros de control ajustables cuyos valores determinarán la eficacia del sistema de compensación. Si  $(K_D/(K_P T + K_D)) > 0$ , este controlador por retroalimentación corresponde a un compensador *por adelanto* y si  $(K_D/(K_P T + K_D)) < 0$ , corresponde a un compensador *por atraso*.

La función de transferencia en lazo abierto,  $(2G_{2P,0}KG_{ZOH})(z)G_C(z)$ , no posee polos

en  $z=1$ , por lo que el sistema es de *tipo 0*. En este aspecto coincide con el sistema bajo control proporcional y control nulo.

### 6.2.3.a. Efecto térmico generado por la muestra bajo control proporcional-derivativo.

A partir de la ec. (4.48) calculamos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro bajo control proporcional-derivativo, utilizando el método de discretización de respuesta paso invariante:

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}^{\delta}(z) = & A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q_0 \left( 1 - \frac{p_2}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{p_1}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ & \times \frac{1}{1 + b \left( K_P + \frac{K_D}{T} \frac{z-1}{z} \right) \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \end{aligned} \quad (6.114)$$

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}^{\lambda}(z) = & A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( \frac{T}{z-1} - \frac{p_1 + p_2}{p_1 p_2} + \frac{p_2}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{p_1}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ & \times \frac{1}{1 + b \left( K_P + \frac{K_D}{T} \frac{z-1}{z} \right) \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \end{aligned} \quad (6.115)$$

$$\begin{aligned} \Delta V_{NC}^{\Delta}(z) = & A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( 1 - z^{-N} \right) \left( \frac{T}{z-1} - \frac{p_1 + p_2}{p_1 p_2} + \frac{p_2}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{p_1}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ & \times \frac{1}{1 + b \left( K_P + \frac{K_D}{T} \frac{z-1}{z} \right) \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \end{aligned} \quad (6.116)$$

La ecuación característica del sistema es el denominador de la respuesta impulso discreta:

$$1 + b \left( K_P + \frac{K_D}{T} \frac{z-1}{z} \right) \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) = 0 \quad (6.117)$$

Merece la pena aplicar el Criterio de Jury, pero no es practicable la utilización del Lugar de las Raíces debido a que hay dos parámetros arbitrarios,  $K_P$  y  $K_D$ , y es complicado averiguar la localización de los los ceros de la función de transferencia en lazo abierto, ya que no se conocen los valores concretos de los demás parámetros. Como la ecuación característica es de 3<sup>er</sup> grado, el Criterio de Jury introduce 5 condiciones de estabilidad, existiendo una más que en el sistema continuo. Esto provoca que haya más restricciones en cuanto a los valores permitidos de  $K_P$  y  $K_D$ , apareciendo límites máximos y mínimos de dichos parámetros. Por otra parte, en dichas condiciones participará  $T$ , por lo que también surgirán los efectos de *competición* entre período de muestreo y parámetros de control, típicos de la discretización. Dos de las condiciones de estabilidad obtenidas mediante el Criterio de Jury son:

$$K_P > -\frac{1}{a}$$

$$K_P + 2 \frac{K_D}{T} < \frac{1}{a} (\tau_1 - \tau_2) (1 + e^{-T/\tau_1}) (1 + e^{-T/\tau_2})$$

$$\times \frac{1}{\tau_1 \tau_2 (1 - e^{-T/\tau_1}) (1 + e^{-T/\tau_2}) (1 + e^{-T/\tau_2}) - \tau_2 (1 + e^{-T/\tau_1}) (1 - e^{-T/\tau_2}) + 2 \tau_s (e^{-T/\tau_1} - e^{-T/\tau_2})} \quad (6.118)$$

Los errores en estado estacionario del sistema son (ecs. (5.50) y (5.52)):

$$e_p(+\infty) = \frac{1}{1 + aK_P}$$

$$e_v(+\infty) = +\infty$$

$$e_A(+\infty) = +\infty \quad (6.119)$$

lo que confirma que el dispositivo microcalorimétrico es un sistema de *tipo 0* y presenta un error estacionario finito y constante cuando la entrada es una señal de potencia constante.

Como el error de posición es igual que para el microcalorímetro bajo control proporcional, se tendrán en cuenta las mismas consideraciones que en su momento se hicieron.

Evaluando el área correspondiente a las respuestas impulso y pulso, así como el valor límite de la respuesta paso, se obtiene la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración del microcalorímetro (ecs. (5.26) y (5.31)):

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0} = \frac{1 + aK_P}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \quad (6.120)$$

donde se observa que la constante de calibración es independiente de  $K_D$  y es la misma que para el sistema discreto bajo control proporcional y depende linealmente del parámetro de control  $K_P$ . Si  $K_P=0$ , la constante de calibración coincide con la del sistema no controlado.

En el microcalorímetro con control proporcional-derivativo también interviene la señal compensada, por lo que podemos calcular las diferentes constantes de calibración definidas en el Capítulo 3 (ec. (3.5) y (3.6)):

$$\begin{aligned} K_{CAL}^C &= \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \frac{1 + aK_P}{K_P} \\ K_{NC} &= \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \\ K_C &= 2 \frac{\pi}{R} \end{aligned} \quad (6.121)$$

de donde se obtienen las mismas conclusiones que para el sistema discreto bajo control proporcional. Asimismo, se pueden evaluar las fracciones de potencia compensada y no compensada:

$$\eta_{NC} = \frac{1}{1 + aK_P} \quad \eta_{NC} = \frac{aK_P}{1 + aK_P} \quad (6.122)$$

---

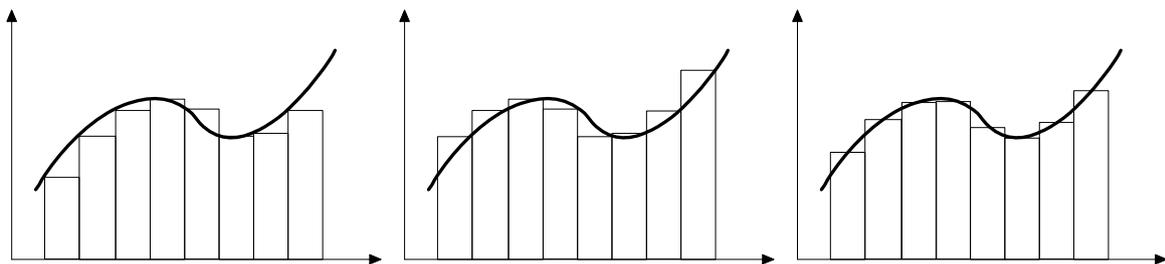
observándose que  $\eta_{NC}$  coincide de nuevo con el error de posición en estado estacionario.

*6.2.3.b. Efecto térmico producido sobre el conjunto célula-sensor bajo control proporcional-derivativo.*

Si ahora considerásemos que el efecto térmico se genera en el conjunto célula-sensor, todos los resultados son básicamente los mismos, salvo la modificación introducida por el cero  $-z_I$ . Tan sólo cambia el comportamiento transitorio debido a la aparición de factores correctivos  $\tau_i - \tau_S$

*6.2.4. Control discreto proporcional-integral.*

Ahora se debe hacer uso de una aproximación numérica para la operación de integración. Existen tres fórmulas simples estándar: aproximación *backward*, *forward* y trapezoidal (véase la *Figura 6.24*).



*Figura 6.24.* Aproximaciones numéricas simples para la operación de integración. De izquierda a derecha: *backward*, *forward* y trapezoidal.

Cada una de estas aproximaciones se corresponde con un algoritmo digital de integración:

$$\begin{aligned}
\int_0^t f(t) \Big|_{back} &\cong T \sum_{j=0}^{k-1} f(jT) \\
\int_0^t f(t) \Big|_{for} &\cong T \sum_{j=1}^k f(jT) \\
\int_0^t f(t) \Big|_{trap} &\cong \frac{T}{2} \sum_{j=0}^k (f(jT) + f((j-1)T))
\end{aligned} \tag{6.123}$$

y de cada uno de estos algoritmos deriva una función de transferencia discreta:

$$\begin{aligned}
G(z) \Big|_{back} &= T \frac{1}{z-1} \\
G(z) \Big|_{for} &= T \frac{z}{z-1} \\
G(z) \Big|_{trap} &= T \frac{z+1}{z-1}
\end{aligned} \tag{6.124}$$

Como la aproximación trapezoidal es la que mejores resultados proporciona (*Leigh, 1992*) y no hay apenas diferencia entre las funciones de transferencia, será dicha aproximación la que consideraremos de ahora en adelante. Si añadimos el término proporcional al algoritmo, obtenemos el control proporcional-integral:

$$\begin{aligned}
\Delta V_C(kT) &= K_P \Delta V_{NC}(kT) + K_I \sum_{j=1}^{j=k} T \frac{\Delta V_{NC}(jT) + \Delta V_{NC}((j-1)T)}{2} \\
\Delta V_C(z) &= \left( K_P + K_I \frac{T}{2} \frac{z+1}{z-1} \right) \Delta V_{NC}(z)
\end{aligned} \tag{6.125}$$

$$g_C(kT) = K_P \delta_{k,0} + K_I \left( \sum_{j=0}^k \delta_{j,0} + \sum_{j=0}^k \delta_{j-1,0} \right)$$

$$G_C(z) = K_P + K_I \frac{T}{2} \frac{z+1}{z-1}$$

donde  $K_P$  y  $K_I$  son los parámetros de control ajustables y que determinan la eficiencia del sistema de compensación. El algoritmo de control implementado se obtiene a partir de la

última ecuación:

$$\Delta V_C(kT) = \Delta V_C((k-1)T) + \left( \frac{K_I T}{2} + K_P \right) \Delta V_{NC}(kT) + \left( \frac{K_I T}{2} - K_P \right) \Delta V_{NC}((k-1)T) \quad (6.126)$$

Es fácil comprobar que si  $K_I > 0$  sigue siendo una condición de estabilidad en el sistema discreto, entonces este control (y también los derivados de las aproximaciones *backward* y *forward*) corresponde a un compensador en retroalimentación *por atraso*, independientemente del valor de  $K_P$ .

La función de transferencia en lazo abierto,  $(2G_{2P,0}KG_{ZOH})(z)G_C(z)$ , posee un polo en  $z=1$ , por lo que el sistema es de *tipo 1*. Por tanto, vemos que se repite el mismo esquema que en los sistemas continuos: los sistemas bajo control proporcional-integral, ya sean continuos o discretos, son de *tipo 1*; los sistemas bajo control nulo, proporcional y proporcional-integral son de *tipo 0*.

#### 6.2.4.a. Efecto térmico generado por la muestra bajo control proporcional-integral.

A partir de la ec. (4.48) calculamos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro bajo control proporcional-integral, utilizando el método de discretización de respuesta paso invariante:

$$\Delta V_{NC}^{\delta}(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} Q_0 \left( 1 - \frac{p_2}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{p_1}{p_2 - p_1} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) \times \frac{1}{1 + b \left( K_P + \frac{K_I T}{2} \frac{z+1}{z-1} \right) \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2 (p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \quad (6.127)$$

$$\Delta V_{NC}^z(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 \left( \frac{T}{z-1} - \frac{p_1 + p_2}{p_1 p_2} + \frac{p_2}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{p_1}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ \times \frac{1}{1 + b \left( K_P + \frac{K_I T}{2} \frac{z+1}{z-1} \right) \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \quad (6.128)$$

$$\Delta V_{NC}^\Delta(z) = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} W_0 (1 - z^{-N}) \left( \frac{T}{z-1} - \frac{p_1 + p_2}{p_1 p_2} + \frac{p_2}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} - \frac{p_1}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) \\ \times \frac{1}{1 + b \left( K_P + \frac{K_I T}{2} \frac{z+1}{z-1} \right) \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right)} \quad (6.129)$$

La ecuación característica del sistema es el denominador de la respuesta impulso discreta:

$$1 + b \left( K_P + \frac{K_I T}{2} \frac{z+1}{z-1} \right) \left( \frac{z_1}{p_1 p_2} - \frac{z_1 - p_1}{p_1(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_1 T}} + \frac{z_1 - p_2}{p_2(p_2 - p_1)} \frac{z-1}{z - e^{-p_2 T}} \right) = 0 \quad (6.130)$$

Igual que en la sección anterior, merece la pena aplicar el Criterio de Jury, pero no es practicable la utilización del Lugar de las Raíces debido a que hay dos parámetros arbitrarios,  $K_P$  y  $K_I$ , y es complicado averiguar la localización de ceros de la función de transferencia en lazo abierto. Como la ecuación característica es de 3<sup>er</sup> grado, el Criterio de Jury introduce 5 condiciones de estabilidad, una más que en el sistema continuo. Esto restringe mucho más los valores permitidos de  $K_P$  y  $K_I$ , apareciendo límites máximos y mínimos de dichos parámetros. Por otra parte, en dichas condiciones también participará  $T$ , por lo que también surgirán los efectos de *competición* entre período de muestreo y parámetros de control, típicos de la discretización.

$$\begin{aligned}
K_I &> 0 \\
K_P &< \frac{1}{a} \frac{(\tau_1 - \tau_2)(1 + e^{-T/\tau_1})(1 + e^{-T/\tau_2})}{\tau_1 \tau_2 (1 - e^{-T/\tau_1})(1 + e^{-T/\tau_2})(1 + e^{-T/\tau_2}) - \tau_2 (1 + e^{-T/\tau_1})(1 - e^{-T/\tau_2}) + 2\tau_s (e^{-T/\tau_1} - e^{-T/\tau_2})}
\end{aligned} \tag{6.131}$$

Los errores en estado estacionario del sistema son (ecs. (5.50) y (5.52)):

$$\begin{aligned}
e_p(+\infty) &= 0 \\
e_v(+\infty) &= \frac{1}{aK_I} \left( 1 + aK_I \left( \frac{\tau_2 - \tau_s}{\tau_1 - \tau_2} \frac{T}{1 - e^{-T/\tau_2}} - \frac{\tau_1 - \tau_s}{\tau_1 - \tau_2} \frac{T}{1 - e^{-T/\tau_1}} \right) \right) \\
e_A(+\infty) &= +\infty
\end{aligned} \tag{6.132}$$

lo que confirma que el dispositivo microcalorimétrico es un sistema de *tipo 1* y presenta un error estacionario nulo cuando la entrada es una señal de potencia constante (error de posición). Por tanto, igual que ocurría en el sistema continuo, cuando se emplea el control proporcional-integral la señal no compensada, que es la que estamos analizando, no sirve como señal de medida. Debemos buscar otra señal que contenga la información sobre la potencia constante que se desarrolle en cada instante.

Evaluando el área correspondiente a las respuestas impulso y pulso, así como el valor límite de la respuesta paso, se obtiene la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración del microcalorímetro (ecs. (5.26) y (5.31)):

$$\begin{aligned}
K_0 &= 0 \\
K_{CAL} &= +\infty
\end{aligned} \tag{6.133}$$

donde se observa que la constante de calibración diverge, ya que la ganancia en estado estacionario del sistema es nula (mismo resultado que en el sistema continuo). Esto está en relación directa con el hecho de que el error de posición es nulo. La interpretación de todo esto es que el sistema discreto consigue compensar cualquier señal de potencia constante, por lo que el error de posición es nulo. Debido a esto, cualquier valor de potencia tiene asociado un valor de voltaje no compensado nulo y a cualquier calor medido mediante la

señal no compensada le corresponde un área nula en el termograma. Por tanto, la constante de calibración diverge, no se puede emplear el método de calibración usual y la señal no compensada no sirve como señal de medida.

El problema de la no adecuación del voltaje no compensado como señal de medida se resuelve de mismo modo que se hizo anteriormente: se debe considerar el voltaje de compensación, que es la otra señal importante que interviene en el sistema. La relación existente entre ambos voltajes (6.77) permite encontrar la *respuesta* compensada para entradas impulso, paso y pulso. Si evaluamos la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración utilizando la señal compensada como señal de medida se obtiene:

$$K_{CAL}^C = 2 \frac{\pi}{R} \quad (6.135)$$

que es el mismo valor que posee en el sistema continuo. Ahora, la señal compensada presenta un valor estacionario no nulo frente a una entrada de potencia paso y un área no nula frente a una entrada pulso de calor. Por ello, se puede utilizar como señal de medida. Si evaluamos las fracciones de potencia compensada y no compensada:

$$\eta_{NC} = 0 \quad \eta_C = 1 \quad (6.134)$$

nuevamente se obtienen los valores límite de máxima eficacia (límite  $K_P \rightarrow +\infty$ ) que eran inalcanzables a través del control proporcional: toda la potencia térmica desarrollada por el efecto térmico es evacuada por el sistema e compensación. Este resultado era de esperar, ya que el valor estacionario del voltaje no compensado en respuestas paso es nulo y el área el voltaje no compensado en respuestas pulso también es nula. Ahora,  $\eta_{NC}$  también coincide con el error de posición en estado estacionario. Estos resultados sugieren que el control proporcional-integral constituye, también en el modelo discreto, el caso límite del control proporcional cuando  $K_P \rightarrow +\infty$ .

Todas las consecuencias que se dedujeron para el sistema continuo bajo control proporcional-integral se pueden aplicar también ahora, ya que todos los resultados

---

obtenidos en aquél caso coinciden totalmente con los del sistema discreto.

Si consideramos la respuesta paso (ec. (6.127)) y evaluamos el área correspondiente, se obtiene el siguiente resultado:

$$Area_{NC}(\chi) = \sum_0^{+\infty} \Delta V_{NC}^z(kT) = \lim_{z \rightarrow 1} [(1 - z^{-1}) \Delta V_{NC}^z(z)] = A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}} \frac{1}{aK_I} W_0 \quad (6.73)$$

de lo que se comprueba que dicha área es proporcional a la potencia térmica constante desarrollada y la constante de proporcionalidad es la misma que la obtenida para el sistema continuo.

#### *6.2.4.b. Efecto térmico producido sobre el conjunto célula-sensor bajo control proporcional-derivativo.*

Finalmente, si calculásemos las respuestas impulso, paso y pulso del microcalorímetro cuando el efecto térmico se produce en el conjunto sensor-célula aparecería nuevamente la influencia del cero  $-z_I$  sobre el comportamiento transitorio del microcalorímetro.

Todo el desarrollo planteado en este capítulo conduce a los tres puntos siguientes, que resumen en esencia la base sobre la que descansan las estrategias de medida en Calorimetría Isotérmica de Valoración:

- La señal de medida del sistema microcalorimétrico debe ser aquella señal para la que la función de transferencia posee ganancia en estado estacionario no nula y constante, fijados los parámetros de control del sistema. Esto significa que dicha señal presenta un valor límite en estado estacionario constante no nulo (error en

estado estacionario no nulo) para una entrada paso de potencia y un área no nula para una entrada pulso de calor. Es decir, se puede establecer una proporcionalidad entre potencia desarrollada y voltaje y entre calor generado y área.

- En el sistema no controlado (control nulo) únicamente hay una señal en el sistema. En el sistema bajo control proporcional y bajo control proporcional-derivativo existen dos señales que son totalmente equivalentes: señal no compensada y señal compensada. Se pueden emplear indistintamente como señales de medida con su correspondiente constante de calibración, ya que la función de transferencia para cada una posee una ganancia en estado estacionario no nula. En el sistema bajo control proporcional-integral estas dos señales no son equivalentes, ya que la función de transferencia para la señal no compensada posee ganancia en estado estacionario nula y la función de transferencia para la señal compensada tiene una ganancia en estado estacionario no nula. Por tanto, sólo la señal compensada resulta adecuada como señal de medida.
- Ningun sistema de los tratados posee una función de transferencia que presenta cancelación de polos y ceros. Por tanto, todos los sistemas son controlables y observables (véase el Apéndice A1).

## 7. CARACTERIZACIÓN ESTÁTICA Y DINÁMICA.

La función de transferencia del sistema microcalorimétrico gobierna el comportamiento de dicho sistema, ya que contiene las características estáticas o estacionarias (ganancia en estado estacionario) y dinámicas (constantes de tiempo) del dispositivo. A partir de ella se puede predecir la respuesta ante cualquier entrada, así como la región de estabilidad. Una caracterización exhaustiva consiste en la realización de una determinación precisa de la función de transferencia. Aunque ya se ha comentado con anterioridad, merece la pena distinguir entre caracterización estática y dinámica. La primera está relacionada con la sensibilidad estática (mínima potencia térmica detectable) y su objetivo es la determinación de la constante de calibración y la relación señal-ruido, principalmente. La segunda está relacionada con la sensibilidad dinámica (mínima cantidad de calor detectable) y trata de evaluar las constantes de tiempo. Pero en este caso, es esencial indicar que estas constantes de tiempo deben ser los *verdaderos* parámetros que están asociados a los polos y ceros de la función de transferencia, para distinguirlos de otros parámetros tales como los tiempos de vida media, tiempos de establecimiento o tiempos de subida, que son parámetros que informan cualitativamente del comportamiento transitorio del microcalorímetro, pero no sirven de forma cuantitativa para, por ejemplo, el proceso de deconvolución o corrección dinámica. También es importante tener en cuenta que las propiedades de la muestra no deben influir en la caracterización estática. Sin embargo, su efecto será notable en la caracterización dinámica. Se ha demostrado (*Tanaka, 1987*) que la constante de calibración del dispositivo microcalorimétrico es independiente de las características del dominio espacial donde se produce la reacción química y depende únicamente de la estructura geométrica y la naturaleza física del dominio donde se realiza la conducción de calor hasta el foco calorífico.

Una vez que el modelo físico-matemático ha sido definido y desarrollado, la

---

función de transferencia puede ser determinada a partir de observaciones experimentales. Esto es lo que en Teoría de Sistemas se denomina *problema de identificación del sistema*: conocidas las señales de entrada,  $x(t)$  o  $X(s)$ , y de salida del sistema,  $y(t)$  o  $Y(s)$ , se puede obtener la función de transferencia,  $G(s)$  o  $g(t)$ . Si el sistema es lineal y autónomo se verifican estas dos relaciones en el dominio del tiempo y de la frecuencia:

$$\begin{aligned}y(t) &= \int_0^t g(t-t')x(t')dt' \\ Y(s) &= G(s)X(s)\end{aligned}\tag{7.1}$$

Por otra parte, si queremos identificar  $G(s)$  a partir de  $Y(s)$  y  $X(s)$ , éstas últimas deben estar definidas y deben ser conocidas de forma muy precisa. Cualquier error cometido en la determinación de alguna de ellas se traducirá en un error en la función de transferencia. Cuando una reacción química tiene lugar en la célula microcalorimétrica es difícil especificar cómo es el proceso de mezcla de los reactivos y pueden aparecer fenómenos cinéticos, lo que hace muy difícil conocer la función que representa la evolución temporal del efecto térmico. Y aquí surge un problema básico en calorimetría. Tradicionalmente se ha considerado que los experimentos de calibración basados en reacciones químicas son los más adecuados para caracterizar el dispositivo, ya que se asemejan más a un experimento calorimétrico (en la localización de la fuente de calor y en el camino seguido por el flujo de calor hasta llegar al foco calorífico) que los experimentos de calibración eléctrica (*Dantzer, 1982; Schachinger, 1983; Wadsö, 1997b*). Sin embargo, por las razones ya comentadas, una calibración química no proporciona una buena caracterización dinámica del sistema. ¿Es posible entonces obtener una caracterización precisa del dispositivo a través de experimentos de calibración eléctricos, en los cuales sí se conoce de forma precisa la señal de entrada? Hasta ahora no había una respuesta clara a este problema. La clave para responder rigurosamente a esta pregunta es el desarrollo de un modelo realista del microcalorímetro. Esto es justamente lo que se ha llevado a cabo en esta Memoria y gracias a dicho modelo se ha demostrado que:

- El comportamiento dinámico (transitorio) del microcalorímetro a lo largo de un

experimento químico y uno eléctrico debe ser diferente.

- Las constantes de tiempo instrumentales en ambos experimentos, eléctrico y químico, son iguales.

La aparente paradoja planteada por estas dos aseveraciones la resuelve el hecho de que el modelo del sistema desarrollado predice una función de transferencia distinta para cada caso, pero con las mismas constantes de tiempo. Por tanto, la respuesta al interrogante planteado líneas atrás es afirmativa: se puede realizar una caracterización precisa del microcalorímetro a través de una serie de experimentos de calibración eléctrica. Más aún, es la única forma de llevar a cabo tal caracterización en un microcalorímetro similar al que se ha desarrollado en este trabajo de investigación (*Velázquez Campoy et al., 1998*). Incluso, como se verá más adelante, la caracterización mediante experimentos eléctricos proporciona más información que la caracterización mediante experimentos químicos.

En este capítulo nos centraremos fundamentalmente en la caracterización estática y dinámica del microcalorímetro bajo control proporcional y la caracterización estática del microcalorímetro bajo control proporcional-integral. Como las características estáticas del control proporcional-derivativo son idénticas a las del control proporcional y en la práctica no introduce mejoras dinámicas significativas (aunque teóricamente sí lo hace), no consideraremos de forma aislada tal control.

## **7.1. Determinación de la constante de calibración.**

---

La constante de calibración es una propiedad estática del sistema, directamente relacionada con la ganancia en estado estacionario, y se puede acceder a ella tanto a través de calibraciones químicas como eléctricas.

El fundamento del proceso de determinación de la constante de calibración ya se desarrolló en el Capítulo 5. Se lleva a cabo mediante dos procedimientos:

- Generación de pulsos de calor  $Q$  y medida del área,  $Area(\Delta)$ , del termograma correspondiente. Mediante regresión lineal entre  $Q$  y  $Area(\Delta)$  se obtiene la constante de calibración como constante de proporcionalidad (pendiente de la recta de ajuste).
- Generación de pasos de potencia  $W_0$  y medida del valor de la señal calorimétrica en estado estacionario,  $y(+\infty; \chi)$ . Mediante regresión lineal entre  $W_0$  y  $y(+\infty; \chi)$  se obtiene la constante de calibración como constante de proporcionalidad.

Es fácil comprobar que para este propósito no es necesario conocer de forma precisa la señal de entrada, sino tan sólo saber con exactitud la cantidad total de calor generada y no se requiere el conocimiento de la evolución temporal de la potencia térmica producida en el efecto térmico empleado como patrón.

### *7.1.1. Experimentos de calibración eléctrica.*

En esta serie de experimentos se hace pasar una intensidad de corriente definida por la resistencia de calibración ( $161.94 \Omega$ ) consistente en un hilo delgado de elevada resistencia que está enrollado sobre la pared exterior de la célula de medida. De esta forma se genera sobre el conjunto sensor-célula una potencia Joule proporcional al cuadrado de dicha intensidad. Se empleó una fuente de corriente programable

(KEITHLEY 220 PROGRAMMABLE CURRENT SOURCE) con la que de forma automatizada se controla la intensidad y el tiempo de actuación de ésta.

Como se dijo anteriormente, se puede llevar a cabo una determinación dinámica (mediante pulsos de calor) o estática (mediante pasos de potencia) de la constante de calibración. Aunque la primera se asemeja más a un experimento real de evaluación del calor de reacción, la segunda permite obtener la constante de calibración con mayor precisión, ya que no hay que calcular áreas, sino valores medios a lo largo de un período de tiempo y las medidas en estado estacionario, en general, se ven afectadas de menos errores. Por tanto, se adoptará como método la determinación estática.

Se ha determinado la constante de calibración del dispositivo microcalorimétrico operando bajo control nulo (sin compensación), control proporcional y control proporcional integral. En estos últimos se establecieron distintos regímenes de compensación empleando diferentes valores de los parámetros de control,  $K_P$  y  $K_I$ .

Un ejemplo de calibración eléctrica utilizando pasos de potencia constante se mostró anteriormente en la Sección 3.3 (*Figura 3.7*). En la *Figura 7.1* se muestran las regresiones lineales a partir de las que se evaluó la constante de calibración,  $K_{CAL}$ , con el método eléctrico para el microcalorímetro bajo control proporcional y en la *Tabla 7.1* se indican los valores obtenidos. Se observa que la constante de calibración es creciente respecto al parámetro  $K_P$ .

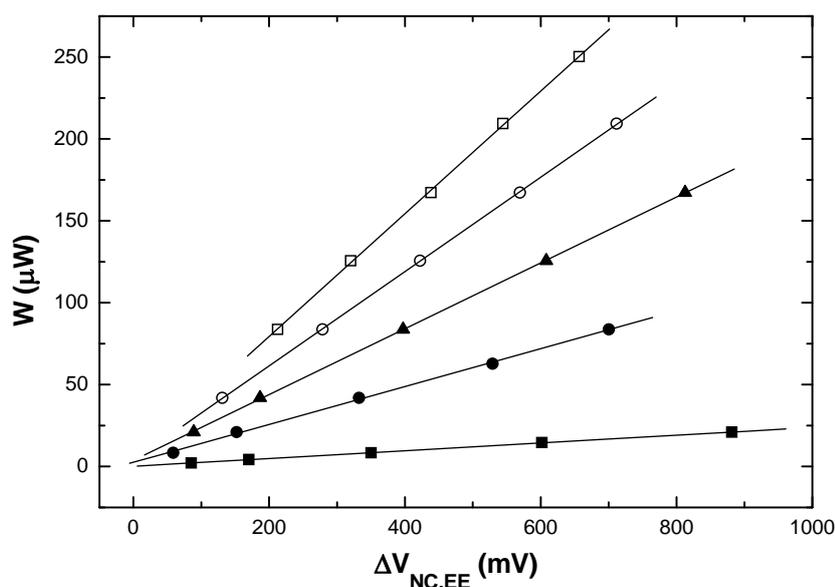


Figura 7.1. Regresión lineal entre potencia constante desarrollada,  $W$ , y valor de voltaje no compensado en estado estacionario,  $\Delta V_{NC,EE}$ .

(■)  $K_P=0$ , (●)  $K_P=5 \cdot 10^{-5}$ , (▲)  $K_P=10 \cdot 10^{-5}$ , (○)  $K_P=15 \cdot 10^{-5}$ , (□)  $K_P=20 \cdot 10^{-5}$

Tabla 7.1. Valores de la constante de calibración  $K_{CAL}$  bajo control proporcional.

| $K_P$              | $K_{CAL} (\mu W/mV)$ |
|--------------------|----------------------|
| 0                  | $0.0240 \pm 0.0003$  |
| $5 \cdot 10^{-5}$  | $0.121 \pm 0.002$    |
| $10 \cdot 10^{-5}$ | $0.207 \pm 0.002$    |
| $15 \cdot 10^{-5}$ | $0.295 \pm 0.002$    |
| $20 \cdot 10^{-5}$ | $0.384 \pm 0.002$    |

En la *Tabla 7.2* se indican los valores de  $K_{CAL}^C$  para el microcalorímetro bajo control proporcional y bajo control proporcional-integral. Se observa como la constante de calibración en el control proporcional es decreciente respecto al parámetro  $K_P$  y es mayor que la constante de calibración en el control proporcional-integral, que toma un valor constante independiente de  $K_P$  y  $K_I$  (aunque este último parámetro de control no se ha indicado de forma expresa, se utilizaron diferentes valores de  $K_I$ ).

Tabla 7.2. Valores de la constante de calibración  $K_{CAL}^C$  del microcalorímetro bajo control

proporcional (P) y bajo control proporcional-integral (PI).

| $K_P$              | $K_{CAL}^C$ ( $\mu\text{W}/\mu\text{V}$ )<br>(control P) | $K_{CAL}^C$ ( $\mu\text{W}/\mu\text{V}$ )<br>(control PI) |
|--------------------|--|---|
| 0                  | -  | $1.725 \pm 0.005$   |
| $5 \cdot 10^{-5}$  | $2.420 \pm 0.04$   | $1.725 \pm 0.005$   |
| $10 \cdot 10^{-5}$ | $2.070 \pm 0.02$   | $1.720 \pm 0.005$   |
| $15 \cdot 10^{-5}$ | $1.965 \pm 0.015$  | $1.720 \pm 0.005$   |
| $20 \cdot 10^{-5}$ | $1.920 \pm 0.01$   | $1.720 \pm 0.005$   |

Otras características estáticas del dispositivo que hay que determinar son el nivel de ruido de la señal de medida y la relación señal-ruido. En la *Tabla 7.3* se indican los valores de los niveles de ruido de las diferentes señales cuando el microcalorímetro trabaja bajo control proporcional y proporcional-integral. Se observa un ligero efecto suavizador del algoritmo integral. Se ha tomado como valor del nivel de ruido la desviación típica de la señal durante un período de 60 segundos.

*Tabla 7.3.* Niveles de ruido de las señales en el microcalorímetro bajo control proporcional y bajo control proporcional-integral.

NC señal no compensada, C señal compensada

| $K_P$              | ruido <sub>NC</sub> (mV)<br>(control P) | ruido <sub>C</sub> ( $\mu\text{V}$ )<br>(control P) | ruido <sub>C</sub> ( $\mu\text{V}$ )<br>(control PI) | ruido ( $\mu\text{W}$ )<br>(control P) | ruido ( $\mu\text{W}$ )<br>(control PI) |
|--------------------|---|---|--|--|---|
| 0                  | 6.1                                     | -   | 0.12   | 0.15                                   | 0.21                                    |
| $5 \cdot 10^{-5}$  | 6.3                                     | 0.32  | 0.28   | 0.76                                   | 0.48                                    |
| $10 \cdot 10^{-5}$ | 7.0                                     | 0.70  | 0.60   | 1.45                                   | 1.03                                    |
| $15 \cdot 10^{-5}$ | 7.1                                     | 1.08  | 0.98   | 2.09                                   | 1.69                                    |
| $20 \cdot 10^{-5}$ | 7.3                                     | 1.48  | 1.36   | 2.80                                   | 2.34                                    |

En la *Tabla 7.4* se muestran los valores de la relación señal-ruido para el sistema microcalorimétrico operando bajo control proporcional y proporcional-integral. Se ha utilizado una señal estándar de  $50 \mu\text{W}$  de potencia constante para su evaluación y la relación señal-ruido se calcula como el cociente entre el promedio y la desviación típica de la señal durante un período de 60 segundos.

*Tabla 7.4.* Relación señal-ruido de la señal del microcalorímetro bajo control proporcional y bajo control proporcional-integral.

| $K_P$              | SNR <sub>50μW</sub><br>(control P) | SNR <sub>50μW</sub><br>(control PI) |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 0                  | 341.6                              | 230.1                               |
| $5 \cdot 10^{-5}$  | 65.6                               | 103.5                               |
| $10 \cdot 10^{-5}$ | 34.5                               | 48.5                                |
| $15 \cdot 10^{-5}$ | 23.8                               | 29.7                                |
| $20 \cdot 10^{-5}$ | 17.8                               | 21.5                                |

### 7.1.2. Experimentos de calibración química.

Aunque teóricamente las constantes de calibración determinadas eléctricamente y químicamente deben coincidir y el método eléctrico es más aconsejable que el químico porque se ve afectado de menos errores (fundamentalmente, imprecisiones en las concentraciones de reactivos), es necesario llevar a cabo una determinación química de la constante de calibración para comprobar la posible existencia de errores sistemáticos en el procedimiento de medida de calores de reacción (*Wadsö, 1997b*).

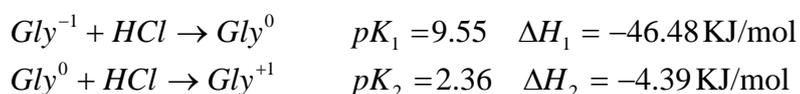
Esta calibración se suele llevar a cabo mediante pulsos de calor generados químicamente. Para ello se acude a reacciones químicas de las que se conoce con suficiente precisión la entalpía de reacción. Principalmente, éstas pertenecen a dos tipos (*Barthel, 1975*): reacciones de dilución (ej. sacarosa y KCl), y reacciones de ácido-base (ej. trishidroximetilaminometano THAM y diversos aminoácidos). De este modo se dispone de reacciones con valores de entalpía muy diferentes, lo que nos permite realizar el proceso de calibración determinando calores de reacción que están dentro del intervalo de medida correspondiente a las aplicaciones del microcalorímetro.

En nuestro caso se han empleado dos reacciones ácido-base: neutralización de NaOH y protonación de la forma neutra de la Glicina mediante adición de HCl.



Poseen dos valores de entalpía (*Christensen et al., 1976b*) que difieren en un orden de magnitud, de modo que para medir calores pequeños no hay que recurrir a concentraciones de reactivos o volúmenes de inyección excesivamente pequeños. En el primer caso realmente se mide el calor de formación de agua, ya que es una neutralización de una base fuerte con un ácido fuerte, y en el segundo caso se evalúa el calor de protonación de la forma neutra zwitteriónica de la Glicina que pasa al estado con una carga positiva. Como reactivo valorante se ha utilizado siempre HCl (disoluciones a partir de HCl FLUKA 1M) y los reactivos valorados fueron NaOH (CARLO ERBA) y Glicina (SIGMA). Debido a que en el procedimiento de calibración no se debe llegar al punto de equivalencia, las valoraciones siempre se realizaron la base en exceso.

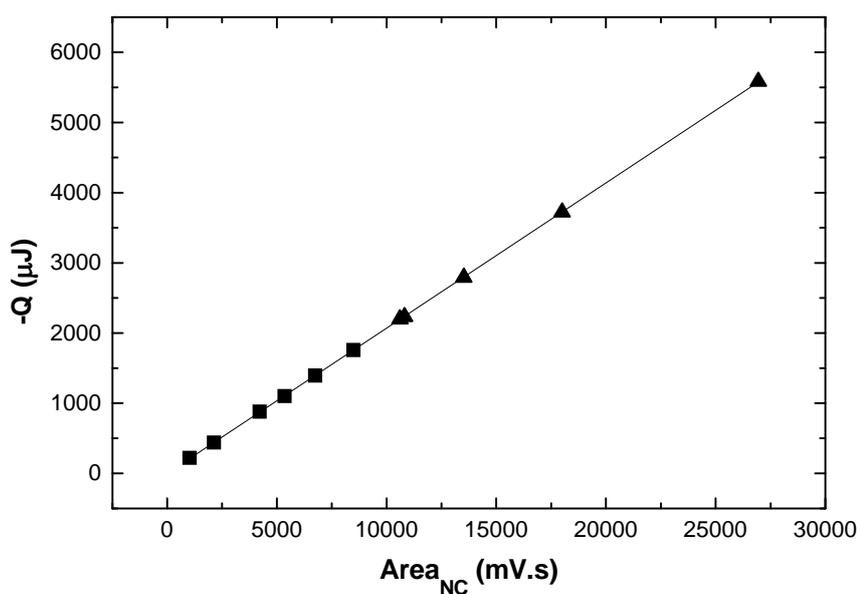
En los experimentos con Glicina hay que tener la precaución de establecer las condiciones iniciales del experimento de forma apropiada. Dado que esta molécula presenta tres estados iónicos distintos, hay dos reacciones posibles correspondientes a la protonación del grupo carboxilo  $-COO^-$  y la protonación del grupo amino  $-NH_2$ , respectivamente (*Christensen et al., 1976b*):



La reacción que se utilizó es la segunda, que posee una entalpía un orden de magnitud menor que la entalpía de la primera. La diferencia entre los valores de  $pK$  correspondiente es grande, lo que nos permite separar ambas reacciones y evitar el posible error de interferencia mutua; para ello hay que fijar el  $pH$  inicial del experimento en un valor cercano a 6. De este modo, la especie iónica predominante es la molécula neutra de Glicina y cualquier adición de ácido provoca la conversión de dicha especie en la forma cargada positivamente.

El método de operación seguido en los experimentos de calibración química es el indicado en la Sección 3.6. Como la determinación química de la constante de calibración es en realidad una comprobación de la inexistencia de posibles errores sistemáticos, sólo se ha llevado a cabo en un caso concreto: control de compensación proporcional con  $K_p=10^{-4}$ .

Éste es justamente el valor óptimo encontrado para  $K_P$  y utilizado en la práctica. En la *Figura 7.2* se muestra el resultado de los experimentos de calibración química. El valor de la constante de calibración  $K_{CAL}$ , pendiente de la recta de regresión lineal, es de  $0.208 \pm 0.002 \mu\text{W/mV}$ , prácticamente igual al que se obtiene a través de la calibración eléctrica. Esto indica que no hay errores sistemáticos en la evaluación de calores de reacción (errores en la inyección de reactivos y pérdidas de calor).



*Figura 7.2.* Calibración química realizada mediante las reacciones de (♦) neutralización de NaOH y de (■) protonación de Glicina.  
 $T=25^\circ\text{C}$ , Control Proporcional  $K_P=10^{-4}$ .

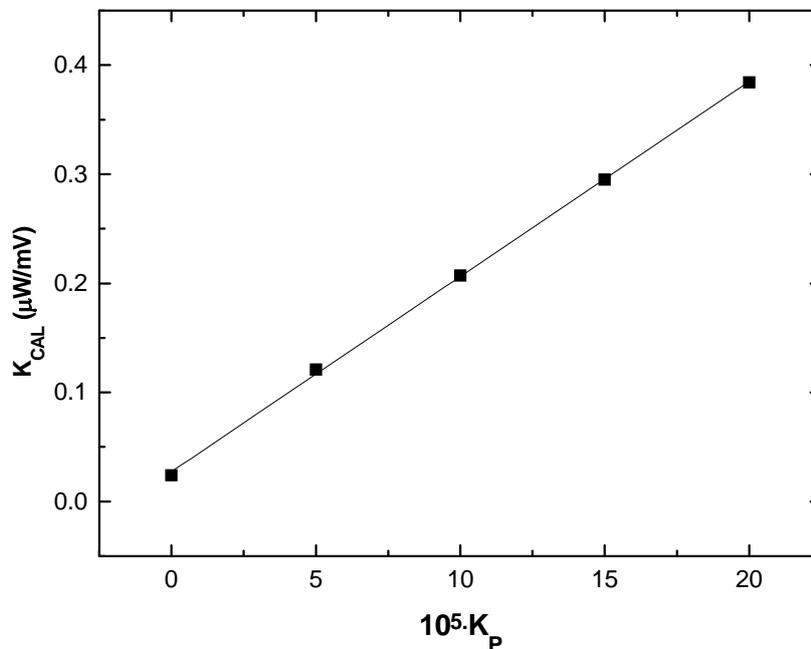
## 7.2. Dependencia de la constante de calibración respecto de los parámetros de control y la temperatura.

Una vez determinadas las constantes de calibración, vamos a hacer uso de los

resultados obtenidos en el Capítulo 6 para comprobar las predicciones. En las ecs. (6.47) y (6.102) se indica la dependencia de la constante de calibración  $K_{CAL}$  en el control proporcional respecto del parámetro de control  $K_P$ :

$$K_{CAL} = \frac{1 + aK_P}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} = \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} + 2 \frac{\pi}{R} K_P \quad (7.2)$$

y si se representan los valores de  $K_{CAL}$  en función de los valores de  $K_P$  (véase la *Figura 7.3*) se observa una buena correlación lineal, lo que confirma dicho comportamiento.



*Figura 7.3.* Dependencia de la constante de calibración  $K_{CAL}$  respecto del parámetro de control  $K_P$  ( $T=25^\circ\text{C}$ ).

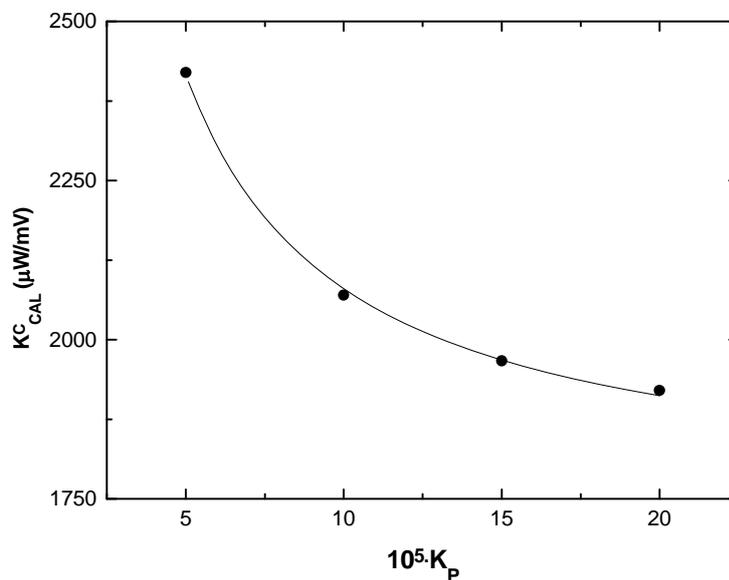
La pendiente y la ordenada en el origen de la recta de regresión lineal son justamente las constantes de calibración  $K_C$  y  $K_{NC}$ , cuyos valores son  $1.79 \pm 0.03 \mu\text{W}/\mu\text{V}$  y  $0.027 \pm 0.003 \mu\text{W}/\text{mV}$  respectivamente, siendo dichos valores cercanos a los obtenidos directamente sin recurrir al ajuste lineal presentado aquí ( $1.720 \pm 0.005 \mu\text{W}/\mu\text{V}$  y

0.0240±0.0003 μW/mV).

Según las ecs. (6.71) y (6.133) la constante  $K_{CAL}^C$  en el control proporcional-integral debe ser constante independiente de los parámetros de control  $K_P$  y  $K_I$ , y debe ser igual a la constante de calibración  $K_C$  del control proporcional, que es lo observado experimentalmente. Además, la constante de calibración  $K_{CAL}^C$  en el control proporcional debe ser decreciente respecto de  $K_P$  (ecs. (6.49) y (6.103)) y tener un límite, cuando  $K_P$  tiende a  $+\infty$ , igual a  $K_C$  en los controles proporcional y proporcional-integral o igual a  $K_{CAL}^C$  en el control proporcional-integral.

$$K_{CAL} = \frac{1}{A \frac{\varepsilon}{\alpha_{SC}}} \frac{1 + aK_P}{K_P} \quad (7.3)$$

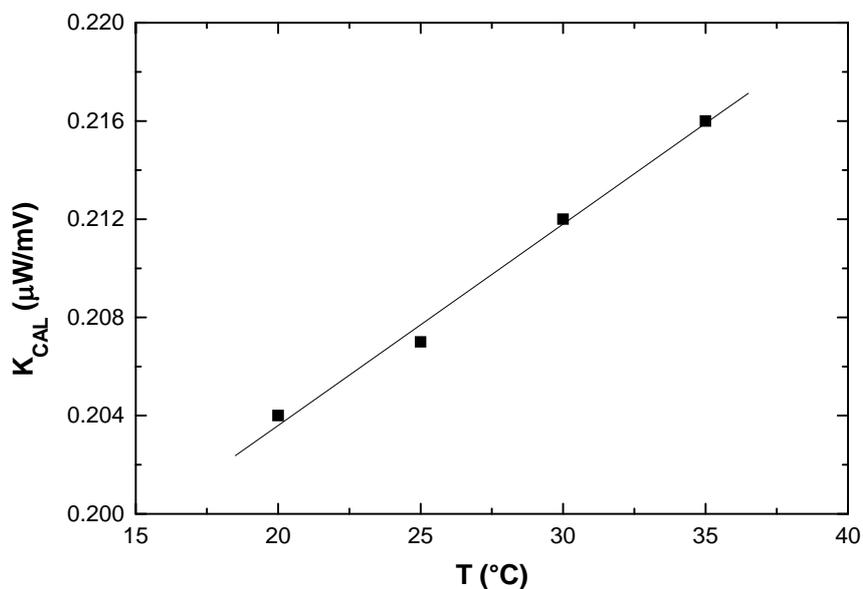
Si representamos los valores de  $K_{CAL}^C$  en función de los valores de  $K_P$  (véase la *Figura 7.4*) y realizamos un ajuste no lineal de los datos se obtiene un valor límite de  $1.74 \pm 0.01 \mu\text{W}/\mu\text{V}$ , muy cercano al valor esperado.



*Figura 7.4.* Dependencia de la constante de calibración  $K_{CAL}^C$  respecto de  $K_P$  ( $T=25^\circ\text{C}$ ).

Finalmente, se llevó a cabo la determinación de de la constante de calibración a

diferentes temperaturas de operación para comprobar la influencia de éste parámetro sobre el comportamiento del microcalorímetro. En la *Figura 7.5* se muestra la dependencia de dicha constante respecto de la temperatura y en la *Tabla 7.5* se indican los valores correspondientes.



*Figura 7.5.* Dependencia de la constante de calibración  $K_{CAL}$  respecto de la temperatura ( $K_P=10^{-4}$ ).

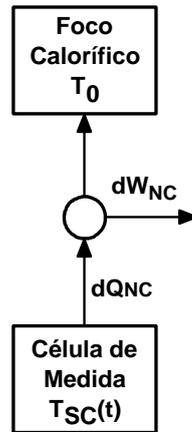
*Tabla 7.5.* Valores de  $K_{CAL}$  en función de la temperatura de operación del microcalorímetro.

| T (°C) | $K_{CAL}$ ( $\mu\text{W}/\text{mV}$ ) |
|--------|---------------------------------------|
| 20     | $0.204 \pm 0.002$                     |
| 25     | $0.207 \pm 0.002$                     |
| 30     | $0.2012 \pm 0.002$                    |
| 35     | $0.216 \pm 0.002$                     |

Se observa una relación prácticamente lineal entre la constante de calibración y la temperatura. El hecho de que  $K_{CAL}$  sea función creciente de  $T$  se puede justificar mediante los datos proporcionados por el fabricante (*Melcor, 1985*), donde se indica que el rendimiento de las termopilas como elementos refrigeradores aumenta con la temperatura de operación. Sin embargo, es más ilustrativo realizar un sencillo análisis termodinámico

básico de los elementos Peltier considerados como máquinas térmicas. En esta discusión se considerará que son máquinas reversibles, aunque no sea exacto, y que, sin pérdida de generalización, se produce un efecto térmico exotérmico en la célula de medida.

La termopilas de los sensores de temperatura de la célula de medida actúan como un motor térmico que, operando entre dos focos térmicos, célula y foco calorífico, producen trabajo eléctrico (véase la *Figura 7.6*).



*Figura 7.6.* Esquema de funcionamiento de las termopilas de medida como motor térmico.

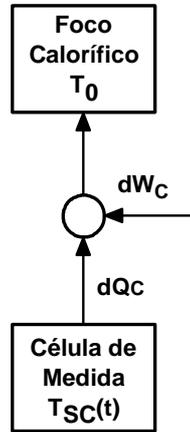
Considerando un funcionamiento según procesos reversibles se puede expresar el trabajo eléctrico producido,  $dW_{NC}$ , en función del calor generado por el efecto térmico y eliminado de la célula de medida,  $dQ_{NC}$ :

$$dW_{NC} = \left(1 - \frac{T_0}{T_{SC}(t)}\right) dQ_{NC} = \frac{\Delta T_{SC}(t)}{T_0 + \Delta T_{SC}(t)} dQ_{NC} \quad (7.4)$$

donde  $T_0$  es la temperatura del foco calorífico,  $T_{SC}(t)$  es la temperatura de la célula de medida y  $\Delta T_{SC}(t)$  es la diferencia entre éstas. Por tanto, el rendimiento de las termopilas empleadas como sensores de temperatura disminuye conforme aumenta la temperatura  $T_0$ , que es la temperatura de operación del microcalorímetro. Esto significa que, para un mismo calor producido en la célula, la señal generada es más pequeña.

La termopilas de compensación de la célula de medida actúan como una máquina

frigorífica que, operando entre dos focos térmicos, célula y foco calorífico, transfieren calor desde la célula hasta el foco calorífico consumiendo trabajo eléctrico (véase la *Figura 7.7*).



*Figura 7.7.* Esquema de funcionamiento de las termopilas de compensación en la célula de medida como máquina frigorífica.

Considerando nuevamente un funcionamiento según procesos reversibles se puede expresar el calor eliminado de la célula de medida,  $dQ_C$ , en función del trabajo consumido,  $dW_C$ :

$$dQ_C = \frac{1}{1 - \frac{T_0}{T_{SC}(t)}} dW_C = \frac{T_0 + \Delta T_{SC}(t)}{\Delta T_{SC}(t)} dW_C \quad (7.5)$$

de donde se deduce que el rendimiento de las termopilas empleadas en la compensación en la célula de medida aumenta conforme aumenta la temperatura  $T_0$ . Por tanto, la eficiencia del sistema de compensación también aumenta.

La termopilas de compensación de la célula de referencia actúan como una bomba térmica que, operando entre dos focos térmicos, célula y foco calorífico, transfieren calor desde el foco calorífico hasta la célula consumiendo trabajo eléctrico (véase la *Figura 7.8*).

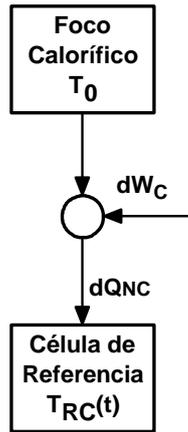


Figura 7.8. Esquema de funcionamiento de las termopilas de compensación en la célula de referencia como bomba de calor.

Considerando también un funcionamiento según procesos reversibles se puede expresar el calor transferido hasta la célula de referencia,  $dQ_C$ , en función del trabajo consumido,  $dW_C$ :

$$dQ_C = \frac{1}{1 - \frac{T_0}{T_{RC}(t)}} dW_C = \frac{T_0 + \Delta T_{RC}(t)}{\Delta T_{RC}(t)} dW_C \quad (7.6)$$

donde  $T_{RC}(t)$  es la temperatura de la célula de referencia. De la ec. (7.6) se deduce que el rendimiento de las termopilas empleadas en la compensación en la célula de medida también aumenta conforme aumenta la temperatura  $T_0$ . Esto también colabora en el aumento de la eficiencia del sistema de compensación.

De todo esto se deduce que un aumento de la temperatura provoca una disminución en la ganancia en estado estacionario y un aumento de la eficiencia del sistema de compensación. Estos dos hechos tienen como consecuencia directa un aumento de la constante de calibración. También se puede considerar que ésta es una situación equivalente a que  $K_P$  tome un valor efectivo mayor que el utilizado y, por tanto, la constante de calibración aumente.

### 7.3. Determinación de las constantes de tiempo.

La forma genérica de la función de transferencia de un sistema lineal autónomo causal es la siguiente:

$$G(s) = K \frac{\prod_{i=1}^m (s + z_i)}{\prod_{i=1}^n (s + p_i)} = K_0 \frac{\prod_{i=1}^m (1 + \tau_i^* s)}{\prod_{i=1}^n (1 + \tau_i s)} \quad n > m \quad (7.7)$$

$$K_{CAL} = \frac{1}{K_0}$$

Obtenida ya la ganancia en estado estacionario y la constante de calibración, para completar la caracterización queda la determinación de las constantes de tiempo. En nuestro caso  $n=2$  y  $m=1$  cuando el efecto térmico se genera en el conjunto sensor-célula y  $m=0$  cuando se genera en la muestra. Según lo discutido anteriormente, la caracterización dinámica debe realizarse mediante experimentos de calibración eléctricos. Por tanto, la función de transferencia que habrá que considerar será:

$$G_E(s) = \frac{1}{K_{CAL}} \frac{(1 + \tau_s s)}{(1 + \tau_- s)(1 + \tau_+ s)} \quad (7.8)$$

El procedimiento que se debe seguir consiste en generar un efecto térmico determinado, registrar la respuesta experimental del microcalorímetro y comparar con la respuesta predicha teóricamente mediante la función de transferencia. Hay dos señales de entrada estándar que podemos emplear: paso de potencia y pulso de calor. Aunque el impulso de calor es muy utilizado en el tratamiento teórico de modelos, no es una señal físicamente realizable y, como consecuencia, no se puede usar en la práctica. El método aplicado en este trabajo para la determinación de las constantes de tiempo consiste en (*Dubes et al., 1984*):

- 
1. Generación eléctrica de un pulso de calor con potencia constante  $W_0$  y anchura  $\Delta$  (ec. (5.10)).
  2. Registro de la respuesta experimental del microcalorímetro.
  3. Regresión no lineal de los datos experimentales empleando la respuesta teórica del microcalorímetro (ec. (6.53)) y estimación de los parámetros de ajuste  $\tau_{\pm}$  y  $\tau_S$ .

El ajuste no lineal se realiza en el dominio del tiempo para evitar los problemas de procesamiento de datos que pueden surgir cuando se utilizan señales muestreadas en el dominio de la frecuencia (*Oppenheim et al., 1975*). Además, no hace falta aplicar ningún tratamiento de datos adicional, sino un simple ajuste. Aunque el dispositivo microcalorimétrico es un sistema discreto, en la determinación de las constantes de tiempo se considera como continuo. Esto es debido a que el comportamiento es similar en ambos casos (mientras el sistema esté en la región de estabilidad y no oscilación) y la respuesta del sistema es totalmente equivalente (idéntica, si se utiliza el método de discretización de respuesta impulso invariante, o un poco más complicada, si se utiliza el método de discretización de respuesta paso invariante).

Existe una gran variedad de métodos de caracterización e identificación desarrollados para su aplicación en microcalorimetría (*Randzio, 1978; Schöborn, 1983; Ortín et al., 1983; Ortín et al., 1984b; Cesari et al., 1984; Gaillard, 1985; Rey, 1985a; Rey, 1989; López Mayorga et al., 1987; Rodríguez de Rivera et al., 1989; Löblich, 1994a; Löblich, 1994b*), pero se ha considerado que el que se ha empleado en este trabajo es más rápido, proporciona más información y está afectado de un menor número de fuentes de error que la mayoría de los existentes en la bibliografía. Además, trabaja directamente con los datos experimentales en el dominio del tiempo y no requiere tratamiento de datos.

En la *Figura 7.9* se muestra una respuesta pulso del microcalorímetro y el ajuste de los datos experimentales. Se observa un acuerdo excelente entre el comportamiento real y el predicho con ayuda del modelo.

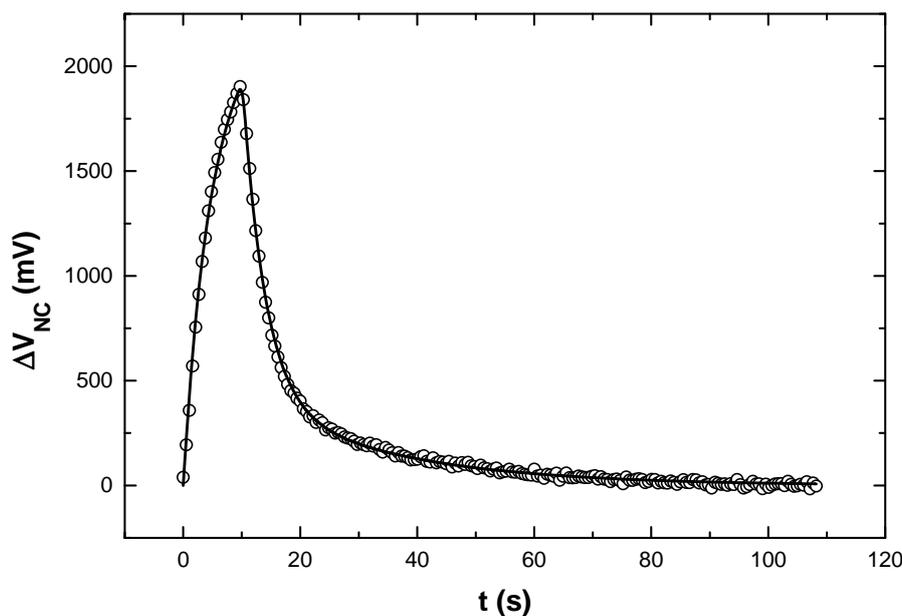
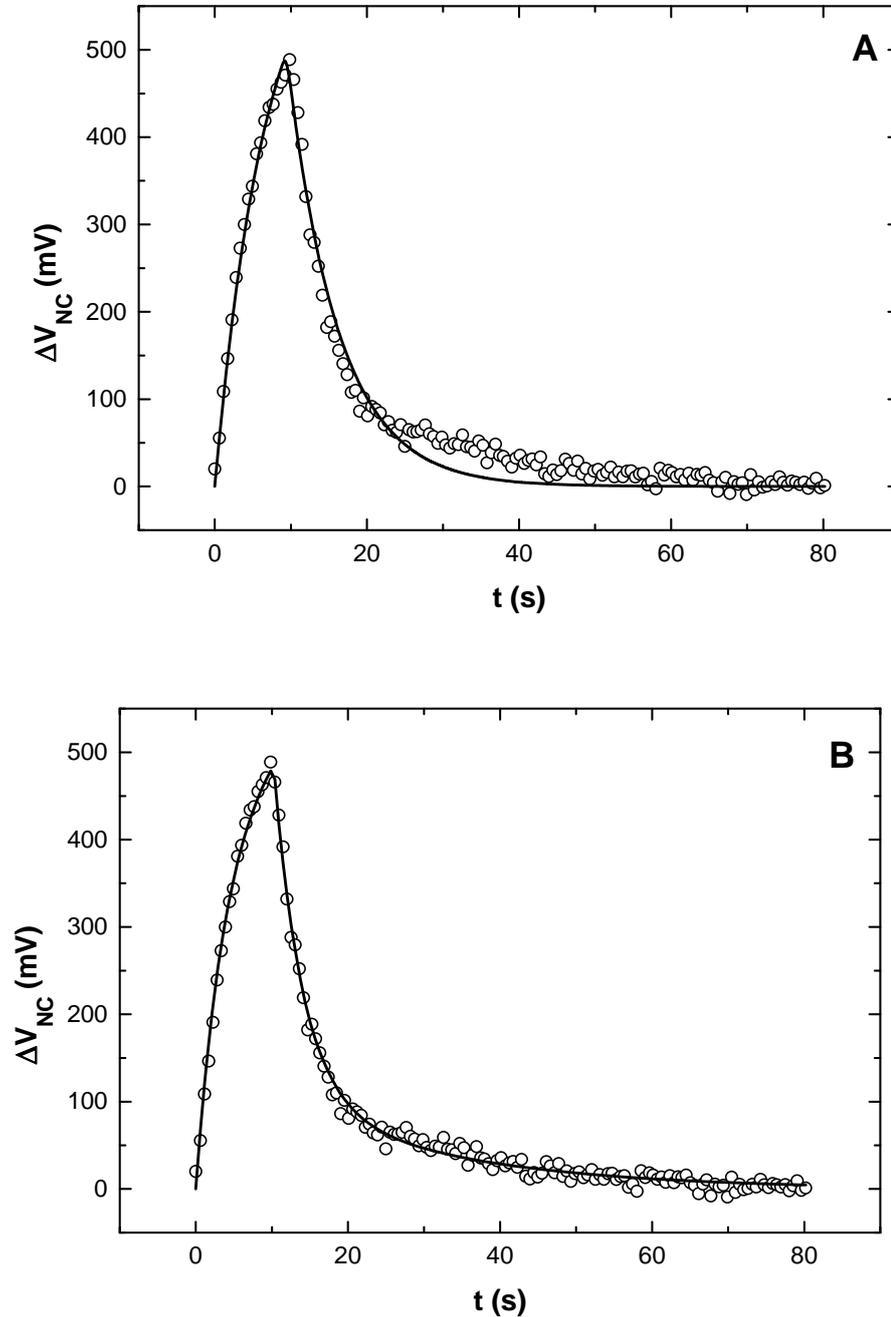


Figura 7.9. Ajuste no lineal de la respuesta del microcalorímetro ( $K_P=10^{-4}$ ) a un pulso de potencia de 10 s de duración.

Es importante señalar que el problema planteado anteriormente sobre la posible incorrección de una caracterización del dispositivo mediante experimentos de calibración eléctricos sería debido a la utilización de un modelo incorrecto del microcalorímetro. El modelo más simple supone que el instrumento se comporta como una sucesión de elementos de retraso caracterizados por las correspondientes constantes de tiempo. Esta concepción simple no considera las diferentes localizaciones posibles del efecto térmico ni los distintos caminos seguidos por el flujo de calor; la función de transferencia correspondiente únicamente contiene polos, no posee ceros. Es decir, para un efecto térmico generado en el elemento sensor-célula se considera una función de transferencia igual que para un efecto térmico generado en la muestra, siendo el comportamiento observado distinto en ambas situaciones. El resultado de todo esto es que cuando se intenta realizar una caracterización eléctrica del microcalorímetro se produce una subestimación de las constantes de tiempo. En la *Figura 7.10* se muestra el resultado de utilizar la función de transferencia incorrecta. Cuando la respuesta a un pulso generado eléctricamente se intenta ajustar mediante la función de transferencia correspondiente a un efecto térmico generado en la muestra se obtiene un ajuste que claramente no es significativo ( $\chi^2_{(145,0.05)}$  es 177 (Pollard, 1977)) y que produce valores de las constantes de tiempo mucho menores

que los verdaderos (véase la *Tabla 7.6*) . Se comprueba como la introducción del cero en la función de transferencia permite reproducir de forma satisfactoria la respuesta del microcalorímetro.



*Figura 7.10.* Respuestas del microcalorímetro ( $K_P=10^{-4}$ ) a un pulso de potencia de 10 s de duración y ajustes no lineales utilizando la función de transferencia que no contiene ningún cero (A) y utilizando la función de transferencia que contiene un cero (B). Número de datos: 149.

Tabla 7.6. Valores de las constantes de tiempo obtenidos mediante ajuste con la función de transferencia que no contiene ningún cero y con la que contiene un cero ( $K_p=10^{-4}$ ).

|              | 2 Polos y 1 Cero | 2 Polos       |
|--------------|------------------|---------------|
| $\tau_-$ (s) | $26 \pm 1$       | $6.7 \pm 0.2$ |
| $\tau_+$ (s) | $3.7 \pm 0.1$    | $0.0 \pm 0.1$ |
| $\tau_S$ (s) | $16 \pm 1$       | -             |
| $\chi^2$     | 69               | 365           |

Una posible solución para este problema consiste en considerar que la respuesta paso del microcalorímetro se puede expresar de la siguiente forma general (Gaillard, 1985):

$$\Delta V_{NC}^{\chi}(t) = \frac{1}{K_{CAL}} \left( 1 + A_2 e^{-t/\tau_1} + A_3 e^{-t/\tau_2} \right) \quad (7.9)$$

donde incluso se pueden considerar términos adicionales que contengan diferentes constantes de tiempo y realizar con esta ecuación el ajuste no lineal de la respuesta del microcalorímetro a un paso de potencia. Sin embargo, esto presenta importantes desventajas:

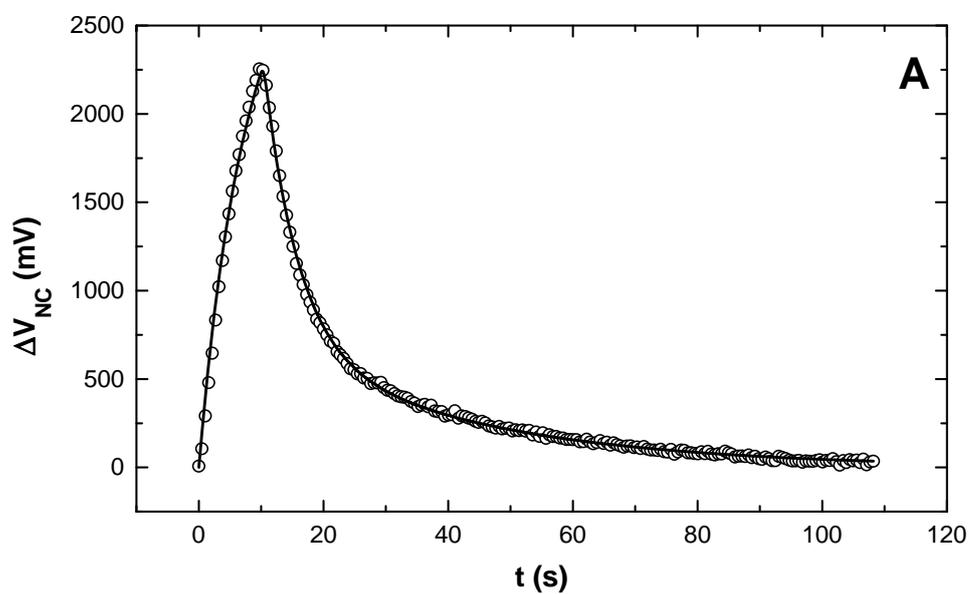
- Introduce un parámetro de ajuste más en el tratamiento.
- No se conoce el significado de los parámetros  $A_i$ .
- No aporta una base que permita demostrar que las constantes de tiempo en un experimento de calibración eléctrica y en un experimento químico son iguales.

Hay que recordar que las constantes de tiempo determinadas deben ser verdaderas constantes de tiempo y no meros parámetros indicativos tales como el tiempo de subida o el tiempo de establecimiento. De este modo, permiten una mejor descripción del dispositivo y se pueden utilizar en los métodos de deconvolución o corrección dinámica.

---

#### 7.4. Dependencia de las constantes de tiempo respecto de los parámetros de control.

En la *Figura 7.11* se muestran dos respuestas pulso del microcalorímetro y los ajustes correspondientes para diferentes valores de  $K_P$ . El comportamiento y los valores de las constantes de tiempo en función de  $K_P$ , es decir, de la eficiencia de compensación, se indican en la *Figura 7.12* y en la *Tabla 7.7*. Se puede observar una adecuación excelente del modelo físico-matemático como representación del sistema microcalorimétrico real.



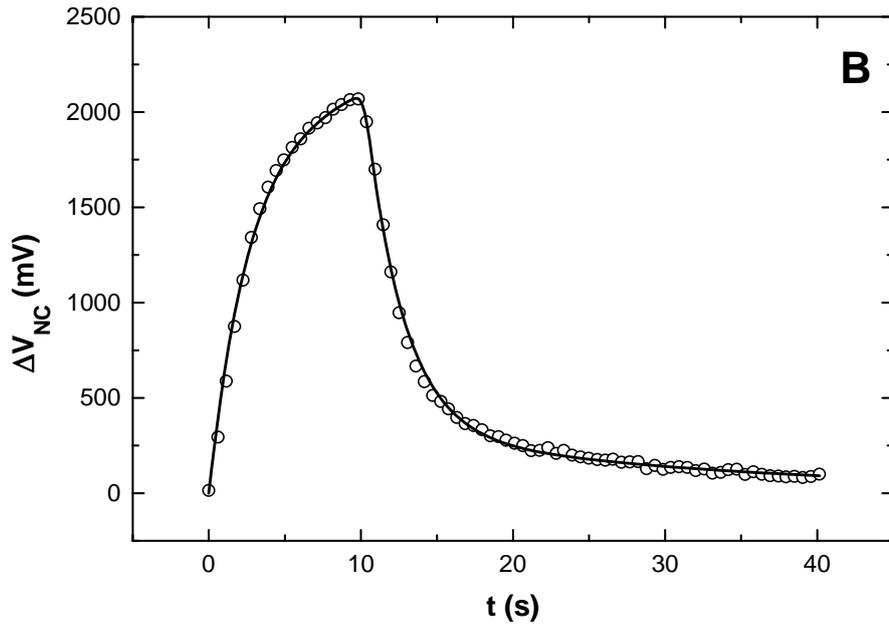


Figura 7.11. Respuesta experimental del microcalorímetro a un pulso de potencia de 10 s de duración y ajustes no lineales mediante la (ec. 6.53).

(A)  $K_p=5 \cdot 10^{-4}$ , (B)  $K_p=20 \cdot 10^{-4}$

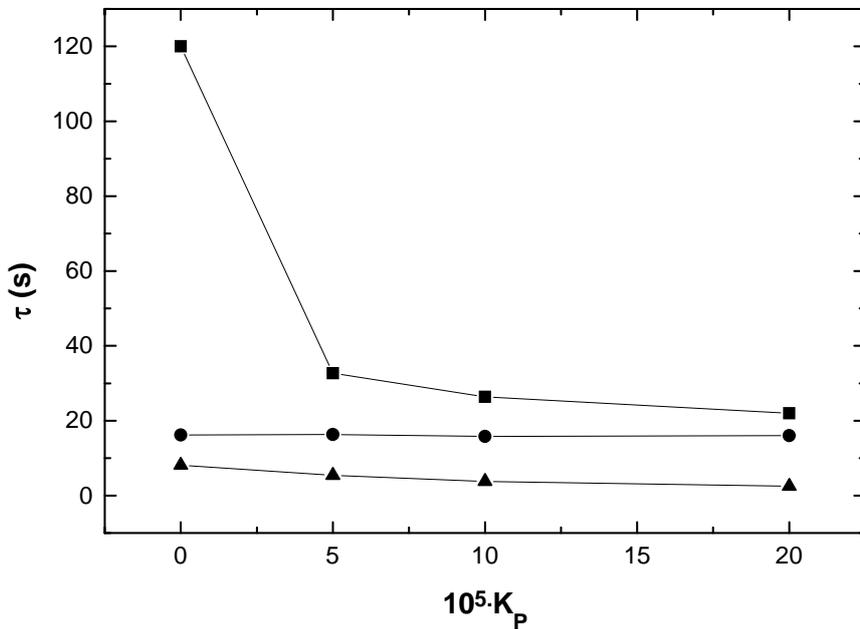


Figura 7.12. Comportamiento de las constantes de tiempo en función de la eficacia del sistema de compensación.

(■)  $\tau_-$ , (●)  $\tau_s$ , (▲)  $\tau_+$

Tabla 7.7. Valores estimados de las constantes de tiempo del microcalorímetro.

|              | $K_P=0$        | $K_P=5 \cdot 10^{-4}$ | $K_P=10 \cdot 10^{-4}$ | $K_P=20 \cdot 10^{-4}$ |
|--------------|----------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| $\tau_-$ (s) | $120 \pm 1$    | $32.7 \pm 0.6$        | $26.4 \pm 0.5$         | $22 \pm 1$             |
| $\tau_+$ (s) | $8.1 \pm 0.3$  | $5.4 \pm 0.1$         | $3.8 \pm 0.1$          | $2.5 \pm 0.1$          |
| $\tau_S$ (s) | $16.2 \pm 0.6$ | $16.3 \pm 0.4$        | $15.8 \pm 0.5$         | $16 \pm 1$             |

Además, se confirma la predicción de que las constantes de tiempo  $\tau_-$  y  $\tau_+$  son funciones decrecientes respecto del parámetro  $K_P$ . Por otra parte, el valor del cero,  $-z_1$ , o de su constante de tiempo asociada,  $\tau_S$ , mantiene un valor constante para todos los ajustes. Con un modelo del microcalorímetro de elementos no interactuantes el resultado que se obtendría sería bastante diferente: una constante de tiempo no variaría y otra decrecería con el aumento de  $K_P$ , que no es lo observado. Sólo queda puntualizar que la caracterización mediante experimentos de calibración eléctrica del microcalorímetro permite obtener de forma directa más información, ya que se se puede evaluar de forma explícita el tiempo de relajación térmica del elemento muestra,  $\tau_S$ .

En la ec. (6.26) se establece que el producto de las constantes de tiempo por la constante de calibración debe mantenerse invariante independientemente del valor que asignemos a  $K_P$ , es decir, de la eficacia del sistema de compensación. En la *Tabla 7.8* se presentan los valores de tal producto y se observa que es prácticamente constante.

Tabla 7.8. Valores del producto  $\tau_+ \tau_- K_{CAL}$  en función del parámetro  $K_P$ .

| $K_P$              | $\tau_+ \tau_- K_{CAL}$ ( $s^2 \mu W/mV$ ) |
|--------------------|--|
| 0                  | $23 \pm 1$                                 |
| $5 \cdot 10^{-5}$  | $21 \pm 1$                                 |
| $10 \cdot 10^{-5}$ | $21 \pm 1$                                 |
| $20 \cdot 10^{-5}$ | $21 \pm 2$                                 |

A partir de todos los resultados que proporciona la caracterización del dispositivo microcalorimétrico se pueden evaluar todos los parámetros instrumentales del dispositivo microcalorimétrico. En la *Tabla 7.9* se indican los valores de los siguientes parámetros: los

coeficientes Peltier y Seebeck de una unión simple semiconductor de las termopilas empleadas como sensores de temperatura y actuadores de compensación de potencia,  $\pi_1$  y  $\varepsilon_1$ ; del parámetro adimensional del microcalorímetro,  $a$ ; de los coeficientes de transferencia de calor,  $\alpha_S$  y  $\alpha_{SC}$ ; de las capacidades caloríficas de los elementos muestra y sensor-célula,  $C_S$  y  $C_{SC}$ ; y de los tiempos de relajación térmica de los elementos muestra y sensor-célula,  $\tau_S$  y  $\tau_{SC}$ . Todos estos valores corresponden a una temperatura de 25°C.

*Tabla 7.9.* Parámetros instrumentales del microcalorímetro (25°C).

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| $\pi_1$         | 120 ± 4 mV    |
| $\varepsilon_1$ | 400 ± 10 μV/K |
| $a$             | 66000         |
| $\alpha_S$      | 1.31 W/K      |
| $\alpha_{SC}$   | 0.58 W/K      |
| $C_S$           | 20.9 J/K      |
| $C_{SC}$        | 35.0 J/K      |
| $\tau_S$        | 16 s          |
| $\tau_{SC}$     | 61 s          |

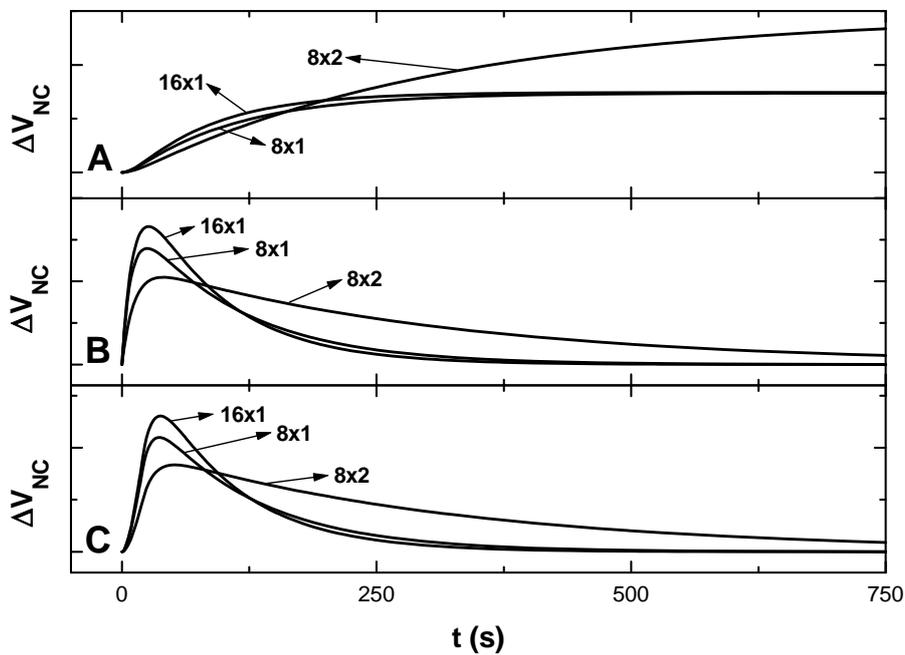
Hay que destacar que en la bibliografía se indican valores de 120 mV y 400 μV/K (20°C) para los coeficientes Peltier y Seebeck de una unión semiconductor de las mismas características que la empleada en este dispositivo.

Con ayuda de estos resultados numéricos se puede analizar la influencia de la organización de las termopilas de medida sobre el funcionamiento del dispositivo. Tal como se indicó en la descripción del dispositivo, en cada célula se utilizan 8 termopilas de medida que se disponen térmicamente en paralelo. Dos posibles modificaciones son la disposición térmicamente en serie y la utilización de mayor número de termopilas. Teniendo en cuenta la ecuación característica del microcalorímetro bajo control proporcional (ec. (6.32)), la expresión de la ganancia en estado estacionario (ec. (6.25)) los valores de los parámetros de la *Tabla 7.9* y las ecuaciones elementales sobre transferencia de calor por conducción, se pueden evaluar las constantes de tiempo y la ganancia en

estado estacionario del microcalorímetro según el número y la organización espacial de las termopilas. Se comprueba que:

- La asociación en serie prácticamente aumenta al doble la ganancia en estado estacionario, por lo que la relación señal-ruido se mejora. Sin embargo, las constantes de tiempo aumentan tanto que el comportamiento transitorio se empeora. Aumenta la sensibilidad estática, pero se reduce drásticamente la sensibilidad dinámica (véase la *Figura 7.13* y la *Tabla 7.10*).
- La adición de más termopilas como sensores de medida no altera la ganancia en estado estacionario, pero reduce las constantes de tiempo. De este modo sí se mejora la respuesta del dispositivo y aumenta la sensibilidad dinámica (véase la *Figura 7.13* y la *Tabla 7.10*).

Sin embargo, estas diferencias se reducen en cuanto la eficacia del sistema de compensación es suficientemente elevada (véase la *Tabla 7.10*).



*Figura 7.13.* Efecto de la disposición y número de las termopilas de medida sobre la respuesta paso (sensibilidad estática) y la respuesta pulso (sensibilidad dinámica) del microcalorímetro bajo control nulo.

(A) respuesta paso, (B) respuesta impulso, (C) respuesta pulso

*Tabla 7.10.* Influencia de la disposición y número de las termopilas de medida sobre las constantes de tiempo y la ganancia en estado estacionario del microcalorímetro.

8×1: 8 termopilas en paralelo; 16×1: 16 termopilas en paralelo; 8×2: 16 termopilas en serie dos a dos.

| $K_P$     | Disposición | $\tau_.$ (s) | $\tau_+$ (s) | $K_0$ (V/W) | $K_{CAL}$ ( $\mu$ W/mV) |
|-----------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------------------|
| 0         | 8×1         | 104          | 9            | 37369       | 0.0267                  |
|           | 16×1        | 81           | 11           | 37704       | 0.0265                  |
|           | 8×2         | 304          | 12           | 73387       | 0.0136                  |
| $10^{-4}$ | 8×1         | 23           | 6            | 4860        | 0.206                   |
|           | 16×1        | 20           | 6            | 4860        | 0.206                   |
|           | 8×2         | 28           | 9            | 5190        | 0.193                   |

### 7.5. Índices de eficiencia de compensación.

Para finalizar la caracterización vamos a determinar los índices de eficiencia del sistema de compensación del microcalorimétrico: fracción de potencia compensada y fracción de potencia no compensada. En el Capítulo 6 se comprobó que la fracción no compensada coincide con el error de posición en estado estacionario. En la *Figura 7.14* se muestra la evolución de las fracciones compensada y no compensada en función del valor del parámetro de control  $K_P$  y en la *Tabla 7.11* se indican los valores concretos de estos índices.

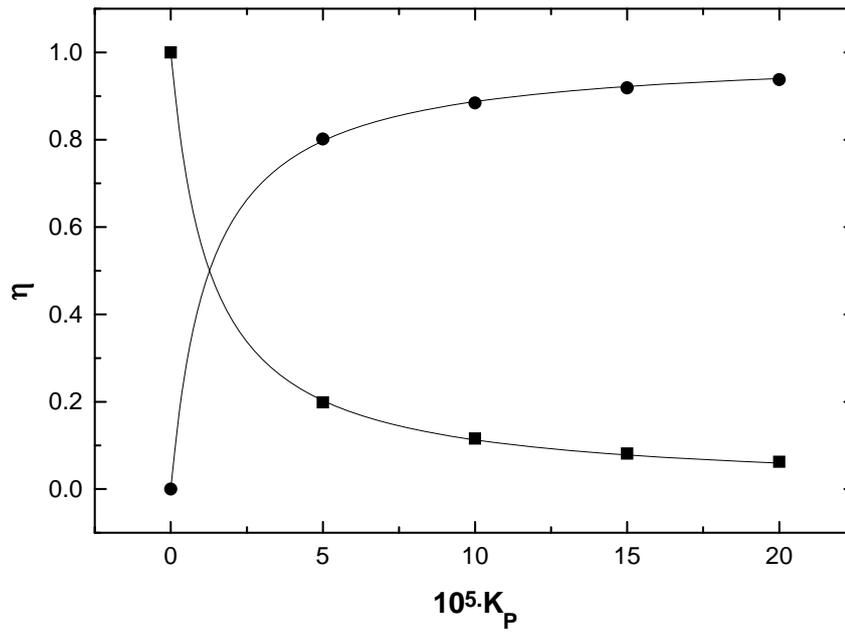


Figura 7.14. Fracciones de potencia compensada y no compensada del microcalorímetro bajo control proporcional en función del parámetro  $K_P$ .

(■)  $\eta_{NC}$ , (●)  $\eta_C$

Tabla 7.11. Valores de las fracciones de potencia compensada y no compensada del microcalorímetro bajo control proporcional.

| $K_P$              | $\eta_{NC}$     | $\eta_C$        |
|--------------------|-----------------|-----------------|
| 0                  | 1               | 0               |
| $5 \cdot 10^{-5}$  | $0.20 \pm 0.02$ | $0.80 \pm 0.02$ |
| $10 \cdot 10^{-5}$ | $0.12 \pm 0.02$ | $0.88 \pm 0.02$ |
| $15 \cdot 10^{-5}$ | $0.08 \pm 0.02$ | $0.92 \pm 0.02$ |
| $20 \cdot 10^{-5}$ | $0.06 \pm 0.02$ | $0.94 \pm 0.02$ |

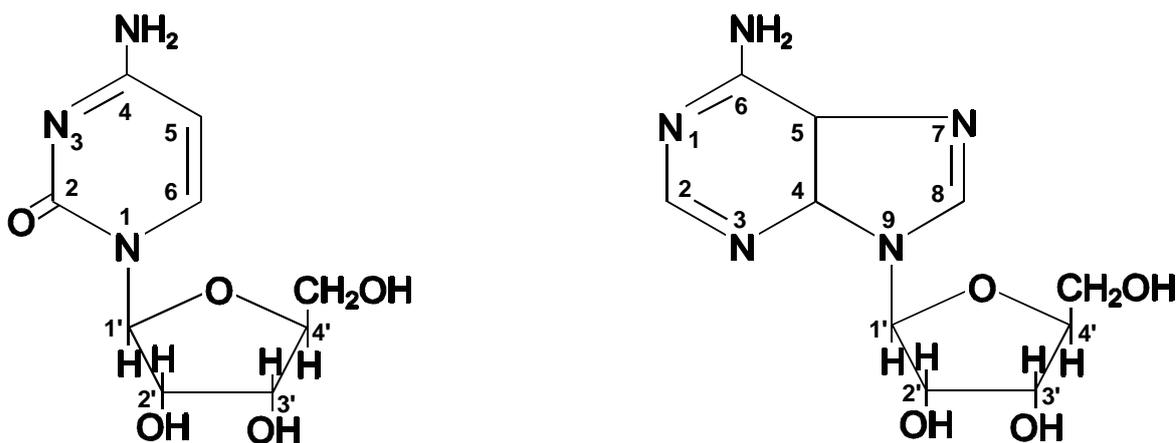
Bajo control proporcional es imposible alcanzar una eficacia mayor del 95%, ya

que el sistema se vuelve oscilante e inestable cuando  $K_P$  es mayor que  $10^{-3}$ . Sin embargo, en el microcalorímetro bajo control proporcional-integral sí se alcanza una eficiencia máxima del 100%. Es más, con este control siempre se trabaja en condiciones de máxima eficiencia, independientemente de los valores de los parámetros de control,  $K_P$  y  $K_I$ .

Otros índices de eficiencia son la sensibilidad dinámica y la sensibilidad dinámica específica. En el Capítulo 3 se mencionó que tienen valores de 10-20  $\mu\text{cal}$  y 2-4  $\mu\text{cal/ml}$ , respectivamente, alcanzándose con el control proporcional-integral una sensibilidad mayor que con el control proporcional puro.

## 8. EXPERIMENTOS PREVIOS DE COMPROBACIÓN.

Una vez caracterizado el microcalorímetro, en este Capítulo se presentan dos experimentos cuya finalidad es comprobar la fiabilidad de los datos sobre las magnitudes termodinámicas obtenidas con dicho dispositivo. Como experimentos típicos se han elegido las reacciones de protonación de dos ribonucleósidos: citidina y adenosina. La estructura molecular de la citidina y de la adenosina se muestra en la *Figura 8.1*.



*Figura 8.1.* Estructura molecular de los ribonucleósidos citidina (4-amino-2-hidroxi-1-ribofuranosilo) y adenosina (6-amino-9-ribofuranosilo).

En la bibliografía se puede encontrar una extensiva caracterización termodinámica de la protonación de estos dos ribonucleósidos (*Christensen et al., 1962; Christensen et al., 1967; Christensen et al., 1970a; Christensen et al., 1970b; Christensen et al., 1976b*). En las *Tablas 8.1* y *8.2* se indican los valores de las magnitudes termodinámicas de la protonación de citidina y adenosina determinadas mediante calorimetría en otros trabajos. Únicamente se han considerado aquellos datos correspondientes a las mismas condiciones

experimentales que se han utilizado en nuestros experimentos (T=25°C y μ=0).

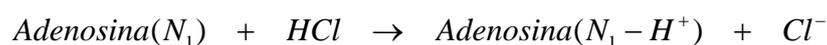
Tabla 8.1. Magnitudes termodinámicas de la protonación de citidina (T=25°C y μ=0).

| $pK$   | $\Delta H$ kcal/mol | $\Delta S$ cal/mol K |
|--------|---------------------|----------------------|
| -4.08  | -4.47               | 3.9                  |
| -4.08  | -5.11               | 1.5                  |
| -12.24 | -10.7               | 20.2                 |
| -12.5  | -10.3               | 22.9                 |

Tabla 8.1. Magnitudes termodinámicas de la protonación de adenosina (T=25°C y μ=0).

| $pK$   | $\Delta H$ kcal/mol | $\Delta S$ cal/mol K |
|--------|---------------------|----------------------|
| -3.5   | -3.1                | 5.7                  |
| -3.50  | -3.91               | 2.92                 |
| -12.34 | -8.4                | 28.3                 |
| -12.35 | -9.7                | 23.9                 |

Los valores de  $pK$  menores se asignan a la protonación del grupo  $N_3$  y del grupo  $N_1$  en la molécula de citidina y de adenosina, respectivamente; los  $pK$  mayores se asignan a la protonación del grupo 2'-OH de la ribosa en ambas moléculas. En cada molécula los valores de  $pK$  de los grupos protonables son muy diferentes, por lo que es posible estudiar separadamente la protonación de cada grupo. En los experimentos realizados se ha fijado un  $pH$  inicial 7, de modo que la especie predominante es la forma neutra de ambas moléculas y ante cualquier adición de HCl (disolución madre 1M, FLUKA) se protonará el grupo  $N_3$  y el grupo  $N_1$ , respectivamente.



La curva de valoración teórica de calor acumulado,  $Q$ , en función de la concentración total de reactivo valorante añadido,  $[HCl]_T$ , se calcula mediante la ecuación siguiente (Freire et al., 1990):

$$Q = \frac{V\Delta H}{2K} \left( 1 + K[HCl]_T + nK[M]_T - \sqrt{(1 + K[HCl]_T + nK[M]_T)^2 - 4nK^2[M]_T[HCl]_T} \right) \quad (8.1)$$

donde  $V$  es el volumen de la disolución valorada teniendo en cuenta el débil efecto de dilución producido en cada inyección,  $\Delta H$  ( $Kcal / mol H^+$  unido) es la entalpía de reacción,  $K$  es la constante de equilibrio de la reacción,  $n$  es el número de sitios de unión independientes que intervienen en la reacción,  $[HCl]_T$  es la concentración total de reactivo valorante añadido,  $[M]_T$  es la concentración de reactivo valorado (citidina o adenosina) y  $n$  es el número de sitios por molécula de reactivo valorado que intervienen en la reacción. En nuestro caso  $n=1$ , ya que según las condiciones experimentales sólo hay un grupo protonable para las moléculas de citidina y adenosina en el intervalo de  $pH$  recorrido.

La curva de valoración teórica de calor diferencial,  $dQ/d[HCl]_T$ , en función de la concentración total de reactivo valorante añadido se obtiene mediante esta otra ecuación:

$$\frac{dQ}{d[HCl]_T} = \frac{V\Delta H}{2} \left( 1 - \frac{1 + K[HCl]_T - nK[M]_T}{\sqrt{(1 + K[HCl]_T + nK[M]_T)^2 - 4nK^2[M]_T[HCl]_T}} \right) \quad (8.2)$$

que es la función derivada de la función de calor acumulado indicada en la ec. (8.1).

### *Citidina*

En la *Figura 8.2* se muestra una valoración microcalorimétrica de citidina, realizada según el protocolo detallado en el Capítulo 3, en las condiciones experimentales indicadas. La duración del termograma es de 45 minutos y el tiempo de equilibrado térmico es de 1 hora, por lo que en menos de 2 horas se puede obtener una curva de valoración microcalorimétrica completa.

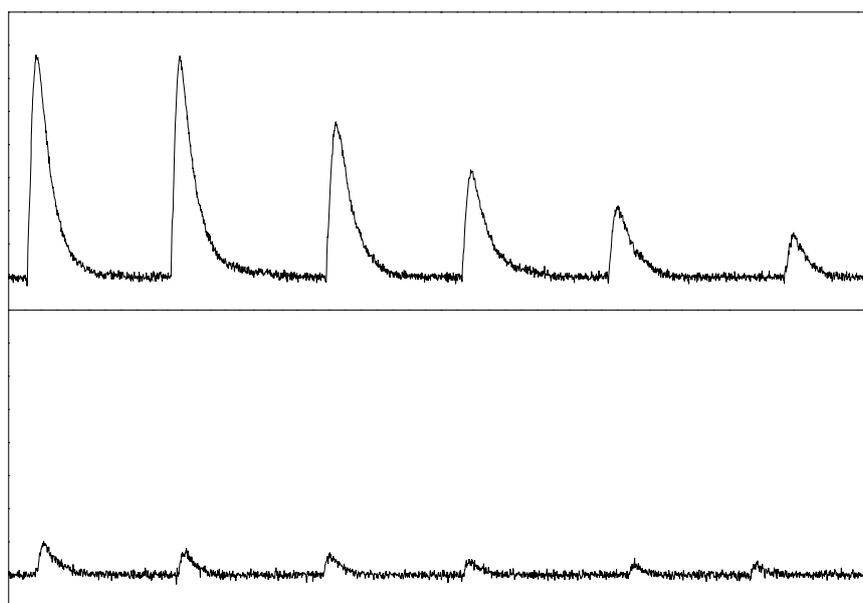


Figura 8.2. Valoración microcalorimétrica de citidina.

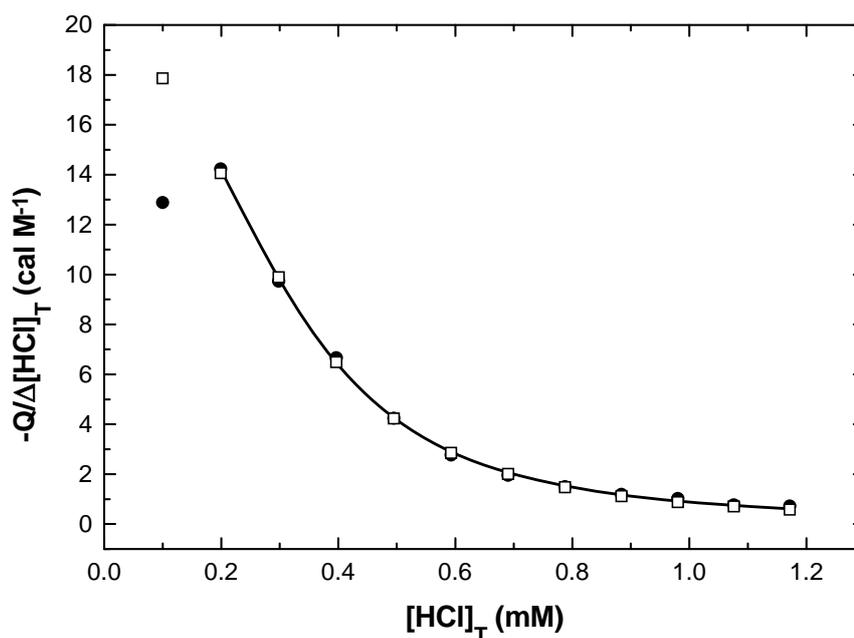


Figura 8.3. Calor diferencial de reacción de protonación de citidina en función de la concentración total de reactivo valorante. (●) datos experimentales, (□) datos calculados según *Christensen et al., 1970a*, (—) ajuste según la ec. (8.2).

$[Cit] = 262 \mu\text{M}$ ;  $[HCl] = 50 \text{ mM}$ ;  $V_0 = 5 \text{ ml}$ ;  $v = 10 \mu\text{l}$ ;  $pH$  inicial = 7;  $K_p = 10^{-4}$ ;  $c = 3.1$  donde  $[Cit]$  es la concentración inicial de citidina,  $[HCl]$  es la concentración de ácido clorhídrico que se utiliza como valorante,  $V_0$  es el volumen inicial de la disolución de

citidina que se va a valorar,  $v$  es el volumen de inyección y  $K_p$  es el valor del parámetro del control proporcional. Se ha empleado una concentración inicial de citidina apropiada para que el parámetro  $c=K[Cit]$  (adimensional) no tenga un valor demasiado pequeño y se pueda obtener información de la curva de valoración (*Wiseman et al., 1989*). En la *Figura 8.3* se puede ver el resultado de la valoración microcalorimétrica de citidina. En ella se representa el calor diferencial de reacción experimental y calculado en función de la concentración total de reactivo valorante añadido. Los datos calculados corresponden a un valor de entalpía de protonación de  $-5.11$  Kcal/mol y un valor de  $pK$  de protonación de  $-4.08$  (*Christensen et al., 1970a*). Se observa un excelente acuerdo entre el resultado experimental y el resultado teórico, excepto en el primer punto. Esto es debido a un proceso de difusión y mezclado de reactivos durante el tiempo requerido para equilibrar térmicamente el microcalorímetro y alcanzar la línea base (1 hora). Este efecto dependerá del tiempo de equilibrado necesario y del coeficiente de difusión de los reactivos. A la hora de obtener información de la curva de valoración no se tendrá en cuenta el primer dato y no se podrá hacer uso de la curva de valoración de calor acumulado.

En la *Figura 8.3* la curva de trazo continuo representa el ajuste de los datos experimentales según la ec. (8.2) considerando  $n$ ,  $K$  y  $\Delta H$  como parámetros ajustables. En la *Tabla 8.3* se muestra el resultado de dicho ajuste y se observa un buen acuerdo entre los valores obtenidos y los encontrados en la bibliografía. La pequeña discrepancia parece deberse en parte al método de ajuste, pues si se ajusta mediante la ec. (8.2) la curva de valoración de calor diferencial calculada no se obtienen los valores exactos de los parámetros termodinámicos, mientras que si se ajusta mediante la ec. (8.1) la curva de valoración de calor acumulado calculada sí se obtienen valores correctos. A pesar de esto, para el ajuste de datos experimentales debe emplearse el análisis de los calores individuales, lo que evita la propagación de errores accidentales o sistemáticos.

*Tabla 8.4.* Valores experimentales de los parámetros termodinámicos de la protonación del grupo  $N_3$  de la citidina.

---

|                      |                  |
|----------------------|------------------|
| $n$                  | $1.11 \pm 0.04$  |
| $pK$                 | $-4.11 \pm 0.12$ |
| $\Delta H$ kcal/mol  | $-5.4 \pm 0.3$   |
| $\Delta G$ kcal/mol  | $-5.61 \pm 0.03$ |
| $\Delta S$ cal/mol K | $0.7 \pm 1$      |
| $\chi^2$             | 0.01375          |

### *Adenosina*

En la *Figura 8.4* se muestra el resultado de una valoración microcalorimétrica de adenosina, realizada según el protocolo detallado en el Capítulo 3, en las condiciones experimentales indicadas. En la *Figura 8.4* se representa el calor diferencial de reacción experimental y calculado (*Christensen et al., 1970b*) en función de la concentración total de reactivo valorante añadido. La curva calculada corresponde a un valor de entalpía de protonación de  $-3.91$  kcal/mol y un valor de  $pK$  de protonación de  $-3.50$  (*Christensen et al., 1970b*). Se observa una excelente acuerdo entre el resultado experimental y calculado, excepto en el primer punto. Igual que en el caso de la citidina, a la hora de obtener información de la curva de valoración no se tendrá en cuenta el primer dato y no se podrá hacer uso de la curva de valoración de calor acumulado.

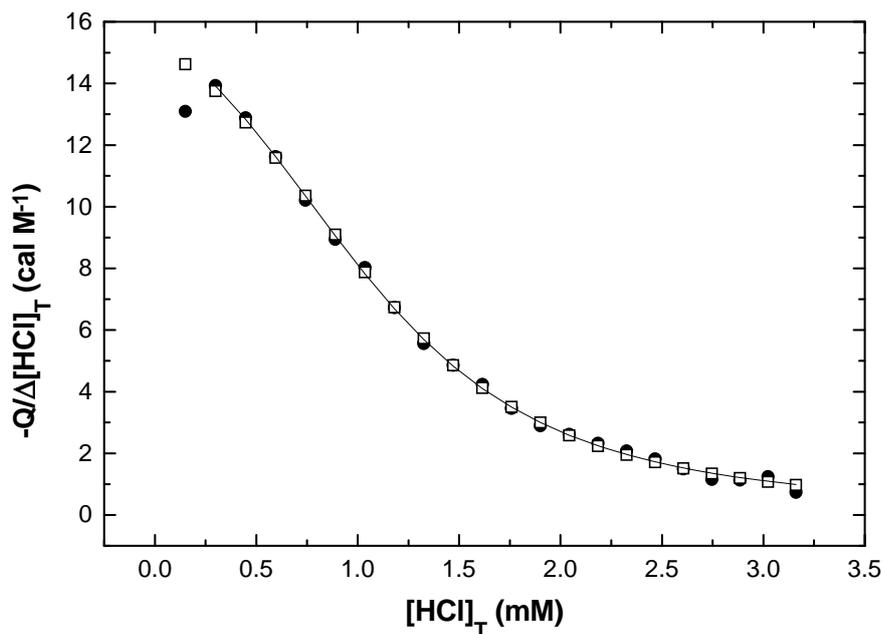


Figura 8.4. Calor diferencial de reacción de protonación de adenosina en función de la concentración total de reactivo valorante. (●) datos experimentales, (□) datos calculados según Christensen *et al.*, 1970b, (—) ajuste según la ec. (8.2).

$$[Aden] = 1.045 \text{ mM}; [HCl] = 75 \text{ mM}; V_0 = 5 \text{ ml}; v = 10 \text{ } \mu\text{l}; pH \text{ inicial} = 7; Kp = 10^{-4};$$

$$c = 3.3$$

donde  $[Aden]$  es la concentración inicial de adenosina. Se ha empleado una concentración inicial de citidina apropiada para que el parámetro  $c=K[Aden]$  no tenga un valor demasiado pequeño y se pueda obtener información de la curva de valoración.

En la Figura 8.4 también se presenta el ajuste de los datos experimentales según la ec. (8.2) considerando  $n$ ,  $K$  y  $\Delta H$  como parámetros ajustables. En la Tabla 8.4 se muestra el resultado de dicho ajuste y se observa un buen acuerdo entre los valores obtenidos y los encontrados en la bibliografía. La concordancia es mejor que en la valoración de citidina y es debido a dos razones: se dispone de más datos experimentales y la curva de valoración está mejor definida (el parámetro  $c=K[M]$  es mayor en la valoración de adenosina). Nuevamente, la pequeña discrepancia se debe al método de ajuste.

Tabla 8.4. Valores experimentales de los parámetros termodinámicos de la protonación de

---

la posición  $N_7$  de la adenosina.

|                      |                  |
|----------------------|------------------|
| $n$                  | $1.04 \pm 0.02$  |
| $pK$                 | $-3.51 \pm 0.09$ |
| $\Delta H$ kcal/mol  | $-4.04 \pm 0.09$ |
| $\Delta G$ kcal/mol  | $-4.78 \pm 0.02$ |
| $\Delta S$ cal/mol K | $2.5 \pm 0.4$    |
| $\chi^2$             | 0.01612          |

Se desprende de estos experimentos que las magnitudes termodinámicas características de un proceso obtenidas mediante el microcalorímetro presentado en este trabajo de investigación son datos muy fiables. A la hora de discutir las pequeñas discrepancias entre los datos experimentales y los datos bibliográficos hay que tener en cuenta que éstos últimos fueron determinados utilizando un calorímetro de valoración continua (*Christensen et al., 1962; Christensen et al., 1967; Christensen et al., 1970a; Christensen et al., 1970b*), donde hay numerosas fuentes de error que deben ser corregidas. Por último, sólo queda señalar que este tipo de experimentos de comprobación no son imprescindibles si se ha realizado una caracterización precisa del dispositivo empleando experimentos eléctricos y químicos. Sin embargo, puede ser conveniente considerar este tipo de experimentos para eliminar, o por lo menos detectar, las posibles fuentes de errores sistemáticos que pudieran surgir en el procedimiento seguido en un experimento químico completo.

## 9. CALORIMETRÍA DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS.

### 9.1. Introducción.

#### 9.1.1. Generalidades.

Las moléculas de proteína son co-polímeros de unos 20 aminoácidos diferentes unidos entre sí por enlaces covalentes (enlaces peptídicos) de modo que constituyen una cadena lineal denominada cadena polipeptídica. Presentan comportamientos muy diferentes dependiendo de su estructura molecular. Se distinguen cuatro niveles de estructura:

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <i>Estructura primaria</i>    | Secuencia lineal de aminoácidos; es decir, composición química y orden de los constituyentes.                                      |
| <i>Estructura secundaria</i>  | Disposición espacial de porciones particulares de la cadena polipeptídica (hélice- $\alpha$ , lámina- $\beta$ , cadena aleatoria). |
| <i>Estructura terciaria</i>   | Disposición espacial de todas las estructuras secundarias de una cadena polipeptídica.   |
| <i>Estructura cuaternaria</i> | Disposición espacial de todas las cadena polipeptídicas que constituyen la molécula de proteína completa y activa.                 |

---

La estructura primaria contiene la información estructural completa y, por lo tanto, determina la estructura tridimensional final que adopta la molécula completa de proteína (Afinsen, 1973), que se denomina *conformación*: estructura global de la molécula de proteína considerando conjuntamente los cuatro niveles de estructuración. Una molécula de proteína no posee una conformación fija y estática. Debido al desorden térmico se originan fluctuaciones en su estructura, de forma que se producen transiciones continuamente entre distintas conformaciones (microestados) y se puede hablar de una conformación dinámica promedio o típica de dicha molécula (macroestado). Esta conformación predominante depende del ambiente que rodea a la molécula de proteína. En concreto, las principales características del medio que condicionan la conformación de una molécula proteica son: *pH*, fuerza iónica, temperatura y composición química. Un ejemplo se encuentra en la desnaturalización (pérdida de estructuración) de una proteína en estado nativo inducida por variación de la temperatura: a temperaturas moderadas la conformación más estable es la del estado nativo y conforme aumenta la temperatura llega un momento en que la intensidad de las fluctuaciones estructurales alcanza un máximo de forma que a temperaturas mayores la conformación más estable es la del estado desnaturalizado.

Según la conformación general, se consideran dos grupos fundamentales de proteínas:

- *Fibrosas*

Moléculas constituidas por cadenas polipeptídicas que se disponen paralelamente según una dirección determinada formando fibras o láminas. En general, son insolubles en agua o en disoluciones salinas diluidas y su función biológica es más estructural y/o mecánica que bioquímica.

- *Globulares*

Moléculas constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas de modo que adoptan una forma esférica compacta presentando una elevada densidad de empaquetamiento con múltiples contactos de van der Waals. En general, son solubles en medio acuoso, predominando los aminoácidos de cadena lateral polar

en su superficie. Intervienen en un amplio espectro de procesos bioquímicos tales como reacciones enzimáticas, identificación de antígenos por anticuerpos, interacciones hormona-receptor, etc.

Mención aparte merecen las *proteínas de membrana*, especialmente las conocidas como *proteínas intrínsecas* que juegan un papel central en el transporte activo a través de las membranas celulares.

Existe una íntima relación entre conformación y función biológica de una proteína. La conformación determina sus características físico-químicas y la función biológica que pudiese desempeñar dicha molécula depende de su adaptación al ambiente y de su adecuación a una tarea específica, siendo determinantes para ello tales propiedades físico-químicas. Además, se ha comprobado que variaciones en la conformación provocan una alteración de su función.

Considerada la molécula proteica como un sistema termodinámico, su conformación en unas condiciones determinadas debe ser aquella que está más favorecida termodinámicamente (*Gutte et al., 1969; Afinsen et al., 1975*). En este punto hay que tener en cuenta que las interacciones intramoleculares existentes entre los aminoácidos constituyentes y las interacciones entre la proteína y el medio externo son las que determinan la conformación más estable de la molécula. Cada conformación tiene asociada una energía conformacional que es la energía global debida a las interacciones mencionadas anteriormente y la conformación predominante en unas condiciones dadas es la que corresponde a un mínimo energético. De esto se deduce que si se alteran de alguna manera estas interacciones o existe la posibilidad de alcanzar un estado de menor energía, la molécula proteica cambiará su conformación. Si además se considera que las interacciones implicadas pueden tener efectos opuestos compensatorios, es probable que la conformación más estable lo sea de un modo marginal y muy sensible a los factores ambientales. Es conveniente mencionar brevemente qué interacciones intramoleculares no covalentes y entre la molécula y su entorno son las que hacen posible que una molécula de proteína adopte la existencia de una estructura ordenada (aperiódica).

Las principales fuerzas no covalentes, cuyo papel e importancia en la estabilidad de

las proteínas ha sido y aún sigue siendo motivo de controversia (*Kollman, 1977; Dill, 1990; Makhatadze et al., 1995*), son:

- Enlace de hidrógeno (*Pimentel et al., 1971; Taylor et al., 1977; Ippolito et al., 1990*).
- Interacción de van der Waals (*Bondi, 1964; Israelachvili, 1982; Buckingham et al., 1988*).
- Interacción hidrofóbica (*Pratt et al., 1977; Baldwin, 1986; Privalov et al., 1988; Privalov et al., 1989; Müller, 1990*).
- Interacción electrostática (*Warshel et al., 1984; Matthew, 1985; Rogers, 1986; Harvey, 1989; Sharp et al., 1990*).

En la *Tabla 9.1* se indica para cada tipo de interacción no covalente el signo correspondiente de la contribución entálpica y entrópica a la variación de energía de Gibbs asociada, es decir, se indica si está dirigida entálpicamente o entrópicamente.

*Tabla 9.1.* Contribución a la energía de Gibbs conformacional de las distintas interacciones no covalentes.

|                              | $\Delta H$ | $\Delta S$ | $\Delta G$ |                             |
|------------------------------|------------|------------|------------|-----------------------------|
| enlace de hidrógeno          | <0         | <0         | <0         | Interacciones<br>entálpicas |
| interacción de van der Waals | <0         | <0         | <0         |                             |
| interacción culombiana       | >0         | >0         | <0         | Interacciones<br>entrópicas |
| interacción hidrofóbica      | >0         | >0         | <0         |                             |

Todos estos tipos de interacciones participan en la formación de una estructura estable de la molécula de proteína en disolución. Pero también estas fuerzas juegan un papel importante en las interacciones intermoleculares entre proteínas. Así, determinan la solubilidad y la estabilidad frente a la agregación y la asociación supramolecular de las moléculas de proteína.

Es conveniente recordar que, además de las anteriores, existe un tipo de enlace

covalente que se establece entre dos residuos de cisteína, conocido como *punte disulfuro* y que tiene una importancia en la consecución de la conformación más estable. Este enlace restringe de forma determinante el número de conformaciones espaciales posibles y es responsable en gran medida de la interrelación espacial de estructuras secundarias en la molécula proteica. Esto es debido a que el enlace disulfuro se puede establecer entre dos cisteínas que están bastante separadas en la secuencia peptídica lineal.

### 9.1.2. *Proteínas en interfases.*

Las moléculas de proteína en disolución se adsorben prácticamente en cualquier interfase, debido sobre todo, entre otras causas, a su carácter anfifílico. El estudio del fenómeno de la adsorción tiene un interés básico: es un problema teórico y experimental atractivo y difícil, donde tienen lugar diversos fenómenos simultáneamente cuyos efectos individuales pueden llegar a ser contrapuestos.

En la naturaleza el comportamiento de una proteína en una interfase es de una enorme importancia. En el proceso de depósito de materia orgánica sobre una superficie, la adsorción de proteínas es quizá el más rápido y condiciona la subsiguiente deposición o adsorción de otros constituyentes. Como ejemplo típico se puede mencionar que la adsorción de proteínas sanguíneas es la primera etapa en el proceso global de la formación de un trombo en un vaso sanguíneo, ya que facilitan la adhesión posterior de plaquetas. También la adsorción de proteínas en una interfase es crucial en procesos bioquímicos y fisiológicos en los organismos. Por ejemplo, la actuación de enzimas sobre determinados sustratos o el acoplamiento de hormonas sobre sus receptores van precedidas de un proceso de adsorción de tales biomoléculas en una interfase concreta (ej. lipasas se adsorben sobre la superficie de partículas constituídas por grasas en suspensión). También es conocido el hecho de que la posibilidad de vida bacteriana en una interfase está condicionada por el proceso de adsorción previo de enzimas extracelulares.

Por otra parte es innegable el interés aplicado de los procesos de adsorción de macromoléculas en el campo industrial y biotecnológico. Podemos enumerar algunos

---

ejemplos:

- emulsiones y dispersiones coloidales estabilizadas mediante macromoléculas adsorbidas en la superficie de las partículas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.
- separación y purificación de constituyentes en una suspensión (ej. columnas de separación de proteínas).
- biocompatibilidad de implantes, prótesis y material quirúrgico, que depende directamente de la capacidad de tales materiales de prevenir o favorecer la adsorción de determinadas proteínas.
- biosensores y kits de inmunodiagnóstico, donde se emplean dispersiones de partículas que portan anticuerpos y que permitan amplificar y hacer más fácilmente detectable la reacción antígeno-anticuerpo.
- inmovilización de enzimas en procesos industriales y clínicos, lo que supone una gran ventaja, sobre todo por la posibilidad de una reutilización cómoda.

No sólo es interesante conocer y poder controlar las condiciones en que se favorece o dificulta la adsorción de proteína en una interfase. También es esencial poder evaluar la magnitud de los posibles cambios conformacionales o alteraciones estructurales que sufre la molécula adsorbida. No hay que perder de vista que estructura y función biológica son dos aspectos íntimamente relacionados en una molécula proteica.

El proceso de adsorción está caracterizado por el valor de la variación de la energía de Gibbs en tal proceso,  $\Delta_{ADS}G$ , que posee un valor negativo considerable por tratarse de un fenómeno espontáneo y con elevada afinidad:

$$\Delta_{ADS}G = \Delta_{ADS}H - T\Delta_{ADS}S < 0 \quad (9.1)$$

Con frecuencia la adsorción de proteínas no es un proceso reversible. En general, no se observa desorción frente a dilución, aunque a veces sí ante un cambio de  $pH$  o de fuerza iónica, siendo la cantidad desorbida dependiente de la cantidad adsorbida (*Bagchi et al., 1981b; Ortega Vinuesa et al., 1993; Galisteo et al., 1994a; Galisteo et al., 1995c*). Incluso cuando existe desorción, la conformación de la proteína nativa en disolución es diferente de la proteína desorbida, dependiendo de la estabilidad estructural de la molécula en disolución (*Norde et al., 1992a; Norde, 1992c; Norde et al., 1986*). Consecuentemente, no se puede utilizar la termodinámica clásica del equilibrio para obtener los valores de las variaciones de los potenciales termodinámicos en el proceso de adsorción a partir de la evaluación de la constante de equilibrio. Esto provoca que en la mayoría de los casos el estudio termodinámico únicamente se pueda abordar mediante la determinación independiente de la entalpía de adsorción,  $\Delta_{ADS}H$ , y de la entropía de adsorción,  $\Delta_{ADS}S$ . Por ser esta última una magnitud cuya cuantificación es extremadamente complicada dadas las características de los sistemas implicados, el enfoque más directo descansa sobre la determinación de  $\Delta_{ADS}H$ . El valor de esta magnitud y su dependencia frente a los factores que afectan al proceso de adsorción ( $pH$ , fuerza iónica, temperatura, estado electroquímico de la interfase y de la proteína, hidrofobicidad y heterogeneidad de la superficie adsorbente y de la superficie proteica) puede ayudar a comprender mejor el proceso de adsorción y las interacciones subyacentes en dicho fenómeno. En este trabajo se ha estudiado la influencia del  $pH$ , la fuerza iónica, la temperatura y las características de la interfase sobre la adsorción de Mioglobina en dicha interfase. Las magnitudes fundamentales en las que se basa el análisis son la cantidad adsorbida (isoterma de adsorción) y la entalpía molar de adsorción.

En este trabajo de investigación se han considerado únicamente interfases sólido-líquido en las cuales se estudiará el fenómeno de la adsorción de moléculas proteicas, siendo la fase líquida un medio acuoso. Al ser las proteínas moléculas anfífilas, presentando regiones en que predomina el carácter polar o apolar, cuando se encuentran con una interfase tienden a acumularse en dicha discontinuidad. Como la molécula de proteína tiene un tamaño mucho mayor que el de la molécula de agua, en principio es lógico suponer que el proceso de adsorción consiste en la desaparición local de las interfases sólido-agua y proteína-agua originales y la creación de una interfase nueva

---

sólido-proteína. En este proceso de adsorción entran en juego también las interacciones no covalentes anteriormente mencionadas relacionadas con la estructura o conformación de la proteína. Y lo hacen por partida doble: en la interacción global entre la superficie adsorbente y la molécula de proteína se encuentran involucradas dichas interacciones, pero además, si hay un cambio conformacional concomitante en la molécula proteica en el proceso de adsorción, también estarán implicadas dichas interacciones en un nivel intramolecular.

En el proceso de adsorción intervienen no solamente la superficie adsorbente y la proteína, sino también el disolvente (agua) y los solutos existentes en dicho medio. Por esta razón, habrá una competencia entre proteína, agua y solutos de elevado peso molecular por ocupar la interfase. También habrá que tener en cuenta la solubilidad de la proteína en el agua, ya que a veces la adsorción se deberá más a la optimización de la interacción proteína-agua que a una interacción favorable entre proteína y superficie adsorbente (*Adamson, 1976*).

Los solutos iónicos de bajo peso molecular también juegan un papel determinante en el proceso de adsorción. En primer lugar, los contra-iones que integran la doble capa eléctrica asociada a la superficie adsorbente y a la proteína apantallan la carga eléctrica de dicha superficie y de la proteína. De este modo pueden favorecer o dificultar la adsorción, ya que modifican la interacción culombiana. En segundo lugar, al crearse una capa proteica de baja constante dieléctrica sobre la superficie adsorbente, la consiguiente acumulación de carga eléctrica no se ve favorecida termodinámicamente, ya que se crean potenciales electrostáticos muy elevados asociados a fuerzas repulsivas importantes. Para eliminar este fenómeno hay dos posibilidades: adsorción de iones que contrarrestan la carga eléctrica acumulada (fenómeno denominado *efecto del medio iónico*) (*Norde, 1976; Norde et al., 1979; Norde, 1992*) o desnaturalización de la proteína de modo que penetra agua en la capa adsorbida y se incrementa el valor de la constante dieléctrica. En el primer caso se produce una disminución de entropía que determina que la energía de Gibbs de transferencia sea positiva y en el segundo hay un aumento de entropía conformacional (aumenta la movilidad rotacional interna) de la proteína por desnaturalización, pero hay una disminución de la entropía configuracional de las moléculas de agua que penetran en

la capa proteica adsorbida. Sin embargo, en el caso de proteínas globulares compactas y pequeñas las alteraciones estructurales no serán de suficiente magnitud, por lo que será predominante la transferencia de iones desde el medio (Norde, 1983; Norde, 1984).

La tendencia que muestran las proteínas por adsorberse en una interfase se cuantifica mediante la energía de Gibbs de adsorción,  $\Delta_{ADS}G$ . En condiciones de equilibrio, el cálculo de  $\Delta_{ADS}G$  implicaría la determinación de concentraciones en el equilibrio. Si la adsorción es reversible los diferentes estados de equilibrio estarán representados por la isoterma de adsorción que indica la cantidad de proteína adsorbida como función de la concentración de equilibrio de la proteína en disolución y con ayuda de modelos se puede evaluar  $\Delta_{ADS}G$ . Mediante las herramientas de la termodinámica clásica del equilibrio es posible calcular la entalpía de adsorción,  $\Delta_{ADS}H$ , y la entropía de adsorción,  $\Delta_{ADS}S$  (Filippov, 1994). También es posible caracterizar el proceso utilizando el método calorimétrico indicado en el Capítulo 8 para el estudio de unión de ligandos a macromoléculas. El modelo de equilibrio más utilizado es el de Langmuir, si bien ninguna de sus hipótesis se cumple en la adsorción de proteínas en interfases sólido-líquido. Como ya se ha mencionado, dado que en general la adsorción de proteínas no es proceso reversible (Norde, 1994; Norde et al., 1985) estos tratamientos no se pueden aplicar. El análisis termodinámico deberá limitarse a la determinación directa de  $\Delta_{ADS}H$  y de  $\Delta_{ADS}S$ . Mediante técnicas calorimétricas es posible determinar la entalpía de adsorción, pero el cálculo de la entropía de adsorción es impracticable debido a la complejidad de la adsorción y la infinidad de configuraciones y conformaciones posibles en el sistema. Por tanto, la entalpía de adsorción queda como la única magnitud que es accesible experimentalmente y solamente mediante técnicas calorimétricas. A través de la isoterma de adsorción sólo se pueden obtener valores aparentes de los potenciales termodinámicos cuyo significado físico puede ser irreal. De todos modos, no se debe descartar ninguna forma de enfocar el problema: de la utilización simultánea de técnicas complementarias depende el éxito en el estudio abordado sobre el proceso de adsorción. A partir de la determinación de la entalpía de adsorción y de ciertos modelos e hipótesis se puede hacer una estimación (orden de magnitud y signo) de la energía de Gibbs de adsorción y de la entropía de adsorción (Norde, 1976).

---

Un hecho muy relevante que debe ser tenido en cuenta es la existencia de interacciones laterales intermoleculares entre moléculas adsorbidas. Tales interacciones se pondrán de manifiesto conforme avance el proceso de adsorción. Esto tendrá dos efectos muy claros e interrelacionados: dependencia de la entalpía de adsorción respecto del avance del proceso de adsorción o grado de recubrimiento de la superficie y aparición de distintos modos y orientaciones en la adsorción de las moléculas para minimizar dichas interacciones laterales dependiendo del grado de recubrimiento. Mediante valoraciones potenciométricas se ha observado (*Galisteo et al., 1995b*) que la valoración potenciométrica de Lisozima adsorbida depende del grado de recubrimiento, confirmando la idea precedente.

La entalpía de adsorción determinada calorimétricamente contiene contribuciones de diversos fenómenos. Estos subprocesos se producen simultáneamente, pero en el cálculo de la variación de las funciones de estado termodinámicas podemos considerar que ocurren consecutivamente. La importancia relativa de la contribución de cada fenómeno a  $\Delta_{ADS}H$  total depende de las características físico-químicas concretas de la superficie adsorbente y de la proteína. Mediante hipótesis y modelos adecuados es posible estimar el valor de la contribución de cada subproceso. Es lo que se denomina *resolución de la entalpía de adsorción* (*Norde, 1976; Norde, 1985*). Del mismo modo, es posible resolver, al menos aproximadamente, la energía de Gibbs de adsorción y estimar qué subprocesos favorecen y cuáles no favorecen termodinámicamente el proceso de adsorción, es decir, cuáles contribuyen a reducir o aumentar  $\Delta_{ADS}G$ . Se han establecido tres tipos fundamentales de subprocesos en el proceso de adsorción (*Norde, 1985; Norde 1992c; Norde, 1994*):

- **Cambios en el estado de hidratación.** Deshidratación de la superficie adsorbente y de la superficie de la proteína y formación de contactos entre proteína y superficie adsorbente.

Este subproceso implica cambios de hidratación de la superficie adsorbente y de la proteína, con un establecimiento simultáneo de interacciones entre proteína y

superficie adsorbente. Si la superficie (adsorbente y proteica) considerada es hidrofílica, el valor de la energía de Gibbs molar para este proceso,  $\Delta_{ADS}G_h$ , debe ser positiva; si la superficie es hidrofóbica, tendrá un valor negativo. La principal contribución es de naturaleza entrópica (interacción hidrofóbica). Es tan determinante este subproceso que prácticamente todas las proteínas se adsorben sobre superficies hidrofóbicas aunque el proceso sea desfavorable desde el punto de vista de las demás interacciones. Está claro que también influirá el carácter hidrófobo o hidrófilo de la superficie proteica.

Se ha calculado (*Lu et al., 1991*) la energía de solvatación implicada en la adsorción de proteínas sobre superficies poliméricas, obteniendo valores de hasta -200 kJ/mol para diferentes proteínas adsorbidas sobre poliestireno.

- **Redistribución de grupos cargados.** Es un proceso electroquímico en el que se produce una transferencia de iones (protones y otros iones de bajo peso molecular) y una superposición de los potenciales electrostáticos de las dobles capas asociadas con la superficie adsorbente y la superficie proteica.

Antes del proceso de adsorción la situación es la siguiente: tanto en la superficie adsorbente como en la superficie de la proteína se localizan cargas electrostáticas. En el primer caso, si consideramos que la superficie adsorbente es el área superficial total de una dispersión de partículas poliméricas (látex), las cargas electrostáticas proceden de la existencia de grupos cargados protonables en la superficie de tales partículas. El monómero y el tipo de iniciador empleados en la reacción de polimerización o síntesis del látex determinan qué grupos funcionales son los que se localizan en la superficie de las partículas y definen las características físico-químicas (hidrofobicidad y densidad de carga electrostática, principalmente) de la interfase látex-disolución. En una proteína, los residuos con grupos funcionales ionizables de la superficie molecular son los responsables de la existencia de cargas electrostáticas superficiales. Los grupos cargados son responsables de la existencia de un mecanismo de estabilización del sistema coloidal (dispersión de partículas de látex y suspensión de proteína) basado en interacciones culombianas repulsivas que impiden la agregación de partículas o de moléculas de proteína. En ambos casos se origina una

---

acumulación de iones de carga contraria a la superficial (contra-iones) que contrarresta a ésta última y se forma lo que se conoce como *doble capa eléctrica* (Hunter, 1981; Hunter, 1989; Lyklema, 1991). Se establece una distribución de potencial electrostático que decrece desde un valor extremo en la superficie hasta un valor nulo a distancias grandes de dicha superficie. En la parte interna de la doble capa (cercana a la superficie), denominada *capa de Stern*, los iones poseen una movilidad reducida y en la parte externa los iones, *capa difusa*, se ven sometidos al desorden térmico, estando determinada su distribución espacial por la estadística de Maxwell-Boltzmann existiendo un balance entre energía térmica  $kT$  y energía electrostática  $z\psi e$  ( $z$  es la valencia del ión,  $\psi$  es el potencial electrostático a una determinada distancia de la superficie,  $e$  es la carga del electrón), y su movilidad es casi la de los mismos iones en el seno de la disolución. También existe una distribución, gobernada por la estadística de Maxwell-Boltzmann, de los iones cuya carga es del mismo signo que la de la superficie (co-iones).

Cuando en el proceso de adsorción se superponen los potenciales electrostáticos de las dobles capas de la superficie adsorbente y de la proteína se produce una transferencia de protones y otros iones entre la disolución y la capa adsorbida, siendo este fenómeno de transferencia reversible (efecto del medio iónico). Mediante hipótesis y modelos apropiados es posible estimar la energía de Gibbs molar electroquímica de transferencia de iones de tipo  $i$  entre la disolución y la capa adsorbida,  $\Delta_{ADS}G_i$ .

Se debe destacar que la variación de energía de Gibbs de transferencia de iones pequeños muy polarizantes desde la disolución hacia la capa proteica adsorbida es positiva; no obstante, se produce con una disminución de entalpía que se ve compensada por el término entrópico. Esto indica que la contribución química de la transferencia de tales iones se opone al proceso de adsorción. Sin embargo, dicha transferencia de iones se ve favorecida electrostáticamente bajo ciertas condiciones. Por tanto, podrá existir una competencia entre las contribuciones química y electrostática al proceso global de adsorción. A partir de los valores de la densidad de carga electrocinéticamente movilizadas por unidad de área adsorbente antes y después del proceso de adsorción es posible evaluar la

cantidad de iones incorporados a la capa de proteína adsorbida (*Haynes et al., 1994a*). Para ello es necesario disponer de datos sobre la movilidad electroforética de la proteína en cuestión en disolución.

- **Cambios conformacionales de la molécula proteica adsorbida.**

La conformación de la molécula proteica es el resultado de la competencia de interacciones intramoleculares e interacciones entre la proteína y su entorno. Como se mencionó anteriormente, las características del ambiente que rodea a la molécula de proteína condicionan la importancia relativa y el efecto de dichas interacciones. Un cambio en el medio puede conducir, por tanto, a un cambio conformacional: cuando las moléculas de proteína se encuentran con una discontinuidad tal como una interfase sólido-líquido, podrán aparecer cambios conformacionales debidos a que la conformación favorable termodinámicamente para las moléculas adsorbidas en la interfase puede ser distinta a aquella que corresponde a un mínimo energético para las moléculas localizadas en el seno de la disolución. Estos cambios conformacionales consistirán, en general, en una pérdida de estructuración y del orden molecular en los niveles cuaternario, terciario, y secundario. Este hecho explica la existencia de una fuerza conductora entrópicamente dirigida que favorece la adsorción en aquellas proteínas cuya conformación globular compacta posee una estabilidad marginal en disolución determinada principalmente por interacciones hidrofóbicas. En este caso, la molécula puede desplegarse sobre la superficie adsorbente de modo que el interior apolar de la molécula es expuesto a la superficie adsorbente manteniendo la ausencia de hidratación para la región apolar. Aún generándose una pequeña disminución en la estructuración molecular, el aumento de entropía provocado es notable y se puede considerar que, tal y como se afirmó anteriormente, la desnaturalización parcial de la proteína puede ser uno de los mecanismos motores del proceso de adsorción.

Claramente se puede deducir que la hidrofobicidad de la superficie adsorbente será determinante para la existencia de cambios conformacionales en la adsorción. En general, cuanto más hidrofóbica sea la superficie, estas alteraciones tendrán mayor intensidad.

---

La estabilidad conformacional de la proteína en disolución es un parámetro indicativo de su tendencia a adsorberse en una interfase, de forma que proteínas con baja coherencia interna pueden llegar a adsorberse sobre superficies hidrofílicas bajo repulsión electrostática. A través de diversos estudios se ha establecido que la estabilidad conformacional de la proteína en disolución tiene una importancia decisiva en el proceso de adsorción de ésta en una interfase (Haynes *et al.*, 1995; Arai *et al.*, 1990; Koutsoukos *et al.* 1982). Para verificar la existencia y determinar cuantitativamente la importancia de las alteraciones estructurales en el proceso de adsorción de la proteína es posible realizar experimentos de calorimetría de barrido con la proteína en disolución y con la proteína adsorbida sobre la superficie adsorbente (Feng *et al.*, 1993; Haynes *et al.*, 1995; Zoungrana *et al.*, 1997).

Si se considera que los cambios conformacionales en el proceso de adsorción son dependientes del tiempo (Sadana, 1992), es decir, se producen una vez que la molécula se a adsorbido sobre la superficie y trata de alcanzar la conformación energéticamente más favorable, podría explicarse la irreversibilidad frente a dilución.

Según algunos autores (Nyilas *et al.*, 1974; Chiu *et al.*, 1978), la entalpía de adsorción es un indicador de la intensidad de las alteraciones estructurales inducidas en el proceso de adsorción, ya que suponen que tales cambios conformacionales se producen gracias a la energía liberada en el proceso de adsorción. Sin embargo otros autores (Norde, 1985) consideran que no se pueden separar adsorción y alteraciones estructurales, sino que se producen simultáneamente y de forma *sinérgica*.

Existe una clasificación de las proteínas en cuanto a su comportamiento en el proceso de adsorción y la posibilidad de que éstas sufran cambios conformacionales en tal proceso (Norde, 1992b; Lyklema *et al.*, 1996):

- *proteína rígida*

En el proceso de adsorción intervienen la interacciones electrostática, de van der Waals, e hidrofóbicas, pero la molécula no sufre cambios conformacionales.

- *proteína blanda*

En el proceso de adsorción intervienen las interacciones mencionadas anteriormente, pero el motor que dirige la adsorción es el aumento entrópico derivado de los cambios conformacionales que sufre la proteína al adsorberse.

## 9.2. Materiales y métodos.

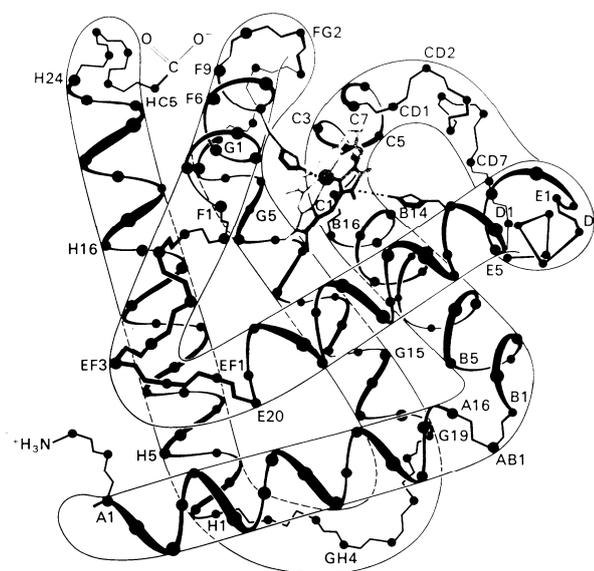
Todos los reactivos utilizados en la realización de las isotermas de adsorción y en los experimentos microcalorimétricos son de grado analítico y se han empleado sin posterior purificación. La proteína fue dializada antes de su uso durante 24 horas para eliminar impurezas debidas a solutos de bajo peso molecular. El agua usada en todos los experimentos es de tipo Milli-Q de MILLIPORE desionizada por ósmosis inversa.

Se han utilizado soluciones tamponadas de baja fuerza iónica para diluir y ajustar el *pH* de las muestras. Para controlar la fuerza iónica se añadía electrolito a la disolución (KBr, MERCK).

### *Mioglobina*

La proteína utilizada como molécula modelo es la Mioglobina (MGB de músculo cardíaco de caballo, SIGMA) cuya función biológica es la de servir como reserva de oxígeno y facilitar el desplazamiento del oxígeno en el músculo. La conformación particular del esqueleto polipeptídico de la mioglobina crea un entorno apolar para su centro activo, grupo hemo que contiene un átomo de hierro, que le capacita para transportar oxígeno de forma reversible. Es una proteína globular muy compacta de bajo peso molecular (153 aminoácidos) y posee un único dominio estructural. Su estructura

molecular está completamente resuelta (*Evans et al., 1990*). Los residuos hidrofóbicos de la superficie están distribuidos uniformemente. En el interior casi la totalidad de los residuos son apolares y aquellos que tienen parte apolar y polar están orientados de forma que sus porciones apolares están dirigidas hacia el interior. Los únicos residuos polares del interior de la molécula son dos histidinas (F8 y E7 en la *Figura 9.1*) que tienen una función crítica en el centro activo. En la *Tabla 9.2* se resumen las propiedades principales de la molécula de MGB y en la *Figura 9.1* se muestra la estructura tridimensional de dicha molécula, donde se pueden ver claramente los 8 segmentos de la cadena polipeptídica que presentan estructura de hélice- $\alpha$  (están designados con las letras A-H). A continuación se muestra la secuencia lineal de aminoácidos de la molécula de MGB (*Stryer, 1988; SIGMA,*



1997).

*Figura 9.1.* Estructura tridimensional de la molécula de mioglobina.

Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln-Gln-Val-Leu-Asn-Val-Trp-Gly-Lys-Val-Glu-Ala-Asp-  
 Ile-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Glu-Val-Leu-Ile-Arg-Leu-Phe-Thr-Gly-His-Pro-Glu-Thr-Leu-  
 Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Phe-Lys-His-Leu-Lys-  
 F8 Thr-Glu-Ala-Glu-Met-Lys-Ala-Ser-Glu-Asp-

E7

Leu-Lys-Lys-His-Gly-Thr-Val-Val-Leu-Thr-Ala-Leu-Gly-Gly-Ile-Leu-Lys-Lys-Lys-Gly-  
 His-His-Glu-Ala-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Ala-Gln-Ser-His-Ala-Thr-Lys-His-Lys-Ile-Pro-  
 Ile-Lys-Tyr-Leu-Glu-Phe-Ile-Ser-Asp-Ala-Ile-Ile-His-Val-Leu-His-Ser-Lys-His-Pro-  
 Gly-Asn-Phe-Gly-Ala-Asp-Ala-Gln-Gly-Ala-Met-Asn-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg-Asn-  
 Asp-Ile-Ala-Ala-Lys-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-Phe-Gln-Gly(carboxilo terminal)

## Estructura primaria o secuencia de aminoácidos de la Mioglobina

Tabla 9.2. Características físico-químicas de la Mioglobina.

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| peso molecular                      | 17800 g/mol                              |
| volumen específico parcial          | 0.742 cm <sup>3</sup> /g                 |
| dimensiones                         | 4.5×3.5×2.5 nm <sup>3</sup>              |
| coeficiente de difusión             | 1.10·10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> /s |
| punto isoelectrico                  | 7  |
| ΔG de desnaturalización             | -49.84 kJ/mol                            |
| T <sub>m</sub> de desnaturalización | 76°C                                     |
| estructura secundaria               |  |
| hélice-α                            | 75% (8 segmentos)                        |
| lámina-β                            | -  |

Teniendo en cuenta el comportamiento en la adsorción, esta molécula se considera como una proteína intermedia entre las proteínas *rígidas* y las *blandas* (Bos *et al.*, 1994).

*Determinación de la concentración de proteína*

La concentración de proteína en disolución se determinó mediante medida directa de la densidad óptica en la región ultravioleta (280 nm) en células de cuarzo de 1 cm de paso óptico, utilizando un coeficiente de extinción,  $E_{280}^{mg/ml} = 1.75$ , en un espectrofotómetro (MILTON ROY SPECTRONIC 601). El coeficiente de extinción se determinó midiendo la densidad óptica de una serie de muestras con diferentes concentraciones de MGB que posteriormente fueron desecadas en una estufa calefactora para evaluar el residuo seco (Dunn, 1989). La concentración de proteína en disolución utilizada en los experimentos nunca superó los 6 mg/ml con el objeto de evitar problemas de asociación molecular o de agregación.

---

## *Látex*

Como superficie adsorbente se utiliza normalmente una dispersión de partículas poliméricas de tamaño entre 50-1000 nm que recibe el nombre de látex. La principal ventaja de este tipo de sistemas es que en el proceso de síntesis (polimerización) es posible determinar las propiedades físico-químicas finales de dicha dispersión mediante la utilización de los reactivos (iniciador y monómero) y las condiciones experimentales (temperatura, fuerza iónica, concentraciones de reactivos). De este modo se puede controlar el tamaño de las partículas y las características electroquímicas de la interfase partícula-líquido (hidrofobicidad, densidad superficial de carga y grupos funcionales superficiales, principalmente). Este tipo de sistemas se emplea como sistemas modelo en procesos de adsorción debido a que es factible obtener una población monodispersa de partículas de pequeño tamaño (inferior a  $1\mu\text{m}$ ) de modo que con una fracción de volumen o peso muy reducida se pueda disponer de un área superficial enorme, es decir, de una interfase sólido-líquido de dimensiones considerables.

## *Preparación o síntesis de látex*

La síntesis de este tipo de dispersiones normalmente se realiza mediante polimerización en emulsión donde puede estar presente un emulsificante cuya finalidad es la de estabilizar las partículas formadas frente a la agregación. Para que este tipo de suspensiones puedan considerarse como sistemas modelo en procesos de adsorción de proteínas la síntesis se debe llevar a cabo sin emulsificante, ya que éste quedará adsorbido en la superficie de las partículas e intraccionará con las proteínas, alterando de forma

imprevisible el resultado final del proceso. Por otra parte, es posible someter al látex a un procedimiento de limpieza denominado *intercambio o reemplazamiento de suero*, que permite eliminar casi todo el emulsificante existente en la interfase.

Los grupos funcionales localizados en la superficie de las partículas determinarán en gran medida las características electro-químicas de la interfase. La naturaleza química de estos grupos dependerá del iniciador y del monómero empleados en la síntesis. El látex JM1 (*Peula García, 1995*) se ha sintetizado mediante polimerización en emulsión libre de emulsificante en una única etapa utilizando los iniciadores  $K_2S_2O_8$  (persulfato potásico) y  $NaHSO_3$  (bisulfito de sodio) y los co-monómeros NaSS (estirensulfonato de sodio) y estireno. El látex JX2 se ha sintetizado en dos etapas (*Sarobe et al., 1998*). En la primera se han sintetizado partículas de poliestireno (185 nm de diámetro) mediante polimerización en emulsión con emulsificante (aerosol MA80) utilizando como iniciador  $K_2S_2O_8$  (persulfato potásico) y estireno como monómero. Al término de la primera etapa el látex sintetizado se sometió a un proceso de descomposición del iniciador. En la segunda etapa se hizo uso de tales partículas como semilla para una segunda reacción de polimerización sin emulsificante en que se utilizó clorometilostireno como monómero y  $Na_2S_2O_5$  (persulfato sódico) como iniciador. El objetivo de esta segunda polimerización es crear una corteza externa con características especiales. Por ejemplo, se suele utilizar para aumentar la densidad de carga superficial de las partículas, ya que para que ésta sea elevada hay que usar concentraciones elevadas de iniciador y esto induce la síntesis de partículas de tamaño pequeño que en ausencia de emulsificante podrían ser inestables y agregarían espontáneamente. En el caso que nos ocupa, la finalidad de la segunda etapa es la de situar en la superficie de las partículas un tipo especial de grupo funcional: grupo clorometilo. En las *Tablas 9.3 y 9.4* se indican detalladamente las recetas empleadas en la síntesis de cada látex.

*Tabla 9.3.* Características de la reacción de síntesis del látex JM1.

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| temperatura               | 45 °C |
| estireno                  | 20 g  |
| estirensulfonato de sodio | 3 mM  |

|  |        |
|--|--------|
| agua   | 140 ml |
| NaHCO <sub>3</sub>                           | 9.5 mM |
| NaHSO <sub>3</sub>                           | 4 mM   |
| K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | 4.8 mM |
| revoluciones por minuto                      | 45     |
| tiempo de reacción                           | 12 h   |
| rendimiento                                  | 89.7 % |

Tabla 9.4. Características de la reacción de síntesis del látex JX2.

|  | 1ª Etapa | 2ª Etapa |
|--|----------|----------|
| semilla                                      | -        | 150 g    |
| temperatura                                  | 90 °C    | 60 °C    |
| estireno                                     | 526 g    | -        |
| clorometilestireno                           | -        | 18.4 g   |
| agua   | 1250 g   | 30 g     |
| aerosol MA80                                 | 16.94 g  | -        |
| NaHCO <sub>3</sub>                           | 2 g      | -        |
| NaS <sub>2</sub> O <sub>5</sub>              | -        | 0.224 g  |
| K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | 2 g      | -        |
| revoluciones por minuto                      | 250      | 200      |
| tiempo de reacción                           | 24 h     | 4 h      |
| rendimiento                                  | 100 %    | 100 %    |

El objetivo de los grupos clorometilo está relacionado con el fenómeno de la adsorción. Normalmente, en la adsorción de proteínas sobre un látex las interacciones entre proteína y superficie adsorbente tienen carácter no covalente (las mencionadas al inicio de este capítulo) y dan lugar a la denominada *adsorción física* (Della Gatta, 1985), caracterizada por una energía de Gibbs de adsorción relativamente baja. Sin embargo, como la molécula de proteína establecerá numerosos contactos con la superficie, la superposición de múltiples dará lugar a una energía de Gibbs molar de adsorción considerable. En determinadas situaciones es posible que la adsorción lleve consigo un acoplamiento covalente entre la proteína y la superficie si en dicha superficie se localizan

grupos funcionales que permitan tales enlaces. Éste tipo de adsorción, denominada *adsorción química* (Della Gatta, 1985), está caracterizada por una energía de Gibbs de adsorción mucho mayor que en el caso anterior y presenta ventajas frente a la adsorción física para ciertos propósitos (Bale Oenick et al., 1991; Betton et al., 1992; Löfas et al., 1993; Konings et al., 1993; Gebben et al., 1994; Peula García, 1995; Peula García et al., 1998; Ortega Vinuesa, 1995; Ortega Vinuesa et al., 1995b; Ortega Vinuesa et al., 1996; Bastos González et al., 1995; Molina Bolívar, 1995). Aunque la adsorción física es irreversible y no se produce desorción frente a dilución, sí se produce desorción frente a cambios de composición del medio (variaciones en la fuerza iónica iónica y el *pH*, o presencia de macromoléculas con similar o mayor tendencia a adsorberse sobre la superficie polimérica, tales como los surfactantes), siendo éste un efecto no deseado en algunas aplicaciones biotecnológicas o industriales de dispersiones de partículas poliméricas que en su superficie presentan moléculas de proteína ancladas (ej. test de inmunodiagnóstico, biosensores). Si la unión de la proteína a la superficie adsorbente se realiza a través de un enlace químico covalente se elimina este problema. Otra consecuencia directa de la adsorción física es la posible desnaturalización de la molécula proteica adsorbida, siendo éste también un fenómeno que se debe evitar si es imprescindible que la proteína localizada anclada sobre la superficie conserve su actividad biológica intacta en relación, nuevamente, con el interés de su aplicación biotecnológica o industrial (ej. enzimas anclados en la superficie de partículas permiten ser utilizados como catalizadores de reacciones fácilmente reutilizables (Bowers et al., 1976)). Si la proteína se une covalentemente a un grupo químico superficial es más probable que permanezca unida siempre con la misma conformación. Y esto queda garantizado si existe un grupo separador o espaciador entre el grupo químico enlazante y la superficie, ya que no llegaría a establecerse un contacto real entre la proteína y la superficie adsorbente. También se puede indicar que en la adsorción química las interacciones hidrofóbicas ya no serán determinantes en el proceso de adsorción y se pueden emplear superficies hidrofílicas, en las que en general será menor el nivel de interacciones específicas con las proteínas (Konings et al., 1993). Existen además otras diferencias entre la adsorción física y la adsorción química: en la adsorción química la entalpía de adsorción es mayor y aparece una barrera energética o energía de activación considerable, en la adsorción física la influencia de la temperatura es mayor, en la adsorción química se forma una monocapa de

moléculas adsorbidas y en la adsorción física se pueden llegar a formar multicapas y la isoterma diferencial de adsorción física,  $d\Gamma_{ADS}/d\Gamma_0$  en función de  $\Gamma_0$ , presenta un perfil más abrupto que en la adsorción química.

Existen muchos tipos de grupos químicos que hacen posible la adsorción química de proteínas. Se pueden clasificar en dos grupos: aquellos que necesitan una reacción previa de activación antes de poder unirse covalentemente a la proteína (carboxilo, hidroxilo, amina, amida) y aquellos que no requieren tal proceso de acondicionamiento (aldehído, epóxido, clorometilo, vinilbenceno, sulfóxido). Un inconveniente de los grupos clorometilo es la posibilidad de que se produzca hidrólisis y se conviertan en grupos hidroximetilo desprendiendo Cl. Aunque los grupos hidroximetilo también permitirán la unión covalente de la proteína, alterarán el proceso de adsorción introduciendo una heterogeneidad en la superficie adsorbente. Las condiciones en que se ve impedida esta reacción de degradación se han establecido (*Molina Bolívar, 1995*). La adsorción química mediante grupos clorometilo consiste en la formación de un enlace covalente entre el grupo clorometilo y un grupo amino de la proteína a través de la reacción de sustitución nucleofílica unimolecular:



donde  $P$  es la molécula de proteína y  $L$  representa la superficie de las partículas de látex. Como en general una proteína posee varios grupos amino que pueden reaccionar de esta manera (grupo amino terminal y grupos amino de la cadena lateral de los restos aminoácidos en la cadena polipeptídica), en principio, una molécula de proteína puede establecer más de un contacto covalente con la superficie adsorbente.

Las características de cada látex empleado en los experimentos de adsorción se resumen en la *Tabla 9.5*.

*Tabla 9.5.* Características de cada látex empleado en los experimentos de adsorción.

|  |     |     |
|--|-----|-----|
|  | JX2 | JM1 |
|--|-----|-----|

|                                      |   |                                |
|--------------------------------------|---|--------------------------------|
| diámetro de partícula                | 204 nm  | 195 nm                         |
| índice de polidispersidad            | 1.0045  | 1.0050                         |
| densidad de carga superficial        | -3.1 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$                                    | -4.2 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ |
| grupos funcionales superficiales     | sulfonato $-\text{SO}_3^-$<br>clorometilo $-\text{CH}_2\text{Cl}$ | sulfonato $-\text{SO}_3^-$     |
| concentración crítica de coagulación | 300 mM  | 365 mM                         |

Como los grupos funcionales responsables de la carga superficial de ambos látex son grupos ácido fuerte (grupos sulfonato), la densidad de carga superficial apenas sufrirá cambios a valores de  $pH$  mayores que 3. Frente a los grupos sulfato de un látex convencional en que se utiliza persulfato como iniciador, un látex con grupos sulfonato, en los que se utiliza bisulfito como iniciador, presenta la ventaja de una mayor estabilidad de estos grupos frente al proceso de hidrólisis. Los grupos clorometilo no aportan carga, aunque sí disminuirán el carácter hidrofóbico de la superficie de las partículas al estar parcialmente polarizado el enlace C-Cl. Las partículas del látex JX2 poseen una densidad de grupos clorometilo de 2.7 grupos/ $\text{nm}^2$  (121  $\mu\text{eq}/\text{g}$  de polímero).

Sobre las partículas del látex JM1 únicamente se producirá adsorción física, mientras que en el látex JX2 se producirá, simultáneamente o secuencialmente, adsorción química y física.

### *Índice de polidispersidad*

El índice de polidispersidad es un parámetro que informa acerca de la uniformidad de la distribución de tamaño y se evalúa mediante el cociente entre el producto de los momentos no centrados de orden 4 y orden cero y el producto de los momentos no centrados de orden 3 y orden 1 de la distribución de diámetro de partícula. Como criterio general, se considera que una dispersión es monodispersa u homodispersa cuando dicho índice posee un valor inferior a 1.05.

---

### *Densidad de carga superficial*

La densidad superficial de carga en cada látex se determina mediante valoraciones potenciométricas y conductimétricas de la dispersión (PHMETRO 2002 Y CONDUCTÍMETRO 525 CRISON INSTRUMENTS). Mediante la adición secuencial de una base fuerte (NaOH) o un ácido fuerte (HCl), dependiendo del tipo de grupos superficiales existentes en la superficie de las partículas, se determina el punto de equivalencia en la valoración potenciométrica o un cambio de pendiente en la valoración conductimétrica, pudiéndose calcular el número de grupos cargados que han sido neutralizados a partir de la cantidad de agente valorante utilizado. Realmente, la magnitud relevante es el valor de la densidad de carga en el plano de deslizamiento, es decir, la región de separación entre la parte rígida de la doble capa eléctrica que se desplaza solidaria a la partícula y la parte difusa de dicha estructura. Éste será el valor efectivo de la densidad de carga de la partícula, *densidad de carga electrocinética*, ya que existe una población de contra-iones que se desplazan con la partícula (se sitúan en la *capa de Stern*) cuyo efecto de apantallamiento produce una compensación parcial de la densidad de carga superficial (Quesada Pérez et al., 1998).

### *Concentración crítica de coagulación*

La concentración crítica de coagulación es la cantidad mínima de electrolito que se debe añadir para inducir la agregación rápida de las partículas que constituyen la dispersión. Se puede determinar de forma estática o dinámica. En el primer caso se somete un volumen de dispersión de partículas a concentraciones crecientes de electrolito, se espera un cierto tiempo y finalmente se observa si se ha producido agregación determinando el tamaño de los constituyentes elementales de la dispersión mediante la medida de la intensidad de luz dispersada a un cierto ángulo utilizando la técnica de espectroscopía de fotocorrelación (MALVERN II 4700c). En el segundo método, se somete un volumen dado de dispersión a concentraciones crecientes de electrolito y en cada caso se registra la evolución temporal de la intensidad de luz dispersada a un cierto

ángulo utilizando la técnica de espectroscopía de fotocorrelación (MALVERN II 4700c) o la densidad óptica del sistema mediante espectrofotometría (MILTON ROY SPECTRONIC 601). Si se produce agregación de partículas en la dispersión, la intensidad de luz dispersada o la turbidez aumentarán con el tiempo. Del análisis de las pendientes iniciales de las curvas de agregación se puede evaluar la concentración crítica de coagulación.

### *Porcentaje en peso*

El porcentaje en peso de la dispersión de látex (prácticamente coincide con la fracción de volumen porque la densidad del poliestireno es similar a la del agua) se determinó del mismo modo empleado para la obtención del coeficiente de extinción, es decir, mediante la medida del peso de varias muestras de látex que posteriormente son desecadas para evaluar el residuo seco. Este parámetro es esencial para conocer el área superficial correspondiente a un determinado volumen de dispersión de látex.

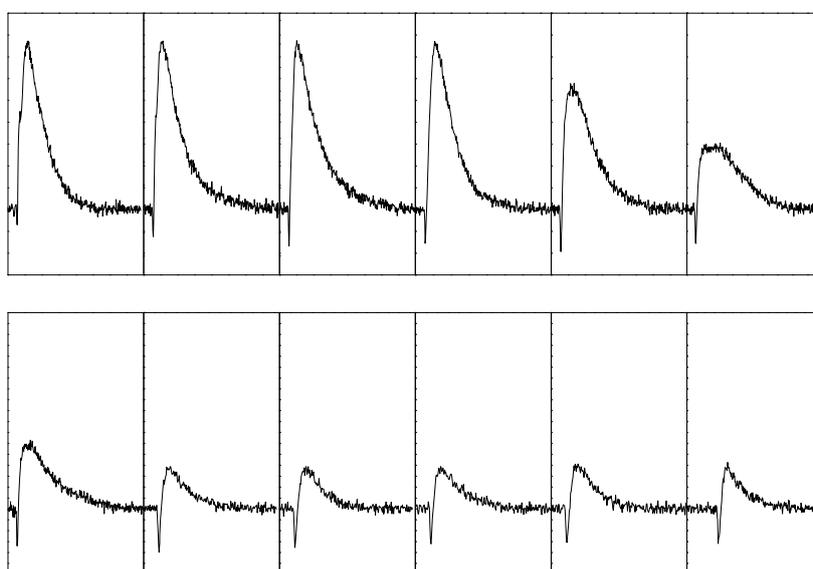
### *Microcalorimetría isotérmica de valoración*

Los experimentos de microcalorimetría se realizaron colocando 5 ml de dispersión tamponada de látex en la célula de medida ( $2 \text{ m}^2$  y  $1.82 \text{ m}^2$  de área superficial adsorbente para el látex JX2 y JM1, respectivamente) y 5 ml de agua destilada en la de referencia. Se inyectaba secuencialmente una disolución de proteína de en la célula de medida y agua destilada en la célula de referencia. Posteriormente a cada valoración calorimétrica se repetía todo el proceso, pero colocando solución tamponada en la célula de medida para realizar un experimento blanco con el fin de corregir los posibles efectos térmicos de inyección y de dilución de la proteína. Se adoptó este método debido a que inyectando disolución de proteína en ambas células, colocando látex en la de medida y solución tamponada en la de referencia, es difícil asegurar una perfecta cancelación del efecto de

---

dilución de proteína. Por otra parte, no se observó ningún efecto asociado a la dilución de la dispersión de látex. El volumen de inyección fue de 25  $\mu\text{l}$ . Se puede reducir este volumen, pero como en principio los calores asociados a un proceso de adsorción no son muy elevados, habría que utilizar concentraciones mayores de proteína.

En las Figuras 9.2 y 9.3 se muestran dos ejemplos de termogramas obtenidos correspondientes a la adsorción de MGB sobre látex. Las condiciones del experimento se indican en cada figura.



*Figura 9.2.* Termograma correspondiente a un registro del proceso de adsorción de MGB sobre el látex JM1 en las condiciones: pH 5, [KBr] 50 mM, 25°C.

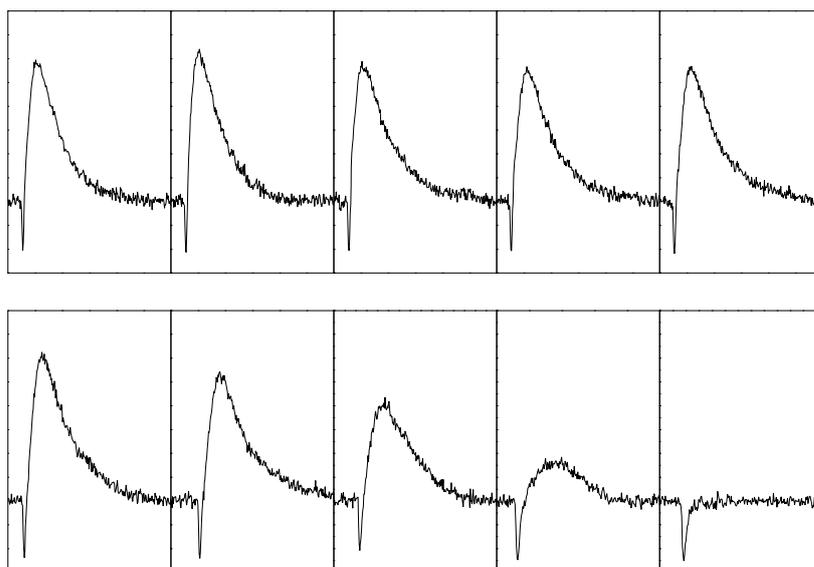


Figura 9.3. Termograma correspondiente a un registro del proceso de adsorción de MGB sobre el látex JM1 en las condiciones: pH 7, [KBr] 50 mM, 35°C.

### *Isotermas de adsorción*

Los experimentos correspondientes a la obtención de las isotermas de adsorción se han llevado a cabo mediante la realización secuencial de un número determinado de inyecciones idénticas de disolución MGB a volúmenes iguales de una dispersión de látex. Se podría decir que es una *isoterma de adsorción secuencial*. El objetivo de la modificación del método convencional (Galisteo González, 1992; Martín, 1993; Bastos González, 1993; Ortega Vinuesa, 1995; Peula García, 1995) es conseguir que el experimento realizado para obtener la isoterma de adsorción sea idéntico, en la medida de lo posible, al experimento microcalorimétrico. Además, en el proceso de adsorción de proteínas pueden surgir fenómenos cinéticos acoplados con posibles cambios conformacionales inducidos por la adsorción (van Dulm, et al., 1983; Pefferkorn, 1995; Filippova, 1997). Esto provocaría que apareciesen máximos en la cantidad adsorbida de proteína a concentraciones intermedias y también máximos en la cantidad adsorbida a tiempos intermedios en isotermas cinéticas. Podría comprenderse cómo puede afectar al

---

resultado final sobre la cantidad adsorbida el hecho de realizar la isoterma de adsorción de forma secuencial o de la forma estándar: si se añaden sucesivamente cantidades de proteína el proceso cinético es diferente del que tiene lugar cuando se añade la misma cantidad total de una sola vez. En el primer caso la velocidad de adsorción no es muy elevada y hay tiempo para que las moléculas de proteína se acomoden en la superficie adsorbente y, si es el caso, se desplieguen desnaturalizándose parcialmente (la tendencia a desnaturalizarse puede competir o favorecer la adsorción posterior de otra molécula de proteína) o, debido a la posible movilidad superficial, se acoplen para ocupar de modo más efectivo la superficie dejando menos huecos no recubiertos. Cuando se inyecta una única cantidad total, y conforme sea mayor la cantidad añadida, hay menos probabilidad de que se produzcan estos fenómenos. Como lo que interesa es determinar fielmente qué cantidad de proteína se adsorbe en cada una de las inyecciones realizadas en un experimento microcalorimétrico secuencial, es recomendable utilizar el método secuencial.

El método finalmente seguido consiste en la realización secuencial de un número determinado de inyecciones idénticas de disolución MGB a volúmenes iguales de una dispersión de látex. Mientras se realizaba el experimento de adsorción se mantenían las muestras en un baño termostático a 25°C y sometidas a agitación suave. Finalizado cada experimento las muestras con la dispersión de látex y la proteína adsorbida eran centrifugadas inmediatamente durante 30 minutos a 16000 revoluciones por minuto (35300 g) en una centrifugadora (ROTOR JA17 BECKMAN J2-HC). Se separaba el sobrenadante de cada muestra y se hacía pasar a través de un filtro (MILLEX-VV MILLIPORE 100 nm de baja afinidad respecto a las proteínas) para eliminar posibles partículas que no hubiesen sedimentado durante la centrifugación o que se hubiesen redispersado durante la manipulación de las muestras. Se determinaba la concentración de proteína en disolución después de la adsorción en el sobrenadante filtrado y se evaluaba la cantidad adsorbida por simple balance de masas. En cada experimento siempre se utilizó una muestra de látex a la que no se añadía proteína y que se sometía a todo el tratamiento del experimento, por lo que servía como blanco en el ajuste del cero para la medida de concentraciones de proteína. Se puede determinar también la concentración de proteína espectrofotométricamente directamente sobre las partículas poliméricas (*Basinska et al., 1991*), de modo que se eliminan posibles errores en el método estándar, ya que en éste

último toda la proteína desaparecida del sobrenadante se supone adsorbida y la cantidad adsorbida se obtiene mediante 2 medidas independientes de concentración y, por tanto, con error el doble del de éstas.

### **9.3. Resultados experimentales y discusión.**

#### *9.3.1. Efecto del pH.*

Se ha estudiado el efecto del *pH* sobre la adsorción de MGB sobre el látex JX2 y sobre el látex JM1. Para ello se obtuvieron las isotermas de adsorción y las curvas de valoración, según los procedimientos explicados anteriormente, a diferentes valores de *pH* y en idénticas condiciones experimentales: 25°C, concentración de KBr 50mM. Los valores de *pH* se ajustaron utilizando tampones acetato, fosfato y borato a baja fuerza iónica (concentración < 2 mM). El área de superficie adsorbente empleada fue de 2 m<sup>2</sup> para el látex JX2 y de 1.82 m<sup>2</sup>. En la *Figuras 9.4.A* y *9.4.B* se muestran las isotermas de adsorción para cada látex y para tres valores de *pH* diferentes. En ella se representa la cantidad adsorbida por unidad de superficie adsorbente,  $\Gamma_{ADS}$ , en función de la cantidad añadida,  $\Gamma_0$ .

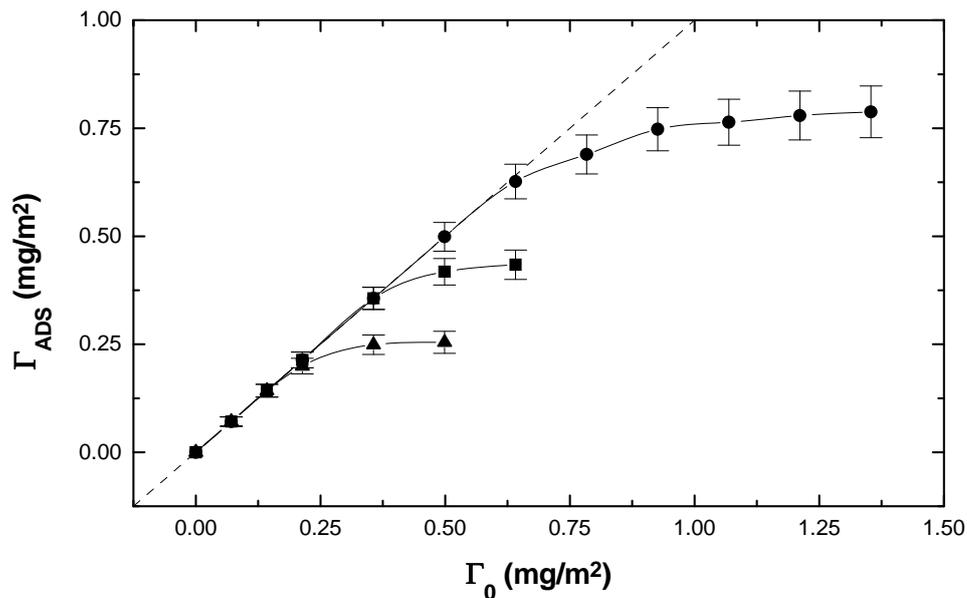


Figura 9.4.A. Isothermas de adsorción de MGB sobre el látex JX2 ([KBr]=50mM,  $T=25^\circ\text{C}$ ).  
Efecto del  $pH$ : (●)  $pH=5$ , (■)  $pH=7$ , (▲)  $pH=9$

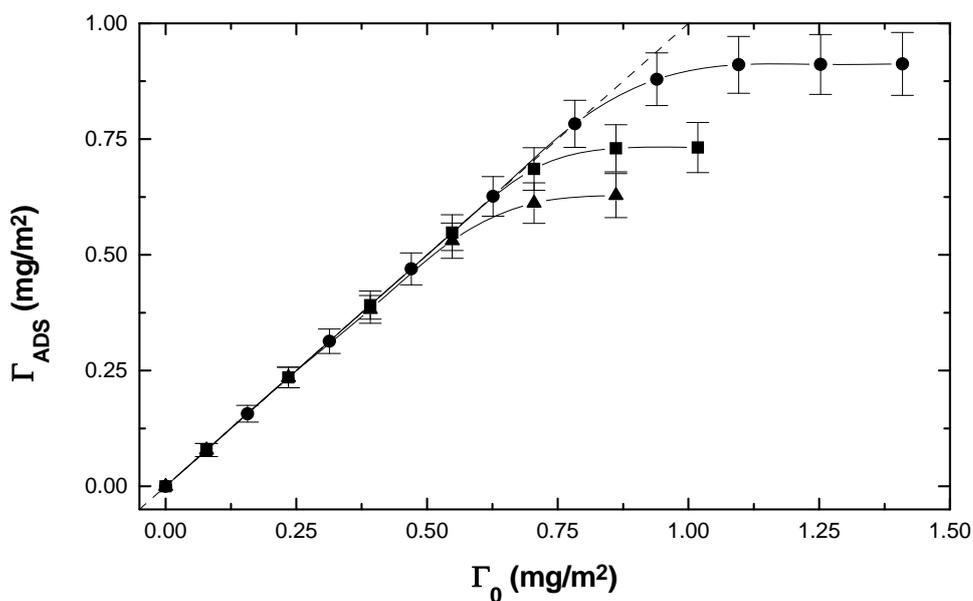


Figura 9.4.B. Isothermas de adsorción de MGB sobre el látex JM1 ([KBr]=50mM,  $T=25^\circ\text{C}$ ). Efecto del  $pH$ : (●)  $pH=5$ , (■)  $pH=7$ , (▲)  $pH=9$

Las curvas isothermas obtenidas son de alta afinidad, incluso cuando existe repulsión coulombiana entre superficie y proteína ( $pH$  9), siendo éste un primer indicio de que no se puede aplicar el modelo de Langmuir para analizar los datos. Este es un hecho

frecuentemente encontrado por otros autores, si bien en algunos trabajos (*Galisteo et al., 1994b; Elgersma et al., 1990*) se ha encontrado pendientes distintas de la unidad y, por tanto, afinidades pequeñas en la adsorción de IgG (inmuno-gamma-globulina) y BSA. Se puede suponer que la adsorción a  $pH$  9 está acompañada de una transferencia de cationes desde la disolución hacia la interfase (efecto del medio iónico) cuyo objetivo es disminuir la densidad de carga y el potencial electrostático en la capa de proteína adsorbida y minimizar la repulsión electrostática entre la superficie adsorbente y la proteína.

Existe adsorción total de proteína hasta valores de porcentaje de recubrimiento por encima del 50%. El valor máximo del porcentaje de recubrimiento crítico hasta el cual se produce adsorción total de proteína corresponde al caso de  $pH$  7, lo que es lógico si tenemos en cuenta que en tales condiciones la proteína presenta carga electrocinética neta nula y las moléculas adsorbidas estarán sometidas a una menor interacción lateral coulombiana y dipolar.

En ambos látex existe una fuerte dependencia de la cantidad máxima adsorbida respecto del valor de  $pH$ , pero esta influencia es un poco menor en el látex JM1. En la *Tabla 9.6* se indican los valores de máxima cantidad adsorbida para cada látex y se puede comprobar que la razón entre las cantidades máximas adsorbidas según los diferentes valores de  $pH$  es de 1.8 para el látex JX2 y de 1.2 para el látex JM1. La máxima cantidad adsorbida es mayor siempre para el látex JM1, por lo que se puede considerar más hidrofóbico que el JX2, teniendo en cuenta las características superficiales de cada látex. En condiciones idénticas, una mayor adsorción sobre el látex JM1 sugiere que este es más hidrofóbico (*Norde et al., 1991a; Kondo et al., 1991*). Prácticamente poseen la misma densidad de grupos sulfonato, pero el látex JX2 posee una elevada densidad de grupos clorometilo que pueden aportar cierto carácter hidrofílico. Además, la diferencia es creciente conforme el  $pH$  disminuye. Todo esto sugiere que, si bien en ambos látex la adsorción está determinada por la interacción electrostática entre proteína y superficie, en el látex JM1 hay un efecto considerable de las interacciones hidrofóbicas. No obstante, en el látex JX2 también debe haber una contribución de las interacciones hidrofóbicas, ya que es posible la adsorción en condiciones de repulsión electrostática entre MGB y superficie adsorbente.

La afirmación de que el látex JX2 debe ser más hidrofílico (menos hidrofóbico) que el JM1 se basa en la influencia del pH sobre las isothermas de adsorción. Algunos autores (*van Oss, 1966; Shirahama et al., 1990; Kondo et al., 1991*) establecen que la adsorción sobre una superficie hidrofílica está determinada fundamentalmente por las interacciones electrostáticas y presenta una influencia muy acusada respecto del  $pH$ , mientras que en la adsorción sobre una superficie hidrofóbica predominan las interacciones hidrofóbicas y la influencia del  $pH$  es mucho menor. Esta es la situación encontrada con los dos látex utilizados.

Tabla 9.6. Cantidad máxima adsorbida de MGB,  $\Gamma_{ADS}^{MAX}$  (mg/m<sup>2</sup>), en función del  $pH$  de adsorción.

| $pH$ | JX2  | JM1  |
|------|------|------|
| 5    | 0.80 | 0.91 |
| 7    | 0.44 | 0.74 |
| 9    | 0.25 | 0.63 |

La cantidad máxima adsorbida es siempre menor que el valor teórico correspondiente a una monocapa de moléculas adsorbidas, que es de 1.24-2.00 mg/m<sup>2</sup>, dependiendo de la orientación de la molécula proteica adsorbida y suponiendo que hay una capa de hidratación de 0.5 nm alrededor de la molécula de MGB y que no hay desplegamiento en la superficie adsorbente ni interacción lateral entre moléculas adsorbidas. Además, en las isothermas no se observa ningún *escalón* que pueda sugerir la formación de multicapa o cambios en la conformación u orientación de las moléculas adsorbidas. Por tanto, se puede afirmar que la adsorción se produce en monocapa.

En cada látex la superficie adsorbente posee una densidad superficial de carga negativa constante en el intervalo de  $pH$  considerado, mientras que la MGB posee carga

neta positiva, nula y negativa cuando el valor del  $pH$  es de 5, 7 y 9, respectivamente. El hecho de que la máxima cantidad adsorbida sea función decreciente del  $pH$  y no alcance un máximo en el punto isoeléctrico de la proteína sugiere que la interacción lateral entre proteínas no debe suponer una barrera energética determinante que condicione la adsorción. En estudios de adsorción de proteínas se ha encontrado un comportamiento muy diferente en que se observa un máximo en la cantidad máxima adsorbida para un valor de  $pH$  cercano al punto isoeléctrico de la proteína o cercano al punto isoeléctrico del complejo látex-proteína, que se justifica teniendo en cuenta la interacción lateral entre moléculas de proteína originada por la repulsión electrostática y por el posible desplegamiento de las moléculas en la interfase, considerando además que la interacción entre la superficie adsorbente y la proteína juega un papel poco determinante (Norde, 1976; Norde et al., 1978; Norde, 1994; Bagchi et al., 1981; Elgersma et al., 1990; Elgersma et al., 1991; Kondo et al., 1991; Johnson et al., 1992; Martín Rodríguez et al., 1992; Ortega Vinuesa et al., 1993; Ortega Vinuesa et al., 1994; Ortega Vinuesa et al., 1995c; Haynes et al., 1994; Galisteo et al., 1992; Galisteo et al., 1994a; Galisteo et al., 1994b; Galisteo et al., 1995; ).

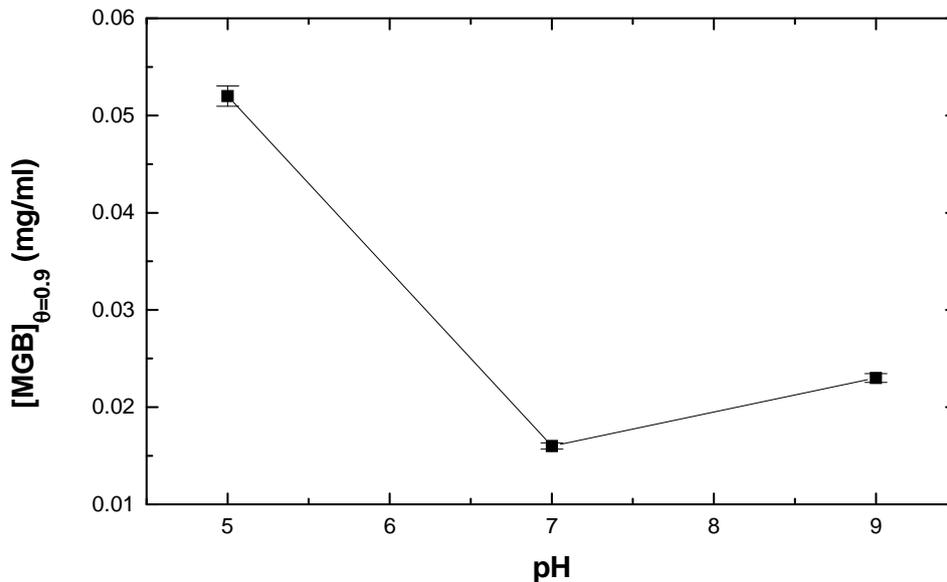
Lejos del punto isoeléctrico aparecen tres tipos de interacciones intermoleculares entre las moléculas localizadas en la superficie adsorbente: culombiana, dipolar y estérica. La primera proviene de la existencia de carga neta no nula en la molécula de proteína, la segunda de una distribución no uniforme de dicha carga en la molécula y la tercera tiene su origen en los posibles cambios conformacionales que sufren las moléculas adsorbidas y que pueden dificultar (o favorecer) la adsorción subsiguiente de nuevas moléculas de proteína. La existencia de carga neta no nula en la molécula proteica provoca una repulsión culombiana entre grupos cargados que no favorece la estructura compacta nativa y posibilita un cambio conformacional en el que la molécula se despliega en la interfase y el interior apolar se expone hacia la superficie aislado del disolvente. Ya se ha mencionado que la estabilidad conformacional de la proteína está íntimamente relacionada con la posibilidad de dicho desplegamiento en la superficie. En el punto isoeléctrico las moléculas de proteína presentarán también, en mayor o menor medida, estos tres tipos de interacciones.

Aunque en nuestro caso las posibles interacciones intermoleculares de la proteína

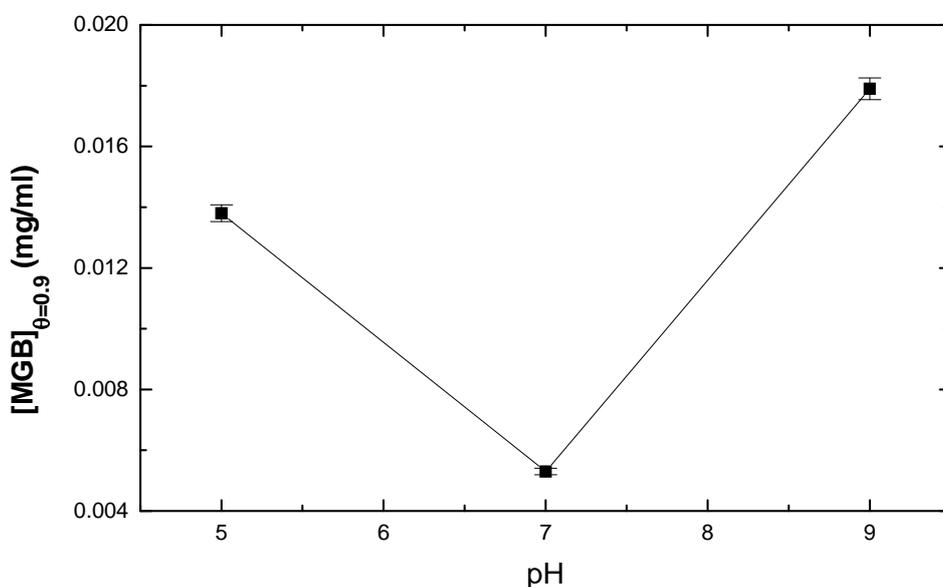
adsorbida no determine completamente la cantidad máxima adsorbida, éstas deben estar presentes. Un modo de poner en evidencia la existencia y la importancia de las interacciones laterales entre las moléculas de MGB adsorbidas es la determinación de la concentración de proteína en disolución necesaria para alcanzar un 90% de recubrimiento de la superficie. Cuanto mayor sea esta concentración, mayor deberá ser la barrera energética que tienen que vencer las moléculas de proteína y menor será la tendencia de éstas para adsorberse. El grado de recubrimiento de la superficie adsorbente se define como:

$$\theta = \frac{\Gamma_{ADS}}{\Gamma_{ADS}|_{MÁX}} \quad (9.1)$$

donde  $\Gamma_{ADS}|_{MÁX}$  es la máxima cantidad adsorbida correspondiente al valor límite de saturación de dicha superficie. En la *Figuras 9.5.A y 9.5.B* se muestran los valores de concentración de MGB cuando se ha recubierto el 90% de la superficie,  $[MGB]_{\theta=0.9}$ , obtenidos de las curvas isotermas de la *Figura 9.4.A y 9.4.B*, en función del *pH* de adsorción.



*Figura 9.5.A.* Concentración de MGB en disolución cuando el grado de recubrimiento es 0.9 en función del *pH* de adsorción para el látex JX2.



*Figura 9.5.B.* Concentración de MGB en disolución cuando el grado de recubrimiento es 0.9 en función del *pH* de adsorción para el látex JM1.

Se observa que el mínimo aparece en el punto isoelectrico. Esto indica que las interacciones laterales coulombianas o estéricas (debidas al desplegamiento o cambio conformacional) de las moléculas de proteína adsorbidas en condiciones de carga electrocinética neta no nula dificultan la adsorción, aunque como se estableció anteriormente, no suponen un impedimento notable. Para el látex JX2 el valor de  $[MGB]_{\theta=0.9}$  es menor a *pH* 9 que a *pH* 5, lo que sugiere que la interacción lateral es menor en el primer caso. Esto se puede explicar si tenemos en cuenta que en dicha situación debe existir una transferencia de cationes hacia la interfase que provoca una reducción en la repulsión entre superficie y proteína y, por consiguiente, entre moléculas de proteína. Sin embargo, para el látex JM1 la situación es la contraria; en este caso la coadsorción de cationes no reduce de forma tan considerable la interacción lateral entre moléculas adsorbidas. Parece ser que en el látex JM1, además de la contribución de la repulsión electrostática a la interacción lateral, posiblemente hay una contribución debida al desplegamiento de la proteína sobre la superficie.

En la *Figura 9.6* se muestra un ejemplo de valoración microcalorimétrica en que se

representa el calor diferencial de adsorción de MGB sobre el látex JX2 en función de la concentración total de proteína (adsorbida y no adsorbida).

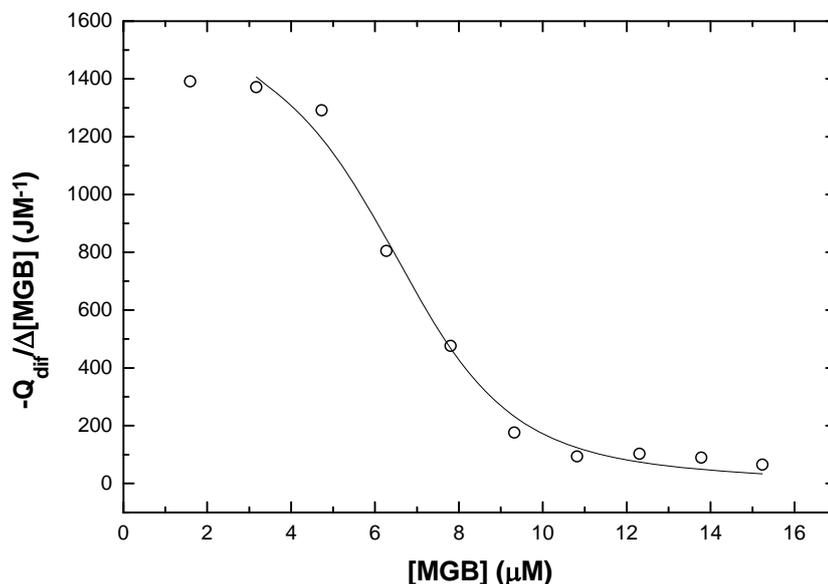


Figura 9.6. Valoración microcalorimétrica. Calor diferencial de adsorción de MGB sobre látex JX2 ( $pH$  7,  $[KBr]=50$  mM y  $25^{\circ}C$ ). En trazo continuo se indica el ajuste según la ecuación (8.2).

Se observa que la curva de valoración calorimétrica tiene una forma muy parecida a la típica de un experimento de unión de un ligando a una macromolécula bajo equilibrio químico, tal como los realizados en el Capítulo 8. En el caso que nos ocupa ahora podemos suponer que la partícula de látex es la *macromolécula* que posee numerosos sitios de unión (adsorción) y la molécula de MGB es el *ligando*. Por tanto, podemos aplicar la ec. (8.2) considerando los oportunos paralelismos. Sin embargo, de los datos del ajuste se obtiene que el número de sitios de adsorción es de 1400 aproximadamente, cuando el número real de moléculas adsorbidas, según los datos de la isoterma correspondiente, es de unas 3000 en cada partícula de látex. Esta estimación se obtiene a partir de la cantidad máxima adsorbida determinada mediante las isotermas de adsorción y del número de partículas de látex dispersas en el medio. Para evaluar esta última cantidad es imprescindible que el látex empleado sea monodisperso, ya que se realiza mediante la determinación del tamaño de partícula y del porcentaje en peso de la dispersión de partículas.

En las Figuras 9.7-9.9 se muestran las curvas de valoración microcalorimétrica que representa la entalpía molar de adsorción (kJ por mol de MGB adsorbida) en función del grado de recubrimiento de la superficie adsorbente.

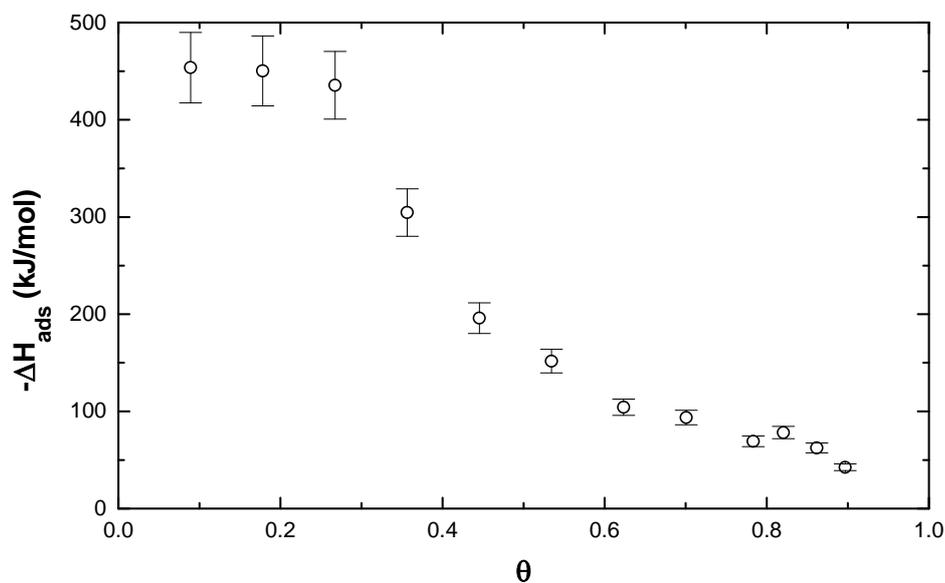


Figura 9.7.A. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JX2 en función del grado de recubrimiento ( $pH=5$ ,  $[KBr]=50mM$ ,  $T=25^{\circ}C$ ).

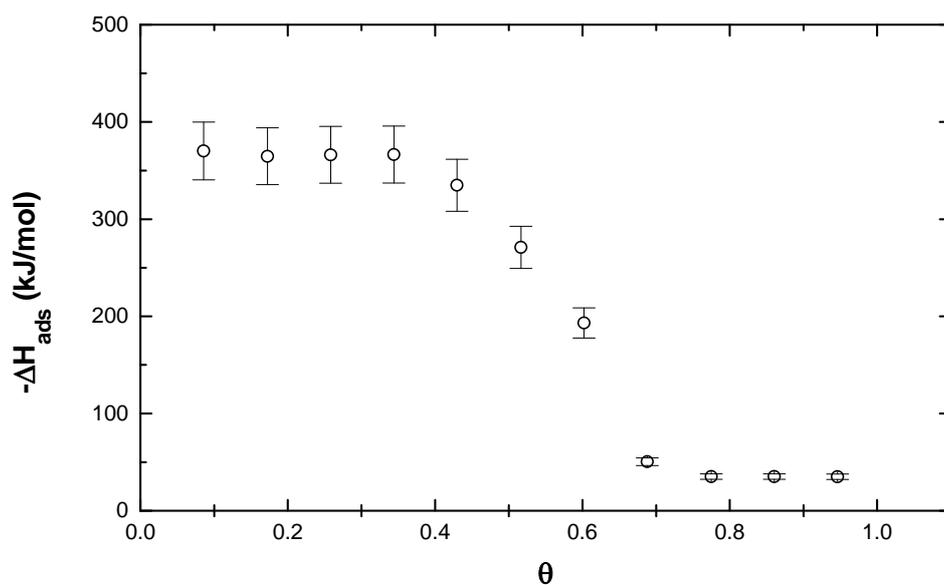


Figura 9.7.B. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JM1 en función del

grado de recubrimiento ( $pH=5$ ,  $[KBr]=50mM$ ,  $T=25^{\circ}C$ ).

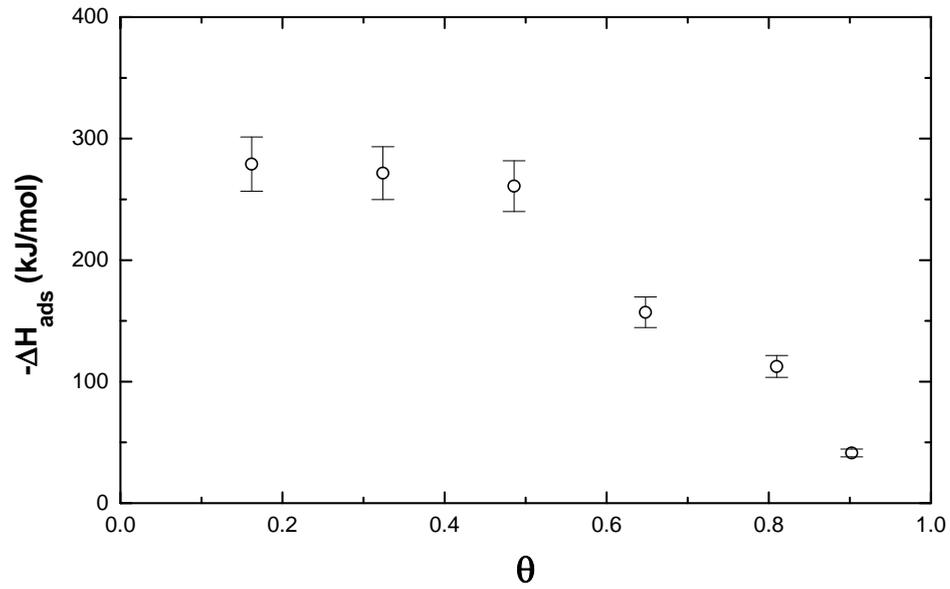


Figura 9.8.A. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JX2 en función del grado de recubrimiento ( $pH=7$ ,  $[KBr]=50mM$ ,  $T=25^{\circ}C$ ).

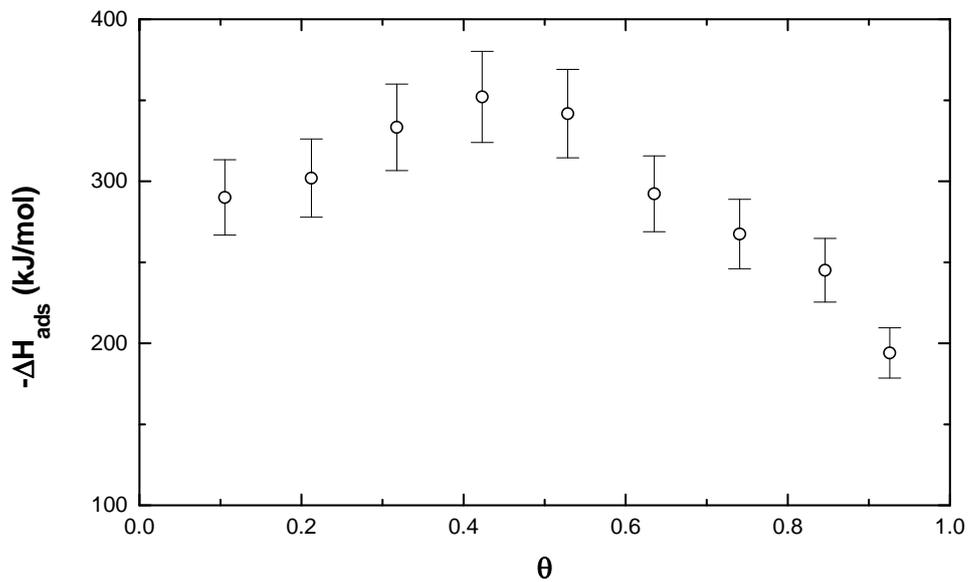


Figura 9.8.B. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JM1 en función del grado de recubrimiento ( $pH=7$ ,  $[KBr]=50mM$ ,  $T=25^{\circ}C$ ).

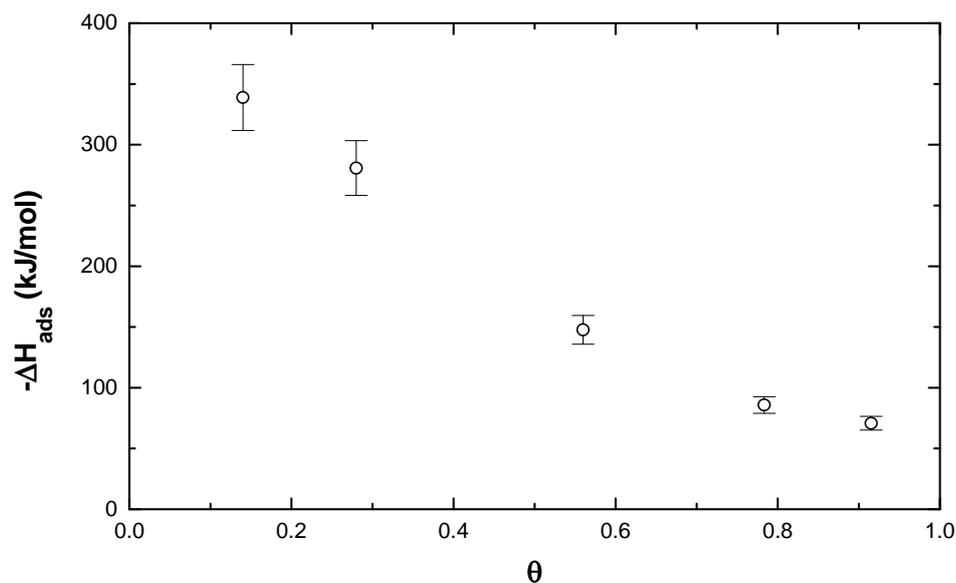


Figura 9.9.A. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JX2 en función del grado de recubrimiento ( $pH=9$ ,  $[KBr]=50\text{mM}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ).

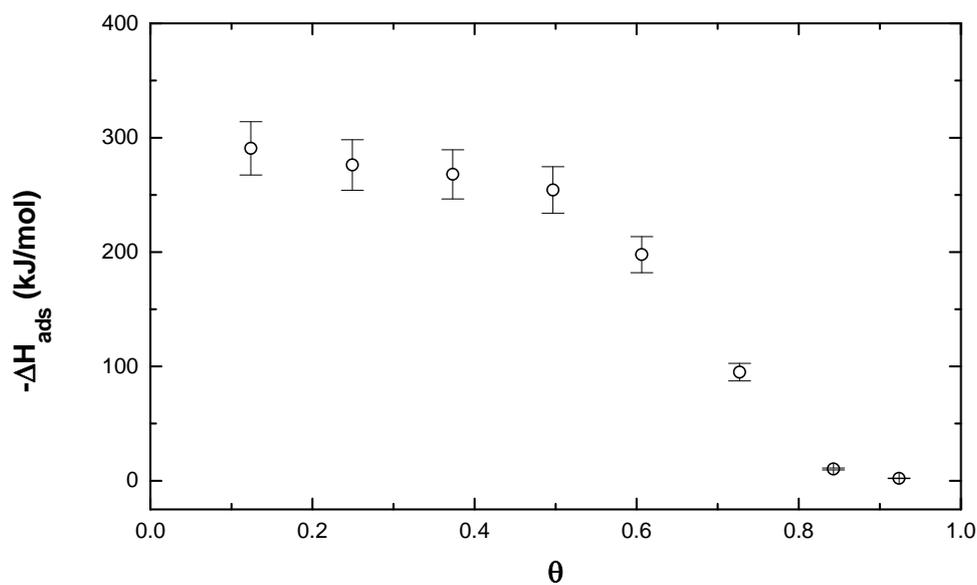


Figura 9.9.B. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JM1 en función del grado de recubrimiento ( $pH=9$ ,  $[KBr]=50\text{mM}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ).

En general, se obtienen valores considerables de la entalpía molar de adsorción y no existe mucha diferencia entre los valores máximos en ambos látex en cada una de las condiciones. Esto sugiere que la proteína no se está enlazando covalentemente con la

---

superficie del látex JX2 a través de los grupos clorometilo o que la proteína sobre la superficie del látex JM1 establece muchos contactos no covalentes con la superficie, hecho que se vería favorecido por el desplegamiento de la proteína sobre una superficie hidrofóbica como es la de dicho látex. Si se evaluara la entalpía de adsorción por residuo anclado a la superficie, dicho valor ya no sería tan elevado, sino que tendría los valores característicos de los enlaces de hidrógeno o de interacciones de van der Waals. Según la bibliografía, la unión covalente de proteína a una superficie mediante grupos Cl es fuertemente dependiente de la temperatura. En un estudio realizado sobre la adsorción de BSA (albúmina de suero bovino) sobre látex con grupos superficiales clorometilo (*Suen et al., 1985*) se encuentra que a 35°C el número de enlaces covalentes por molécula es 12 veces mayor que a 25°C (22/1.8). Esto indica que en nuestro caso va a predominar la adsorción física, posiblemente favorecida por una desnaturalización parcial de la proteína de modo que se maximice el número de contactos físicos con la superficie, aunque habrá algunos contactos covalentes que, al ser mucho más exotérmicos, tendrán un peso relativo energéticamente importante.

El hecho de que el valor de la entalpía de adsorción a *pH* 5 a bajo recubrimiento sea mayor que a *pH* 7 se justifica si tenemos en cuenta la interacción coulombiana favorable entre proteína y superficie adsorbente. Sin embargo, el elevado valor (negativo) de la entalpía de adsorción a *pH* 9 a bajo recubrimiento, en condiciones de repulsión electrostática entre proteína y superficie adsorbente, indica nuevamente que hay un proceso de transferencia de cationes desde la disolución hasta la interfase (efecto del medio iónico) que favorece la adsorción en estas condiciones adversas (*Koutsoukos et al., 1982; Norde et al., 1979; Norde et al., 1991; Norde et al., 1994; van Dulm et al., 1981; Arai et al., 1990*). La entalpía de transferencia de  $K^+$  desde agua a disolventes no acuosos tiene un valor entre -7 y -26 kJ/mol (*Norde, 1976*).

Una de las características más acentuadas de las curvas de entalpía es el hecho de que la entalpía de adsorción no exhibe un valor constante independiente del recubrimiento. Si se verificasen las hipótesis del modelo de Langmuir (ausencia de interacciones entre moléculas de soluto y entre soluto y disolvente, superficie adsorbente energéticamente homogénea, conformación y orientación de las moléculas adsorbidas independientes del

grado de recubrimiento de la superficie adsorbente) se debería mantener constante el valor de  $\Delta H_{ADS}$  para todos los valores del grado de recubrimiento. Por tanto, alguna de las hipótesis no es cierta en el proceso de adsorción de proteínas. Teniendo en cuenta las dimensiones de la proteína y las características del látex JM1 y del látex JX2, cuya superficie está constituida íntegramente por clorometilostireno y cuya densidad de grupos clorometilo es de 2.7 grupos/nm<sup>2</sup>, ambas superficies se pueden considerar homogéneas electroquímicamente. No es ilógico pensar que los grupos sulfonato, con densidades de 0.19 y 0.25 grupos/nm<sup>2</sup> para el JX2 y el JM1, se encuentran igualmente distanciados sobre la superficie, ya que el *pH* de síntesis de ambos látex es básico. Sin embargo, la propia adsorción de la proteína genera una heterogeneidad intrínseca en tal proceso, debido a que las moléculas de proteína interactúan entre sí (aún teniendo la proteína carga electrocinética neta nula, puede existir interacción intermolecular electrostática, dipolar o estérica) y pueden dificultar o favorecer la adsorción de nuevas moléculas. En las condiciones estudiadas se observa que existe un impedimento cada vez mayor para continuar la adsorción conforme la superficie se va recubriendo, que se traduce en que el proceso de adsorción es menos exotérmico. Casi todas las curvas presentan un valor constante de entalpía molar de adsorción prácticamente constante a bajo recubrimiento que precede a un cambio pronunciado en ésta. Esto sugiere, según lo comentado anteriormente, que a bajo recubrimiento se produce una adsorción independiente y conforme avanza el proceso la interacción lateral intermolecular dificulta la adsorción; el hecho de que la entalpía molar de adsorción no sea constante en todo el intervalo de grado de recubrimiento sería reflejo de la existencia de tales interacciones laterales. De este modo, un nuevo dato que ayudaría a evaluar la importancia de la interacción lateral entre moléculas adsorbidas y moléculas que intentan adsorberse es el valor de  $\theta$  hasta el cual el valor de la entalpía molar de adsorción se mantiene más o menos constante. En el látex JX2, a *pH* 7 el valor constante de  $\Delta H_{ADS}$  se mantiene hasta  $\theta=0.5$ , situación en que hay menos superficie no recubierta que recubierta, mientras que a *pH* 9 el intervalo de entalpía molar de adsorción constante es más reducido, cuando todavía hay un porcentaje considerable de superficie no recubierta, y a *pH* 5 es inexistente. En estos dos últimos casos hay que tener en cuenta las interacciones coulombianas y dipolares intermoleculares y las interacciones estéricas intermoleculares debido al posible desplegamiento de las moléculas en la interfase promovido por la existencia de carga neta en la proteína. Aunque

---

podría parecer extraño afirmar que pudieran surgir interacciones electrostáticas repulsivas a bajo recubrimiento, se ha indicado (Duinhoven *et al.*, 1995a; Duinhoven *et al.*, 1995b) que son posibles las interacciones repulsivas de largo alcance aunque la longitud de Debye de la atmósfera iónica sea de pocos nanómetros. En el caso del látex JM1, a cualquiera de los tres valores de *pH* el intervalo de entalpía molar de adsorción constante se extiende un poco más que en el látex JX2 lo que confirma que la interacción electrostática no es la fuerza conductora determinante de la adsorción de MGB sobre esta superficie. Es interesante el resultado obtenido en la adsorción de MGB sobre el látex JM1 a *pH* 7, que es el punto isoeléctrico de la primera. La entalpía molar de adsorción alcanza un máximo alrededor del 50% de recubrimiento y nunca desciende por debajo de -200 kJ/mol. Si bien el descenso de la entalpía molar de adsorción a altos grados de recubrimiento tiene una explicación lógica en términos de impedimentos estéricos y/o repulsiones electrostáticas, el aumento a bajo recubrimiento es un efecto de autoinducción a la adsorción que no ofrece fácil explicación. Se ha encontrado (Cullen *et al.*, 1994; You *et al.*, 1996) que las moléculas de proteína adsorbidas muestran una elevada tendencia al agrupamiento de modo que llegan a adoptar una estructura cristalina bidimensional. Por otra parte, medidas de calorimetría diferencial de barrido muestran que en general los fenómenos de agregación son exotérmicos. En el punto isoeléctrico la proteína posee carga electrocinética neta nula, por lo que la interacción lateral será menor y, además, la solubilidad de la proteína en disolución disminuye. Esto podría favorecer la agregación en superficie de forma que se constituyen de modo *cooperativo* agrupamientos moleculares.

Hay que recordar que el grado de recubrimiento (ec. (9.1)) está definido tomando en consideración únicamente el máximo número de moléculas adsorbidas y el  $n^\circ$  de moléculas adsorbidas en unas condiciones de terminadas. No se tiene en cuenta que el modo (orientación, conformación) en que se adsorbe una molécula y el área que ocupa realmente sobre la superficie puede cambiar según el avance del proceso, de modo que el grado de recubrimiento real de la superficie sea muy distinto del que se ha definido. Si las moléculas de proteína sufren alteraciones considerables en su conformación debido al proceso de adsorción, el grado de recubrimiento será mucho mayor que el obtenido a partir del mero recuento de moléculas.

Una forma de valorar las interacciones laterales entre moléculas adsorbidas consiste en considerar el valor de la entalpía molar de adsorción a bajo y a elevado grado de recubrimiento. En el primer caso,  $\Delta H_{ADS}$  es reflejo exclusivamente de las interacciones subyacentes en el proceso de adsorción de una molécula de proteína aislada del resto, es decir, de las interacciones proteína-superficie, proteína-agua y superficie-agua. En el segundo caso, posee además una contribución debida a la interacción entre moléculas de proteína. La diferencia  $\Delta H_{ADS}(\theta \approx 1) - \Delta H_{ADS}(\theta \approx 0)$  debe representar aproximadamente la contribución de éstas interacciones intermoleculares (Kotsoukos *et al.*, 1983; Norde *et al.*, 1985; Norde *et al.*, 1994b; Galisteo *et al.*, 1995; Haynes *et al.*, 1995) y en la Figura 9.10 se muestran los valores de la entalpía molar de adsorción a bajo y elevado recubrimiento, así como la correspondiente diferencia según los valores de *pH* considerados.

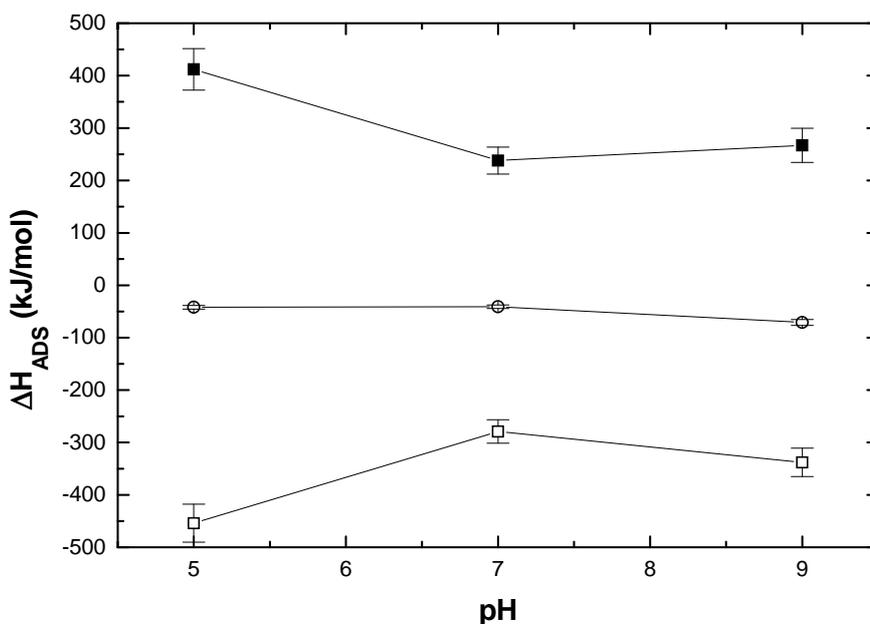


Figura 9.10.A. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JX2.

[KBr]=50mM, 25°C

(□)  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.1$ ), (○)  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.9$ ), (■)  $\Delta H_{ADS}(\theta \approx 0.9) - \Delta H_{ADS}(\theta \approx 0.1)$

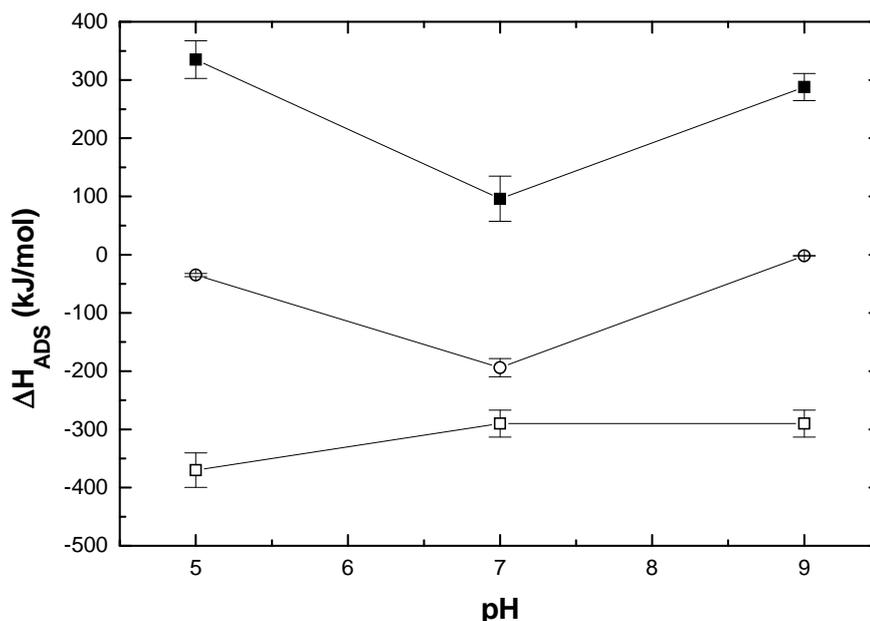


Figura 9.10.B. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JM1.  
[KBr]=50mM, 25°C

(□)  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.1$ ), (○)  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.9$ ), (■)  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.9$ ) -  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.1$ )

Se comprueba que un alejamiento del punto isoeléctrico de la proteína produce un aumento de la contribución entálpicamente desfavorable de las interacciones intermoleculares laterales entre las moléculas adsorbidas. La contribución entálpica de las interacciones laterales es menor a  $pH$  9 que a  $pH$  5, indicando que la barrera energética debida a tales interacciones, y que deben superar las moléculas para adsorberse, es mayor en el primer caso. Esto se puede justificar teniendo en cuenta dos efectos: en primer lugar, la transferencia de cationes hacia la interfase a  $pH$  9 reduce la repulsión coulombiana entre moléculas adsorbidas; en segundo lugar, se puede considerar la posibilidad de que los cambios conformacionales sean de mayor magnitud cuando existe atracción coulombiana entre proteína y superficie, ya que para maximizar el número de contactos la molécula podría alterar su estructura, siendo éste un proceso entálpicamente desfavorable, pero entrópicamente muy favorable.

La carga neta de la molécula de MGB de músculo cardíaco de caballo a  $pH$  5 y a  $pH$  9, evaluada a partir de su secuencia de aminoácidos, es del orden de +15 y -5, respectivamente. Estos valores de carga neta son estimaciones cualitativas groseras, ya que

no se ha tenido en cuenta el grado de disociación ni el microentorno de cada grupo protonable ni la distribución de contra-iones alrededor de la molécula, pudiendo éste alterar sensiblemente los valores de  $pK$  de cada grupo ionizable y hacer que la carga electrocinética sea muy diferente de la carga superficial debida a los grupos ionizables (Haynes *et al.*, 1994). La carga electrocinética será bastante menor que la carga superficial de la proteína, pero se puede suponer que será mayor a  $pH$  5 que a  $pH$  9. Se observa que, si bien la distancia al punto isoeléctrico es de 2 unidades de  $pH$  en ambos casos, la variación de carga respecto de éste es muy diferente. Este hecho puede explicar por qué las interacciones laterales intermoleculares, que tienen su origen en la repulsión culombiana y el desplegamiento en la interfase de las moléculas adsorbidas, son más importantes a  $pH$  5 que a  $pH$  9 en el látex JX2. Dado el carácter fuertemente exotérmico exhibido por la adsorción de MGB a  $pH$  9 y baja cobertura superficial, la transferencia de cationes desde la disolución hacia la interfase puede no ser muy importante en cuanto a cantidad, pero su contribución es determinante para compensar la contribución entálpica desfavorable debida a la repulsión electrostática entre proteína y superficie adsorbente.

### 9.3.2. Efecto de la fuerza iónica.

La adsorción de MGB sobre el látex JX2 parece estar determinada fundamentalmente por la interacción electrostática entre proteína y superficie adsorbente, mientras que ésta tiene una influencia bastante menos acusada en la adsorción sobre el látex JM1. Para comprobar esta afirmación se ha estudiado el efecto de la concentración de electrolito sobre la adsorción en ambas superficies, pudiendo de esta forma poner en evidencia la importancia de las interacción electrostática en el proceso de adsorción. El efecto de la fuerza iónica será mayor en aquella situación donde las interacciones electrostáticas sean las predominantes y el verdadero motor de la adsorción. Se ha indicado que en el caso de una proteína con estructura rígida un cambio en la fuerza iónica afecta a la densidad de carga, mientras que para proteína cuya estructura no es rígida la densidad de carga es prácticamente independiente de la fuerza iónica (Giacomelli *et al.*, 1997). Es de esperar entonces que la fuerza iónica sí afecte a la densidad de carga de la MGB. Se han

realizado experimentos de adsorción a  $pH$  9, condiciones en que existe repulsión electrostática entre la proteína y la superficie adsorbente, a distintas condiciones de fuerza iónica. En las Figuras 9.11.A y 9.11.B se muestran las isothermas de adsorción de MGB en cada látex a  $pH$  9 y a diferentes concentraciones de electrolito KBr.

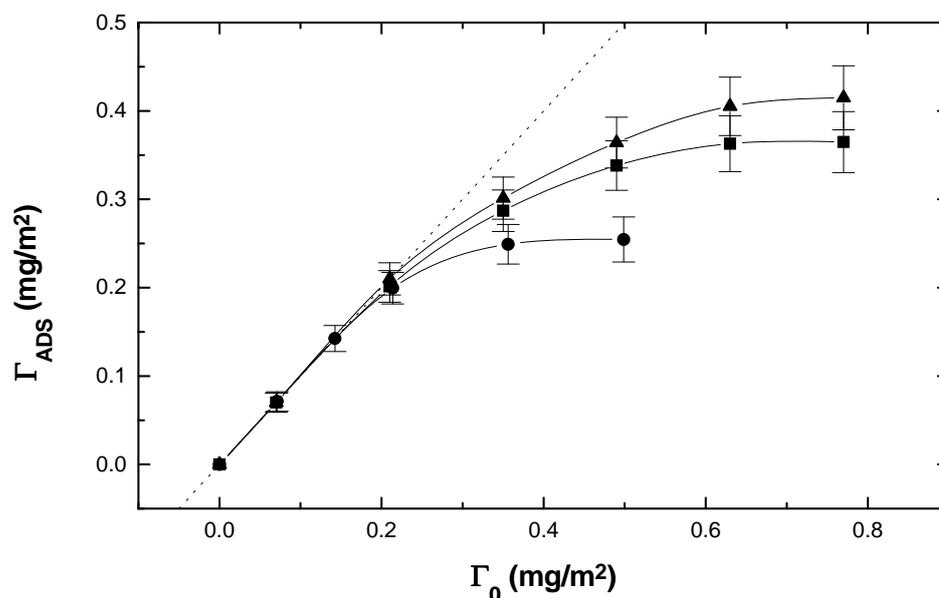
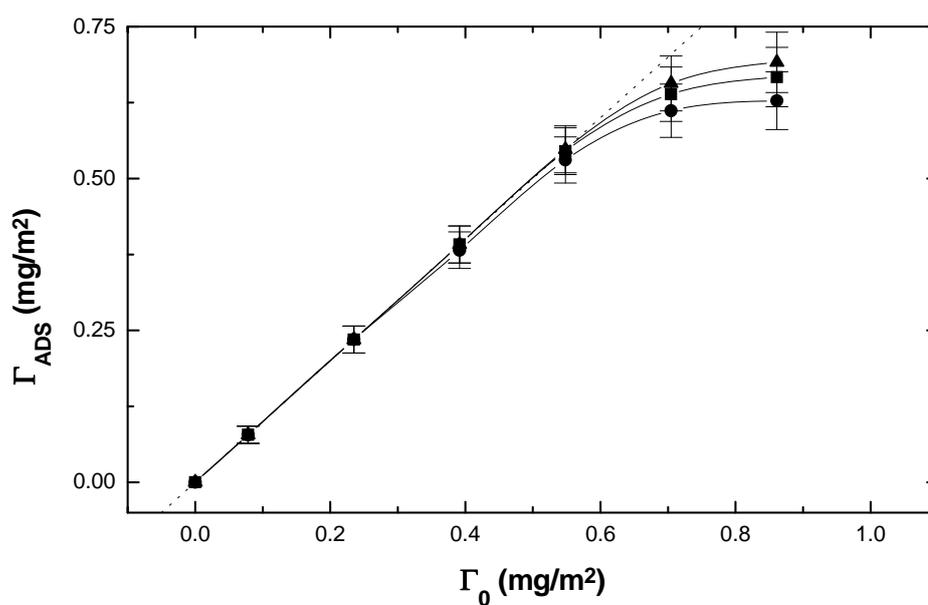


Figura 9.11.A. Isothermas de adsorción de MGB sobre el látex JX2 ( $pH$  9,  $T=25^\circ C$ ).

Efecto de la concentración de electrolito:



(●) [KBr]=50mM, (■) [KBr]=75mM, (▲) [KBr]=100mM

*Figura 9.11.B.* Isotermas de adsorción de MGB sobre el látex JM1 ( $pH\ 9$ ,  $T=25^{\circ}C$ ).

Efecto de la concentración de electrolito:

(●)  $[KBr]=50mM$ , (■)  $[KBr]=75mM$ , (◐)  $[KBr]=100mM$

Se comprueba que el efecto de la concentración de electrolito es mayor sobre el látex JX2, lo que confirma que la adsorción sobre esta superficie está condicionada fundamentalmente por la interacción electrostática. En la adsorción sobre el látex JM1 apenas hay diferencia, debiendo existir en el proceso de adsorción otra fuerza predominante, la interacción hidrofóbica. En el látex JX2 y en condiciones de  $pH\ 9$  y  $[KBr]\ 100\ mM$  la cantidad máxima adsorbida es casi el doble de la alcanzada en condiciones de  $[KBr]\ 50\ mM$  y es prácticamente igual que la correspondiente a las condiciones de  $pH\ 7$  y  $[KBr]\ 50\ mM$ , lo que indica que el apantallamiento creado por los contraiones de la doble capa es muy efectivo conforme aumenta la concentración de electrolito y que la adsorción está dominada por la interacción electrostática en el látex JX2. En el látex JM1 la cantidad adsorbida máxima en condiciones de  $pH\ 9$  y  $[KBr]\ 100\ mM$  queda bastante por debajo de la correspondiente a  $pH\ 7$  y  $[KBr]\ 50\ mM$ .

Siguiendo la misma línea de análisis, en las *Figuras 9.12.A* y *9.12.B* se muestran los valores de la concentración de MGB en disolución cuando se alcanza el 90% de recubrimiento de la superficie en función de la concentración de electrolito para cada látex, a partir de las gráficas *9.11.A* y *9.11.B*. Este dato será indicativo de las interacciones laterales entre las moléculas de proteína adsorbidas. Se observa un comportamiento contradictorio y muy diferente: según los resultados, en el látex JX2 un aumento de la concentración de electrolito no reduce las interacciones laterales, pero en el látex JM1 sí existe tal reducción. Esto coincide con el hecho observado en las *Figuras 9.11.A* y *9.11.B* de que un incremento de la fuerza iónica reduce la afinidad en la adsorción sobre el látex JX2, pero aumenta la afinidad en la adsorción sobre el látex JM1.

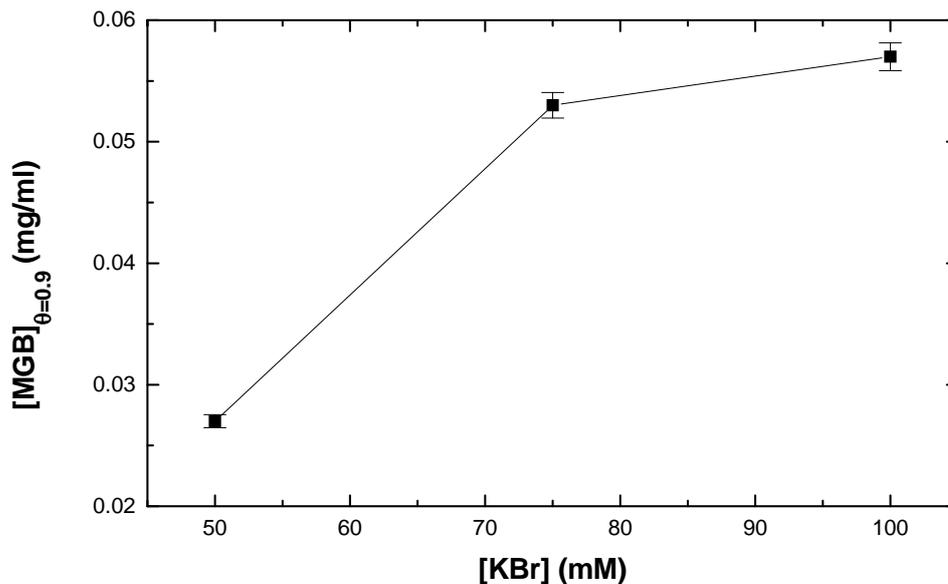


Figura 9.12.A. Concentración de MGB en disolución cuando el grado de recubrimiento es 0.9 en función de la concentración de electrolito para el látex JX2.

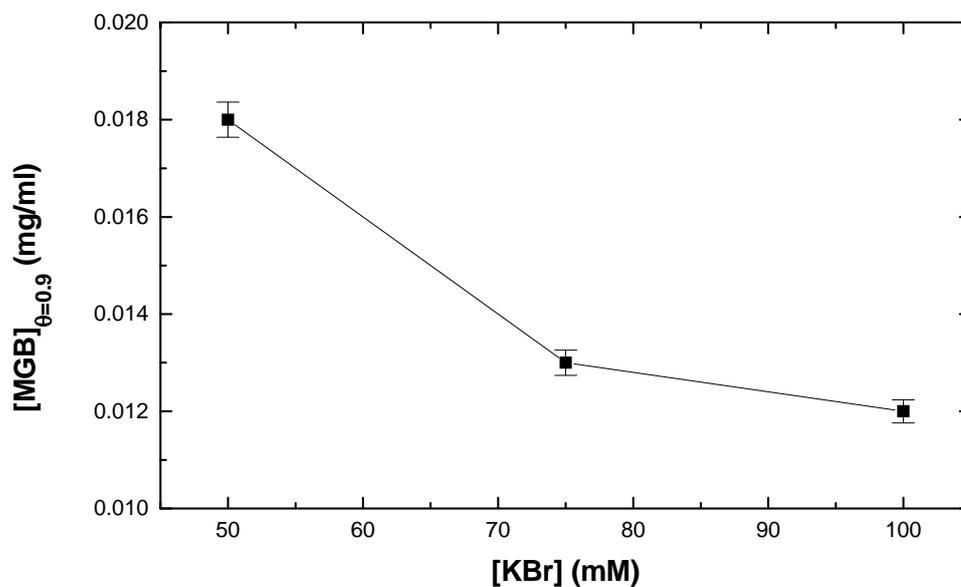


Figura 9.12.B. Concentración de MGB en disolución cuando el grado de recubrimiento es 0.9 en función de la concentración de electrolito para el látex JM1.

En las Figuras 9.13-14 se muestran la entalpía molar de adsorción de MGB sobre ambos látex en función del grado de recubrimiento a diferentes concentraciones de electrolito.

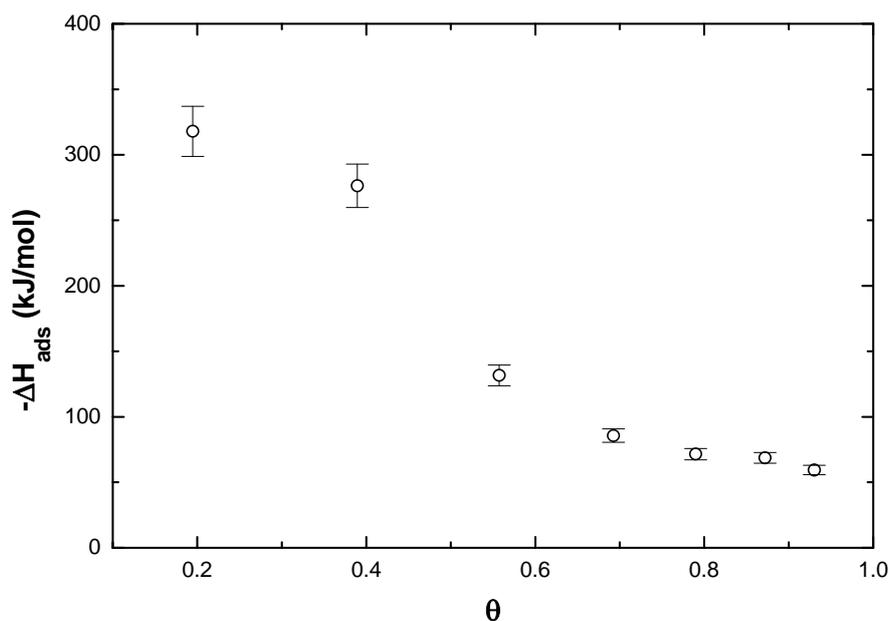


Figura 9.13.A. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JX2 en función del grado de recubrimiento ( $pH=9$ ,  $[KBr]=75\text{mM}$ ,  $T=25^\circ\text{C}$ ).

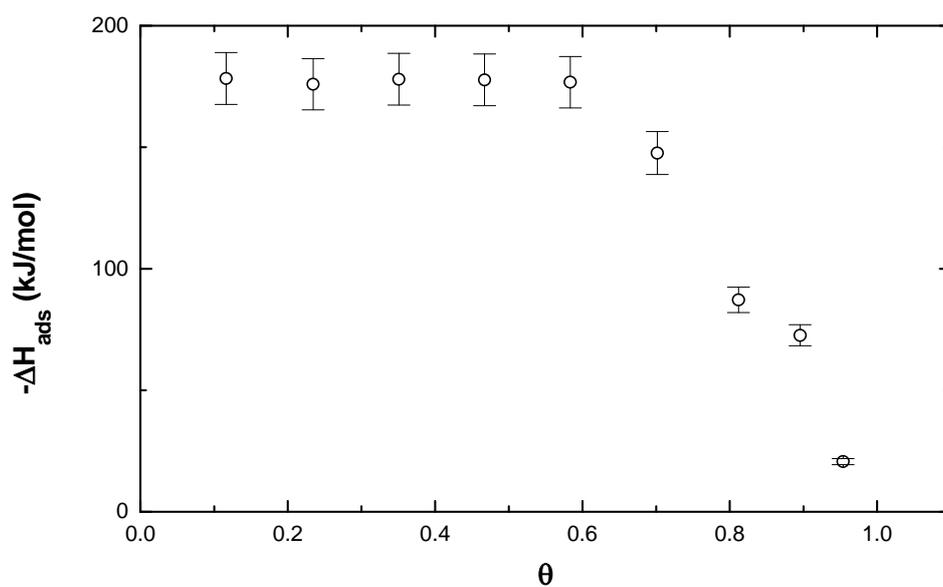


Figura 9.13.B. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JM1 en función del grado de recubrimiento ( $pH=9$ ,  $[KBr]=75\text{mM}$ ,  $T=25^\circ\text{C}$ ).

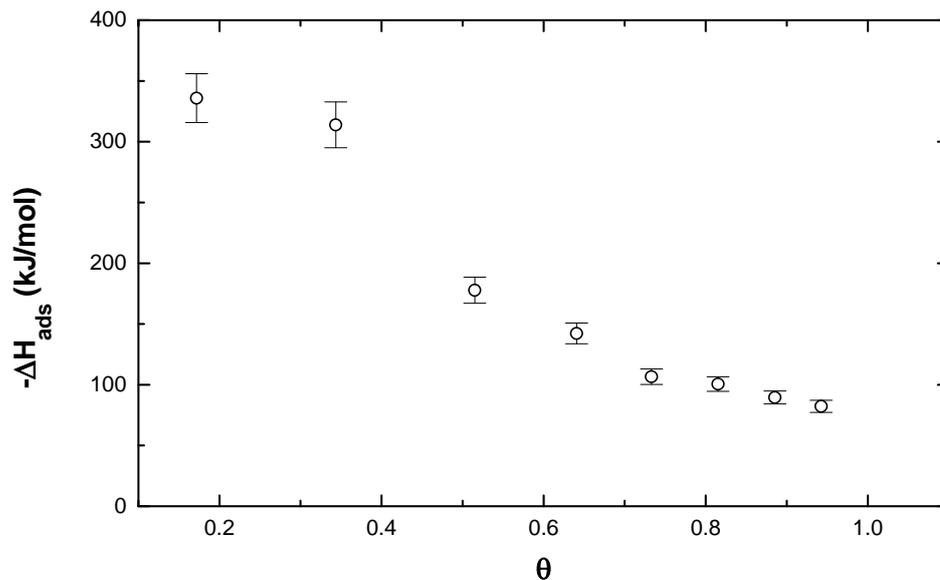


Figura 9.14.A. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JX2 en función del grado de recubrimiento ( $pH=9$ ,  $[KBr]=100mM$ ,  $T=25^{\circ}C$ ).

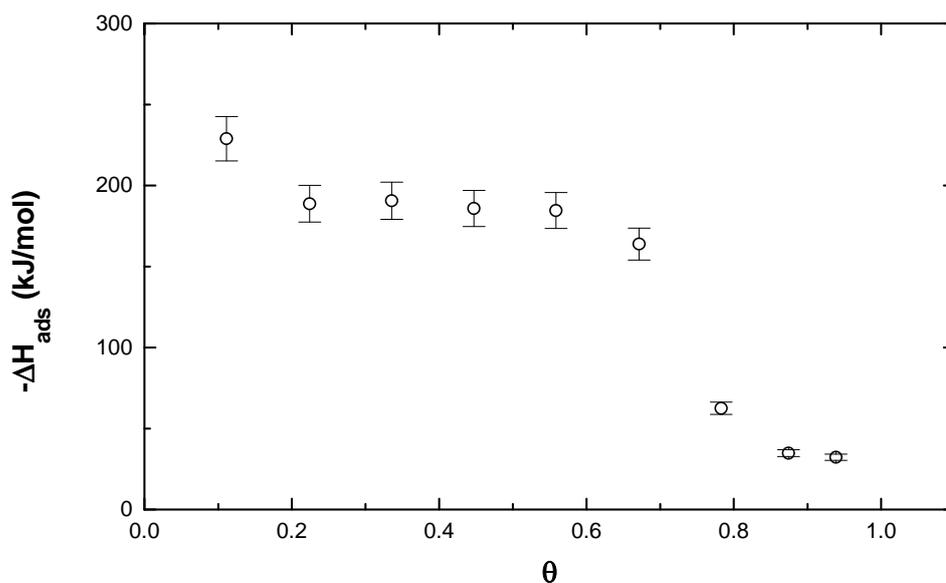


Figura 9.14.B. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JM1 en función del grado de recubrimiento ( $pH=9$ ,  $[KBr]=100mM$ ,  $T=25^{\circ}C$ ).

Si se comparan las curvas anteriores con las Figuras 9.9 se observa que la entalpía molar de adsorción para bajo recubrimiento, donde no hay interferencia de la interacción lateral entre moléculas adsorbidas, decrece al aumentar la concentración de electrolito. Esto puede explicarse si se considera que aumentando la fuerza iónica el efecto del medio

iónico es menor.

Nuevamente en las curvas se observa un intervalo de entalpía molar de adsorción constante, siempre más extenso para el látex JM1, seguido de un descenso de dicha magnitud. Hay que destacar que para el látex JX2 en condiciones de  $pH$  9 y  $[KBr]$  50 mM no existía una región de recubrimiento en que la entalpía molar de adsorción constante. Se comprueba por tanto que un aumento de la fuerza iónica reduce las repulsiones electrostáticas laterales entre moléculas adsorbidas.

También se ha analizado la importancia de las interacciones laterales mediante la evaluación de la entalpía molar de adsorción a bajo y elevado recubrimiento de la superficie adsorbente. En las Figuras 9.15.A y 9.15.B se muestra el resultado.

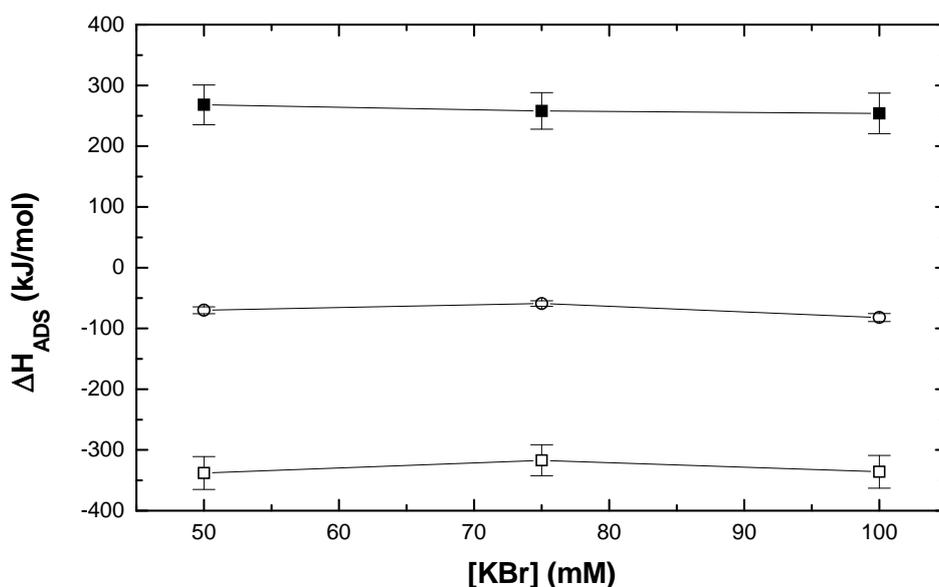


Figura 9.15.A. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JX2.

$pH$  9,  $T=25^{\circ}C$

(□)  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.1$ ), (○)  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.9$ ), (■)  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.9$ ) -  $\Delta H_{ADS}$  ( $\theta \approx 0.1$ )

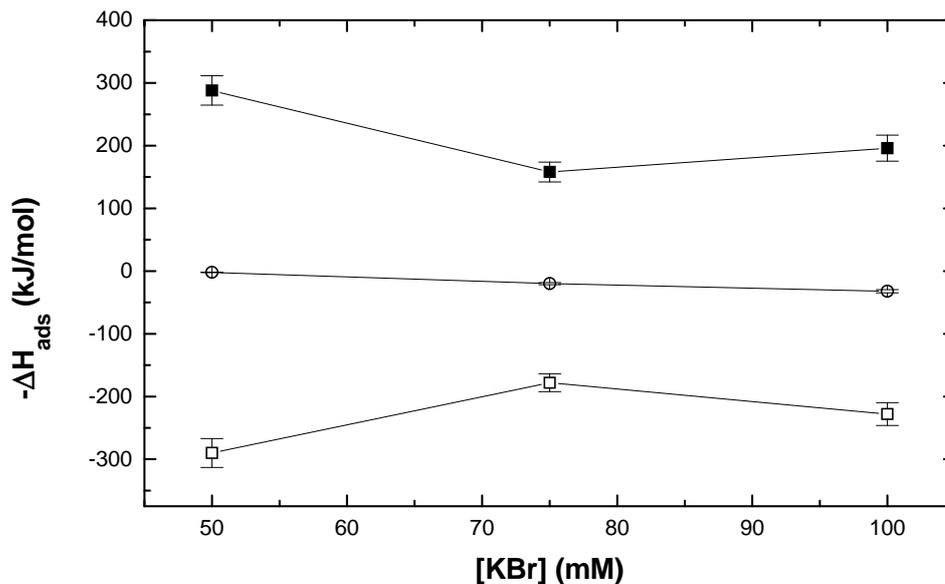


Figura 9.15.B. Entalpía molar de adsorción adsorción de MGB sobre el látex JM1.

$pH\ 9, T=25^{\circ}C$

(□)  $\Delta H_{ADS} (\theta \approx 0.1)$ , (○)  $\Delta H_{ADS} (\theta \approx 0.9)$ , (■)  $\Delta H_{ADS} (\theta \approx 0.9) - \Delta H_{ADS} (\theta \approx 0.1)$

Se comprueba un aumento de la concentración de electrolito reduce la interacción lateral entre las moléculas adsorbidas sobre el látex JX2, pero no ocurre exactamente lo mismo con las moléculas adsorbidas sobre el látex JM1. Esto indica que en este último caso las interacciones laterales no son puramente electrostáticas y se produce posiblemente un desplegamiento de las moléculas en la superficie. Ya se comentó anteriormente que este fenómeno estaría favorecido por la hidrofobicidad de tal superficie.

### 9.3.3. Efecto de la temperatura.

Para evaluar la influencia de la temperatura sobre la adsorción de MGB sobre cada látex se realizó un nuevo experimento en las siguientes condiciones:  $pH\ 7$ ,  $[KBr]=50\ mM$  y  $35^{\circ}C$ . Debido a que la adsorción de MGB sobre ambos látex ha resultado ser siempre exotérmica, según el Principio de Le Chatelier un aumento de la temperatura conduciría a una reducción en la cantidad adsorbida.

Según datos de la bibliografía (*Suen et al., 1985*), el número de moléculas de albúmina de suero bovino unidas covalentemente a una superficie de un látex con grupos superficiales clorometilo es mayor a 35°C que a 25°C en una relación 12:1 y además la cantidad máxima adsorbida disminuye con un aumento de la temperatura. Este hecho se puede justificar argumentando que el acoplamiento covalente requiere una energía de activación mayor que la requerida para la adsorción física de la proteína. En principio, esto provocará que la adsorción sea mucho más exotérmica para el látex JX2 a mayor temperatura, ya que la unión covalente es mucho más energética y se producirá en mayor extensión.

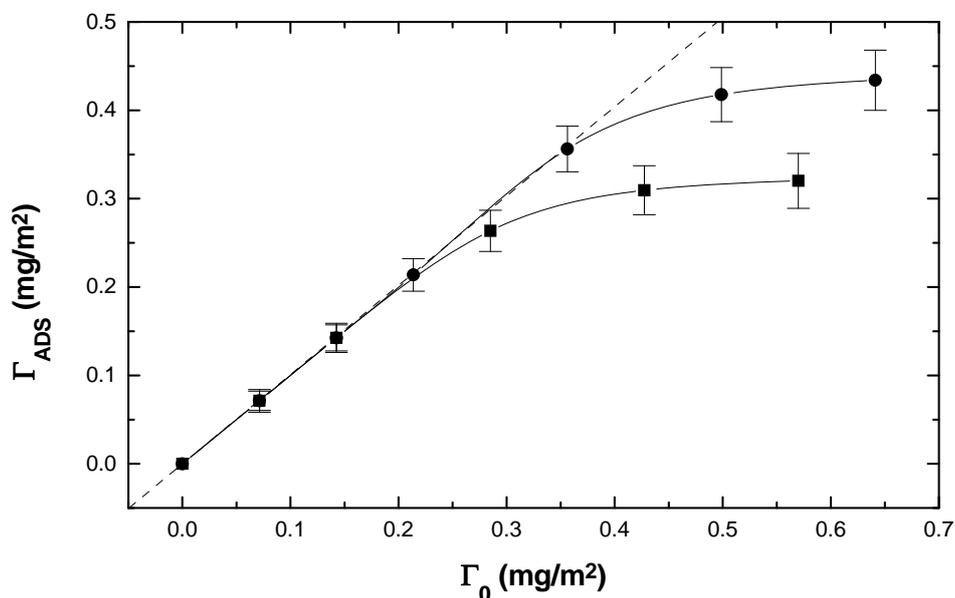


Figura 9.16.A. Isotermas de adsorción de MGB sobre el látex JX2 ( $pH$  7,  $[KBr]=50$  mM).

Efecto de la temperatura: (●) 25°C, (■) 35°C

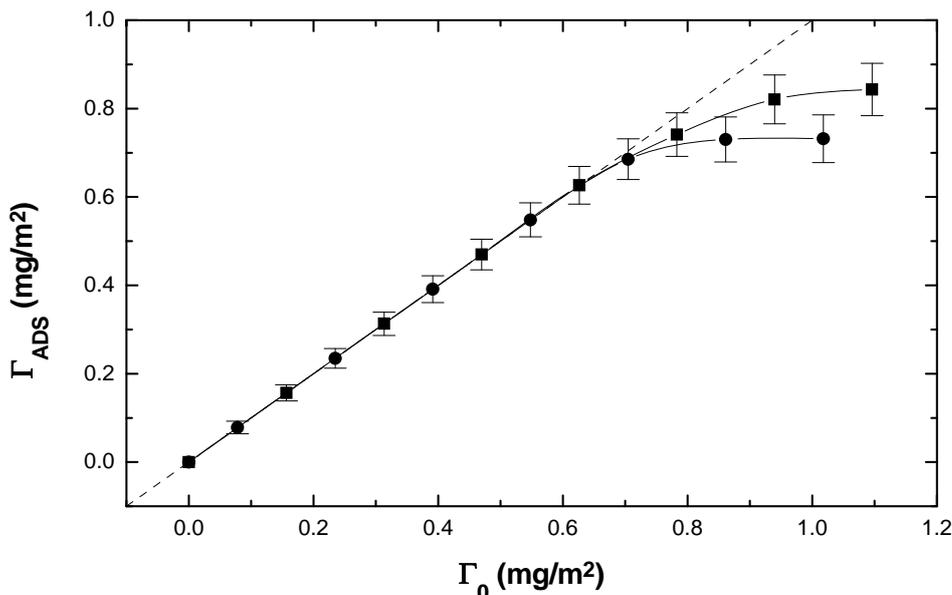


Figura 9.16.B. Isothermas de adsorción de MGB sobre el látex JM1 ( $pH$  7,  $[KBr]=50$  mM).  
Efecto de la temperatura: (●) 25°C, (■) 35°C

La influencia de la temperatura es totalmente diferente sobre la adsorción de MGB en cada látex. En el látex JX2, un aumento de la temperatura de adsorción reduce la cantidad adsorbida considerablemente y también disminuye la afinidad, mientras que para el látex JM1 se produce un ligero aumento en la cantidad adsorbida, pero decrece ligeramente la afinidad. Este último hecho se puede explicar si se considera que el látex JM1 es bastante más hidrofóbico y que en la adsorción de MGB sobre dicho látex la interacción predominante y que dirige la adsorción es la hidrofóbica. Un aumento de temperatura favorece la interacción hidrofóbica (*Pratt et al., 1977; Galisteo, 1992*), ya que por lo general la contribución entálpica de ésta a la energía de Gibbs es pequeña pero positiva, por lo que se inducirá una mayor adsorción sobre el látex JM1, que se considera como el más hidrofóbico.

En las Figuras 9.17.A y 9.17.B se muestra la entalpía molar de adsorción de MGB sobre cada látex en función del grado de recubrimiento para cada látex a 35°C y en condiciones de  $pH$  7 y  $[KBr]$  50 mM.

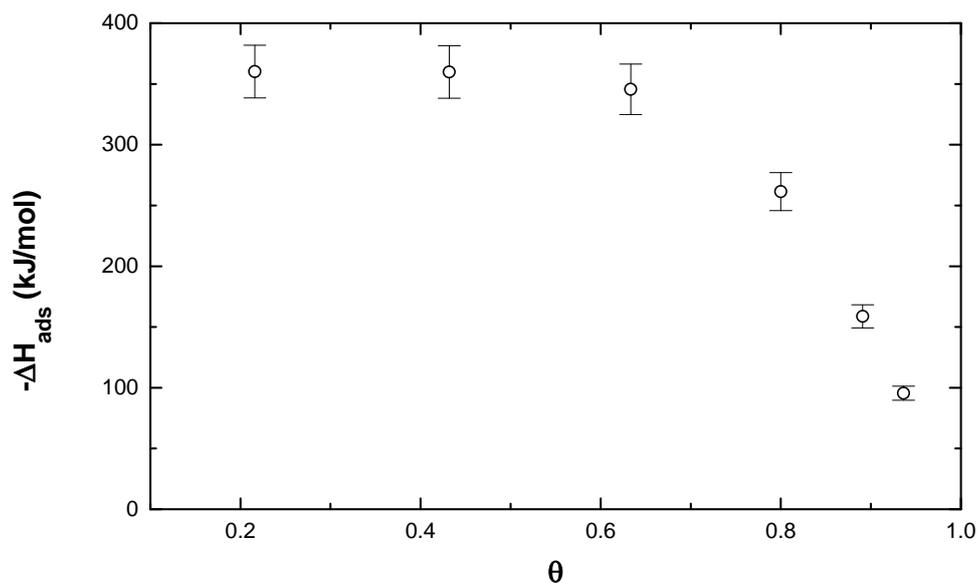


Figura 9.17.A. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JX2 en función del grado de recubrimiento ( $pH=7$ ,  $[KBr]=50\text{mM}$ ,  $T=35^\circ\text{C}$ ).

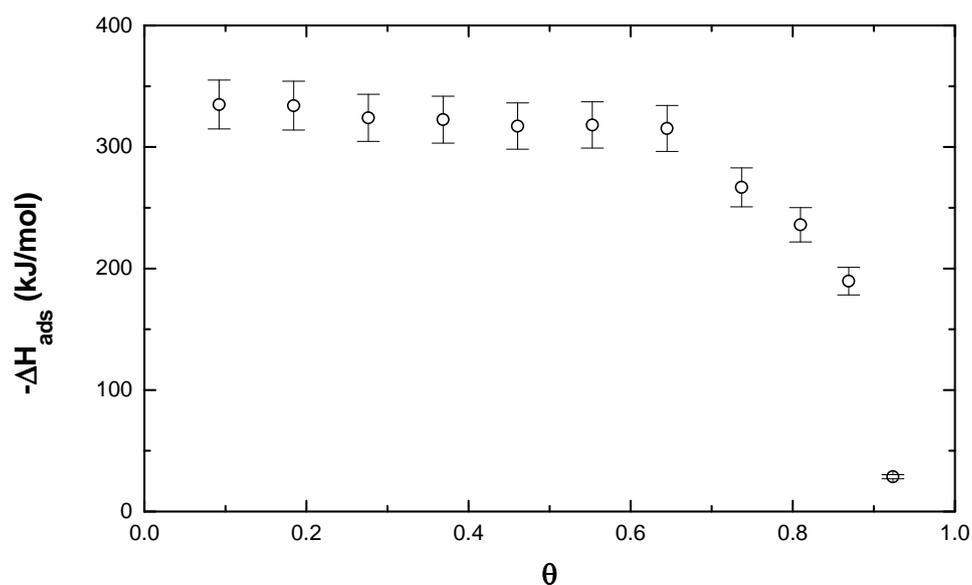


Figura 9.17.B. Entalpía molar de adsorción de MGB sobre el látex JM1 en función del grado de recubrimiento ( $pH=7$ ,  $[KBr]=50\text{mM}$ ,  $T=35^\circ\text{C}$ ).

Entre la superficie del látex JM1 y la MGB no se establecen enlaces covalentes y el valor de la entalpía molar de adsorción sobre ambos látex es comparable. Esto indica que, si bien es un hecho que la MGB se debe unir covalentemente a la superficie del látex JX2, tal fenómeno no se confirma con los resultados obtenidos. Posiblemente la unión covalente

---

posee una energía de activación elevada y se realiza lentamente conforme la molécula de MGB adsorbida adopta su conformación energéticamente más favorable sobre la superficie adsorbente (*Sarobe et al., 1998*).

El perfil de la curva de entalpía molar de adsorción sobre ambos látex a 35°C es similar: a bajo y moderado recubrimiento superficial la entalpía molar de adsorción exhibe un valor prácticamente constante. La única diferencia entre los dos látex reside en que los valores de entalpía son mayores para la adsorción sobre el látex JX2.

A partir del valor de la entalpía molar de adsorción a bajo recubrimiento a diferentes temperaturas es posible estimar la variación de la capacidad calorífica a presión constante del sistema,  $\Delta C_p$ . En ambos casos se encuentra un aumento de esta magnitud, siendo mayor en el proceso de adsorción de MGB sobre el látex JX2. Los valores estimados son de 6.6 kJ/Kmol y 3 kJ/Kmol. Considerando que (*Norde, 1976*):

- la deshidratación de una superficie hidrofóbica produce una disminución de la capacidad calorífica.
- el efecto del medio iónico y los posibles cambios conformacionales de la proteína concomitantes en el proceso de adsorción contribuyen a aumentar la capacidad calorífica.

se comprueba que es mayor el aumento de la capacidad calorífica en el proceso de adsorción sobre el látex menos hidrofóbico. Además, es posible que el efecto del medio iónico y las alteraciones estructurales que sufren las moléculas adsorbidas produzcan un aumento de la capacidad calorífica que supere a la contribución de la deshidratación hidrofóbica.

Del estudio realizado sobre la adsorción de MGB sobre la superficie de los látex JX2 y JM1 se puede concluir que:

- La entalpía molar de adsorción depende del grado de avance del proceso de

adsorción.

- La adsorción de sobre el látex JX2 está dominada por las interacciones electrostáticas entre la superficie adsorbente y la proteína, aunque hay una contribución de las interacciones hidrofóbicas que permite la adsorción en condiciones de repulsión electrostática entre proteína y superficie adsorbente.

La adsorción de sobre el látex JM1 está determinada fundamentalmente por las interacciones hidrofóbicas, existiendo además una influencia apreciable de las interacciones electrostáticas.

- Se pone de manifiesto la importancia de la naturaleza de la superficie adsorbente sobre el proceso de adsorción.
- A partir de los resultados no se puede establecer de forma concluyente la formación de enlaces covalentes entre la superficie adsorbente y la proteína. Sin embargo, es un hecho comprobado que sí se produce tal acoplamiento, según datos bibliográficos (*Sarobe et al., 1998*). La reacción conducente a tal unión es muy lenta, debiendo requerir una energía de activación elevada. Es probable que primero se produzca adsorción física, detectada en este estudio, pero pasado un tiempo, conforme las moléculas adsorbidas se acomodan sobre la superficie adsorbente, se lleva a cabo la adsorción química.
- La molécula de MGB no debe sufrir alteraciones estructurales importantes cuando se adsorbe sobre el látex JX2, pero existen indicios para pensar que sí se producen cuando se adsorbe sobre el látex JM1 (más hidrofóbico). Esto concuerda con la idea inicial de que es una proteína modelo compacta con una estabilidad estructural relativamente alta que no impide su desplegamiento al ser adsorbida sobre un látex hidrofóbico, pero al parecer sí lo hace al ser adsorbida sobre un látex más hidrofílico (menos hidrofóbico).
- De esto último se desprende que la clasificación de las proteínas en rígidas o blandas en cuanto a la existencia de alteraciones estructurales inducidas por el proceso de adsorción no depende solamente de las características físico-químicas

---

de la proteína, sino también de la naturaleza de la superficie adsorbente.

- Aunque no se han obtenido valores de  $\Delta C_p$  negativos, como correspondería a un fenómeno de adsorción donde el efecto predominante sería la deshidratación de una superficie adsorbente más o menos hidrofóbica, los valores estimados si están en consonancia con las características del fenómeno de adsorción en cada superficie.

## 10. Resumen y conclusiones.

En este último capítulo se resume el contenido de esta Memoria y finalmente se destacan las conclusiones más relevantes que se pueden obtener del trabajo de investigación realizado.

Se ha diseñado, construido y optimizado un microcalorímetro isotérmico de valoración de alta sensibilidad. Todo el proceso ha sido realizado íntegramente en los Laboratorios del Departamento de Física Aplicada y del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. El microcalorímetro utiliza como principio de medida la compensación de potencia, para lo cual se ha implementado un sistema de retroalimentación basado en el efecto Peltier que permite reducir las constantes de tiempo del dispositivo y reducir la inercia térmica de éste. De este modo, se mejora la sensibilidad dinámica, la resolución temporal y disminuye drásticamente el tiempo de experimentación. El dispositivo se construye con diseño de células gemelas (principio *twin*), de modo que el principio de medida es diferencial. Esto permite eliminar en un experimento calorimétrico los efectos térmicos asociados a los fenómenos accidentales que afecten simultáneamente a las dos células del dispositivo. Todo el desarrollo de un experimento está totalmente automatizado y controlado a través de un ordenador personal que dirige la adquisición de datos, la inyección de reactivos y la gestión del sistema.

La configuración simétrica de la disposición del sistema de compensación conjuntamente con el uso del efecto Peltier conlleva algunas ventajas: conservación de la simetría del sistema, eliminación del efecto Joule que en otros microcalorímetros introduce la propia compensación y mayor seguridad de que la constante de calibración para un efecto endotérmico y para un efecto exotérmico son iguales. El diseño del sistema de compensación permite que las tareas de calibración y operación del dispositivo y ajuste de

---

dicho sistema de compensación sean muy sencillas.

El modelo físico-matemático del dispositivo microcalorimétrico desarrollado muestra un acuerdo excelente como representación del sistema real, a la vista de los resultados obtenidos en la caracterización del sistema microcalorimétrico. El modelo conduce a dos funciones de transferencia del microcalorímetro diferentes, dependiendo de la localización de la fuente de calor generadora del efecto térmico, para una calibración eléctrica sobre la pared de la célula y para una reacción química en el interior de la célula. Sin embargo, un resultado importante descansa en el hecho de que las constantes de tiempo asociadas a los polos de ambas funciones de transferencia son idénticas. Esto permite demostrar que aunque el comportamiento dinámico, es decir, la respuesta transitoria, del microcalorímetro en estos dos casos es diferente, las constantes de tiempo que gobiernan tal comportamiento son las mismas, independientemente del tipo de experimento, químico o eléctrico, que se lleve a cabo.

Teniendo en cuenta el resultado anterior se ha indicado un método de caracterización del microcalorímetro basado en una serie de calibraciones eléctricas y que permite determinar de forma precisa y muy rápida, comparado con otros métodos alternativos, la función de transferencia del sistema. Además, se establece que el método eléctrico de caracterización es el único que permite lograr una caracterización fiable.

Se ha utilizado la Teoría de Sistemas de Retroalimentación para analizar el comportamiento del microcalorímetro bajo distintos controles por retroalimentación. Estudiado el funcionamiento bajo control proporcional, proporcional-derivativo y proporcional integral, se puede establecer que:

- El control proporcional, tradicionalmente utilizado, mejora el tiempo de respuesta, pero inevitablemente reduce la ganancia en estado estacionario del sistema.
- El control proporcional-derivativo permite modular de forma casi independiente las constantes de tiempo y la ganancia en estado estacionario del dispositivo,

pero en la práctica este tipo de control no da resultado debido a las inestabilidades introducidas.

- El control proporcional-integral ofrece importantes ventajas respecto al proporcional puro: mejor relación señal-ruido, menores constantes de tiempo, mayor ganancia en estado estacionario e independencia de la constante de calibración respecto de los parámetros de control.

Como resultado de este análisis se ha desarrollado un nuevo método de medida en calorimetría isotérmica de valoración basado en el control proporcional-integral del sistema microcalorimétrico.

Mediante el modelo del dispositivo microcalorimétrico se puede analizar la influencia de realizar la operación de compensación de potencia en la pared de la célula calorimétrica o en el interior. Se ha demostrado que, en vez de ser una limitación el hecho de realizar tal operación sobre la pared de la célula, es una estrategia de diseño adecuada y recomendable.

Asimismo se ha desarrollado un modelo discreto del dispositivo, extendido a los tres sistemas de control empleados: proporcional, proporcional-derivativo y proporcional-integral. Se comprueba que el funcionamiento del dispositivo, que es intrínsecamente discreto debido a que el sistema de control es digital, es similar al del sistema continuo análogo siempre que se respeten las condiciones de estabilidad del sistema. Sin embargo, en el dominio discreto surgen más restricciones respecto a los valores permitidos de los parámetros de control, además de una conexión importante entre el período de muestreo y los parámetros de control que establece que conforme aumenta el período de muestreo los valores máximos de los permitidos parámetros de control se reducen.

Se ha construido un conjunto de herramientas que permiten el análisis de la respuesta de un sistema calorimétrico genérico, haciendo énfasis en las magnitudes de medida que interesan en este tipo de dispositivos: área del termograma correspondiente a un pulso de calor y valor límite en estado estacionario de la señal correspondiente a un paso de potencia.

---

El efecto de todos los parámetros instrumentales (velocidad de agitación, parámetros de control, período de muestreo, etc.) ha sido analizado para determinar las condiciones óptimas de operación del dispositivo.

Gracias a un meticuloso proceso de caracterización ha sido posible determinar todo el conjunto de parámetros instrumentales del dispositivo: constantes de tiempo de elementos aislados, coeficientes de transferencia de calor, coeficientes Peltier y Seebeck de los elementos Peltier, etc.

A partir del modelo desarrollado también ha sido posible estudiar la influencia de emplear distintas disposiciones de los elementos Peltier utilizados en el sistema de medida, demostrándose que:

- Es ventajoso aumentar el número de elementos, únicamente condicionado por el espacio disponible. Con esta modificación la ganancia en estado estacionario apenas varía y las constantes de tiempo disminuyen, por lo que la sensibilidad dinámica se ve mejorada.
- No es ventajoso disponer los elementos en serie térmicamente, ya que la ganancia en estado estacionario aumenta, pero las constantes de tiempo se ven incrementadas en un factor aún mayor. Como consecuencia la sensibilidad dinámica se ve empeorada.

Se ha comprobado que el dispositivo microcalorimétrico permite obtener valores fiables de las magnitudes termodinámicas que caracterizan a un proceso de unión. En concreto, se han determinado las variaciones de los potenciales termodinámicos asociados con las reacciones de protonación de dos ribonucleósidos: adenosina y citidina.

Con carácter de estudio preliminar y como una aplicación importante del dispositivo microcalorimétrico se ha abordado el estudio de la adsorción de proteínas sobre superficies poliméricas. Esto permite ampliar una línea de investigación bien establecida en el Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la

Universidad de Granada sobre fenómenos de adsorción de macromoléculas en interfases. Las técnicas microcalorimétricas complementadas con otras técnicas de análisis específicas permiten obtener más información sobre fenómenos tan complejos y atractivos como los mencionados.

El estudio básico sobre la adsorción de proteínas en interfases sólido-líquido se ha abordado utilizando una proteína modelo, la Mioglobina, que es una proteína de bajo peso molecular, bastante hidrofílica y con una relativamente elevada estabilidad estructural en disolución. La superficie adsorbente que se ha empleado corresponde a la superficie de una dispersión de partículas poliméricas (látex) que se considera que constituye un sistema coloidal modelo, ya que reúne una serie de características que lo califican como tal (monodispersidad, homogeneidad de la superficie, constante dieléctrica muy reducida comparada con la del agua). Como era de esperar, se ha puesto de manifiesto la influencia que las características de la superficie adsorbente tienen en la adsorción de proteína sobre tal superficie. La influencia del  $pH$ , la fuerza iónica y la temperatura sobre la adsorción de Mioglobina sobre la superficie de dos látex de poliestireno bastante parecidos (uno menos hidrofóbico, de clorometilostireno, que el otro, de poliestireno) es notablemente diferente. La adsorción de Mioglobina sobre un látex de clorometilostireno está determinada fundamentalmente por interacciones electrostáticas entre proteína y superficie adsorbente, mientras que la adsorción sobre un látex de estireno la adsorción está dirigida fundamentalmente por las interacciones hidrofóbicas, moduladas por la interacción electrostática entre proteína y superficie. Un hecho significativo es el de que la cantidad máxima de proteína adsorbida no se alcanza cuando el  $pH$  coincide con el punto isoeléctrico de la Mioglobina. Por otra parte, se pone de manifiesto el efecto iónico del medio cuando existe repulsión electrostática entre la Mioglobina y la superficie de las partículas de látex. Sin embargo, lo más relevante de este estudio preliminar es la constatación experimental de la capacidad y sensibilidad que la variación de entalpía, medida por Calorimetría Isotérmica de Valoración, tiene como sonda para la detección de interacciones intermoleculares del adsorbato, proteína en nuestro caso, que modulan el proceso de adsorción.

Según los resultados obtenidos, no hay evidencias de que la Mioglobina sufra

---

cambios conformacionales sobre el látex de clorometilostireno (menos hidrofóbico), sin embargo sí parecen producirse alteraciones estructurales sobre el látex de estireno (más hidrofóbico), siendo éstas de pequeña magnitud dada la relativamente elevada estabilidad estructural de la Mioglobina en disolución. Esto sugiere la idea de que la clasificación de una molécula de proteína como *rígida* o como *blanda* en cuanto a la existencia de cambios conformacionales concomitantes en el proceso de adsorción no depende únicamente de las propiedades físico-químicas de la proteína, sino también de las características de la superficie adsorbente.

Mediante los experimentos realizados no hay evidencias totalmente concluyentes que permitan afirmar el establecimiento de enlaces covalentes entre la Mioglobina y los grupos superficiales del látex de clorometilostireno. Posiblemente tal proceso sea una reacción mucho más lenta que la adsorción física, requiera una energía de activación elevada y se produzca conforme la proteína alcanza su disposición energéticamente más favorable sobre la superficie adsorbente. Sería conveniente disponer de otros datos provenientes de la utilización de técnicas complementarias, tales como el espesor de la capa proteica adsorbida.

La microcalorimetría isotérmica de valoración se revela como una técnica útil que permite, junto con otros procedimientos complementarios, abordar el estudio de fenómenos muy complejos, tales como los procesos de adsorción de macromoléculas en interfases.

De todo el trabajo de investigación se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El método de medida en microcalorimetría isotérmica de valoración basado en la compensación del efecto térmico por efecto Peltier mejora notablemente el funcionamiento y las prestaciones del dispositivo microcalorimétrico.

2. Es conveniente adoptar una configuración simétrica en el sistema de compensación.
3. Es posible desarrollar un modelo matemático basado en leyes físicas básicas que reproduce de forma realista el comportamiento del microcalorímetro.
4. Se ha resuelto el problema de cómo llevar a cabo una caracterización precisa del microcalorímetro. La única forma fiable de llevar a cabo la identificación del sistema se basa en la realización de experimentos de calibración eléctricos.
5. Se ha presentado un nuevo método de medida en calorimetría isotérmica de valoración basado en el control proporcional-integral del dispositivo. Este método presenta ventajas importantes frente al método tradicional empleado en esta técnica.
6. La compensación se debe realizar sobre la pared de la célula calorimétrica y nunca directamente en el contenido de la célula.
7. El modelo discreto del microcalorímetro permite establecer los límites para los regímenes de comportamiento estable y no oscilatorio de una forma más realista y más acorde con la naturaleza digital del dispositivo.
8. Se debe utilizar el mayor número posible de elementos Peltier en el sistema de medida y siempre dispuestos térmicamente en paralelo.
9. El microcalorímetro construido permite determinar las magnitudes termodinámicas (constante de equilibrio, variación de entalpía, variación de entropía y variación de energía de Gibbs) que caracterizan a procesos físico-químicos.
10. Se ha puesto de manifiesto la influencia de las características de la superficie adsorbente sobre la adsorción de proteína sobre dicha superficie. La adsorción de Mioglobina sobre un látex de clorometilostireno está determinada

---

fundamentalmente por interacciones electrostáticas entre proteína y superficie adsorbente, existiendo no obstante una contribución de las interacciones hidrofóbicas; sin embargo, en la adsorción sobre un látex de estireno la adsorción está dirigida fundamentalmente por las interacciones hidrofóbicas, moduladas por la interacción electrostática entre proteína y superficie.

11.La entalpía molar de adsorción depende notablemente del porcentaje de recubrimiento de la superficie adsorbente (avance de la reacción). Por tanto, la entalpía molar de adsorción se manifiesta como una magnitud que refleja de forma sensible las interacciones proteína-látex y proteína-proteína en la interfase. En los casos estudiados se hace evidente que la interpretación de las isothermas de adsorción requiere modelos complejos que incluyan al menos las principales interacciones detectadas.

12.La cantidad máxima de proteína adsorbida no se realiza cuando el  $pH$  coincide con el punto isoeléctrico de la Mioglobina.

13.El efecto iónico del medio es muy importante cuando existe repulsión electrostática entre la Mioglobina y la superficie de las partículas de látex.

14.No hay evidencias de que la Mioglobina sufra cambios conformacionales sobre el látex de clorometilostireno (menos hidrofóbico), sin embargo sí parecen producirse alteraciones estructurales sobre el látex de estireno (más hidrofóbico), siendo éstas de pequeña magnitud dada la relativamente elevada estabilidad estructural de la Mioglobina.

15.La clasificación de una molécula como *rígida* o como *blanda* en cuanto a la existencia de cambios conformacionales concomitantes en el proceso de adsorción no depende únicamente de las propiedades físico-químicas de la proteína, sino también de las características de la superficie adsorbente.

16.Mediante los experimentos realizados no hay evidencias concluyentes que permitan

afirmar el establecimiento de enlaces covalentes entre la Mioglobina y los grupos superficiales del látex de clorometilostireno.

## **A1. Criterios de Estabilidad.**

La función de transferencia constituye una representación completa de un sistema, de modo que si se conoce ésta, se puede obtener toda la información relativa al comportamiento de dicho sistema. Las raíces de la ecuación característica, es decir, los polos de la función de transferencia, gobiernan la respuesta dinámica. Los métodos de análisis de sistemas se ocupan de estudiar la localización de los polos y ceros de la función de transferencia en el plano  $s$  y  $z$ , así como la evolución de éstos conforme los parámetros de control varían de forma continua. Los métodos de diseño, que se apoyan en los métodos de análisis, tratan con el problema de fijar la posición de los polos y los ceros de modo que el sistema se comporte de acuerdo con las especificaciones preestablecidas.

De entre todas las especificaciones de diseño, el requerimiento más importante es el de la estabilidad del sistema, ya que un sistema inestable no tiene utilidad. La estabilidad se puede clasificar en absoluta (*¿es estable el sistema?*) y relativa (*si es estable, ¿a qué distancia está del límite de estabilidad?*). Nos ocuparemos sólo de la estabilidad absoluta y haremos primero un repaso sobre los conceptos de estabilidad (*Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996*).

### **A1.1. Estabilidad en sistemas continuos.**

---

Supongamos un sistema continuo con función de transferencia  $G(s)$  y propagador es  $g(t)$ . Con condiciones iniciales nulas, se dice que un sistema es estable de entrada-acotada/salida-acotada (EASA), o simplemente estable, si su salida  $y(t)$  es acotada para una entrada  $x(t)$  acotada. Esto implica que el área bajo la curva  $|g(t)|$  debe ser finita:

$$\int_0^{+\infty} |g(t)| dt < +\infty \quad (\text{A1.1})$$

Para que el sistema sea estable EASA, las raíces de la ecuación característica, es decir, los polos de  $G(s)$ , no pueden estar localizadas en el semiplano derecho del plano  $s$ . Si se verifica la condición expresada en la ecuación (A1.1), entonces:

$$\int_0^{+\infty} g(t) dt < +\infty \quad (\text{A1.2})$$

y este valor finito coincide con  $G(0)$ , la ganancia en estado estacionario del sistema, que también se ha representado por  $K_0$ .

Se dice que el sistema es estable de entrada nula, o simplemente estable, si la respuesta con entrada nula  $y(t)$  sujeta a condiciones iniciales finitas  $y^{(k)}(t_0)$  tiende a cero cuando  $t$  tiende a infinito. Esto implica que para cualquier conjunto finito  $y^{(k)}(t_0)$  existe un número positivo  $M$ , que depende de  $y^{(k)}(t_0)$ , tal que:

$$\begin{aligned} |y(t)| &\leq M < +\infty & t > t_0 \\ \lim_{t \rightarrow +\infty} |y(t)| &= 0 \end{aligned} \quad (\text{A1.3})$$

La estabilidad de entrada nula también se denomina estabilidad asintótica. Para que el sistema sea estable de entrada nula, las raíces de la ecuación característica deben localizarse en el semiplano izquierdo del plano  $s$ . Y como se comprueba, los dos tipos de estabilidad definidos poseen el mismo requisito sobre la posición de los polos de la función de transferencia. Por tanto, si un sistema es estable EASA, también será estable de entrada

nula o asintóticamente estable. Debido a esto, simplemente se hablará de sistema estable o inestable, según verifique o no alguna de las definiciones anteriormente expuestas.

Resumiendo las condiciones de estabilidad de sistemas lineales autónomos:

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <i>Estable</i>               | Todas las raíces poseen parte real negativa.  |
| <i>Marginalmente Estable</i> | No hay raíces con parte real positiva, pero alguna raíz simple tiene parte real nula. |
| <i>Inestable</i>             | Alguna raíz en el semiplano derecho $s$ o alguna raíz múltiple en el eje imaginario.  |

En la práctica hay varios métodos para determinar la estabilidad de sistemas lineales continuos sin tener que resolver directamente la ecuación característica: Criterio de Routh-Hurwitz, Criterio de Nyquist y Diagrama de Bode. Aunque los dos últimos son bastante más potentes que el primero (sobre todo el Criterio de Nyquist), como las funciones de transferencia que aparecen en esta memoria son fracciones algebraicas relativamente sencillas y los polinomios característicos no serán de grado mayor que tres, únicamente aplicaremos el Criterio de Routh-Hurwitz por ser más sencillo.

Si  $F(s)$  es el polinomio característico de grado  $n$  de un sistema continuo lineal autónomo, la ecuación característica es de la forma:

$$F(s) = \sum_{i=0}^n a_i s^i = 0 \quad (\text{A1.4})$$

donde todos los coeficientes son reales. Una condición necesaria (*Cardano-Vietta*) para que la ec. (A1.4) no tenga soluciones con parte real positiva es que se verifique que: todos los coeficientes de la ecuación tengan el mismo signo y ninguno de los coeficientes sea nulo.

El Criterio de Hurwitz afirma que la condición necesaria y suficiente para que todas las raíces de la ecuación (A1.4) tengan parte real negativa es que los *determinantes de*

*Hurwitz* de la ecuación,  $\{D_k\}_{i=1,\dots,n}$ , formados a partir de los coeficientes de la ecuación, sean todos positivos:

$$\begin{aligned}
 D_1 &= a_{n-1} \\
 D_2 &= \begin{vmatrix} a_{n-1} & a_{n-3} \\ a_n & a_{n-2} \end{vmatrix} \\
 D_3 &= \begin{vmatrix} a_{n-1} & a_{n-3} & a_{n-5} \\ a_n & a_{n-2} & a_{n-4} \\ 0 & a_{n-1} & a_{n-3} \end{vmatrix} \\
 &\vdots \\
 D_n &= \begin{vmatrix} a_{n-1} & a_{n-3} & a_{n-5} & \cdots & 0 \\ a_n & a_{n-2} & a_{n-4} & \cdots & 0 \\ 0 & a_{n-1} & a_{n-3} & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & a_0 \end{vmatrix}
 \end{aligned} \tag{A1.5}$$

Para simplificar el cálculo cuando  $n$  es elevado, se utiliza el método de tabulación de Routh, denominándose ahora Criterio de Roth-Hurwitz. Se construye la *Tabla de Routh* definida del siguiente modo:

$$\begin{array}{cccccc}
 s^n & a_n & a_{n-2} & a_{n-4} & \cdots & \\
 s^{n-1} & a_{n-1} & a_{n-3} & a_{n-5} & \cdots & \\
 s^{n-2} & b_1 & b_2 & b_3 & \cdots & \\
 s^{n-3} & c_1 & c_2 & c_3 & \cdots & \\
 \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \\
 s^0 & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & 
 \end{array} \tag{A1.6}$$

$$\begin{aligned}
 b_1 &= \frac{a_{n-1}a_{n-2} - a_n a_{n-3}}{a_{n-1}} & b_2 &= \frac{a_{n-1}a_{n-4} - a_n a_{n-5}}{a_{n-1}} & \dots \\
 c_1 &= \frac{b_1 a_{n-3} - a_{n-1} b_2}{b_1} & c_2 &= \frac{b_1 a_{n-5} - a_{n-1} b_3}{b_1} & \dots
 \end{aligned}$$

El Criterio de Routh-Hurwitz afirma que la condición necesaria y suficiente para que las raíces de la ec. (A1.4) tengan parte real negativa es que los elementos de la primera

columna de la tabla de Routh tengan el mismo signo. En caso contrario, el número de cambios de signo es igual al número de raíces con parte real positiva.

Si particularizamos el Criterio de Routh a una ecuación característica de 2º y 3º grado se obtienen los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}
 F(s) = a_0 + a_1s + a_2s^2 &\Rightarrow \begin{cases} a_0 > 0, a_1 > 0 \\ \text{signo}(a_0) = \text{signo}(a_1) = \text{signo}(a_2) \end{cases} \\
 &\hspace{15em} \text{(A1.7)} \\
 F(s) = a_0 + a_1s + a_2s^2 + a_3s^3 &\Rightarrow \begin{cases} a_0 > 0, a_1a_2 - a_0a_3 > 0, a_2 > 0, a_3 > 0 \\ \text{signo}(a_0) = \text{signo}(a_1) = \\ = \text{signo}(a_2) = \text{signo}(a_3) \end{cases}
 \end{aligned}$$

### A1.2. Estabilidad en sistemas discretos.

Podemos extender las definiciones de estabilidad a los sistemas discretos lineales y autónomos. Supongamos un sistema discreto cuya respuesta impulso es  $g(kT)$ . Con condiciones iniciales nulas, se dice que un sistema es estable de entrada-acotada/salida-acotada (EASA), o simplemente estable, si su salida  $y(kT)$  es acotada para una entrada  $x(kT)$  acotada. Esto implica que se cumple la condición:

$$\sum_0^{+\infty} |g(kT)| < +\infty \tag{A1.8}$$

Para que el sistema sea estable EASA, las raíces de la ecuación característica, es decir, los polos de  $G(s)$ , no pueden estar localizadas fuera del círculo unidad en el plano  $z$ . Si se verifica la condición expresada en la ecuación (A1.8), entonces:

$$\sum_0^{+\infty} g(kT) < +\infty \tag{A1.9}$$

y este valor finito coincide con  $G(I)$ , la ganancia en estado estacionario del sistema, que también se ha representado mediante  $K_0$ .

Se dice que el sistema es estable de entrada nula, o simplemente estable, si la respuesta con entrada nula  $y(kT)$  sujeta a condiciones iniciales finitas  $\{y(jT)\}_{j=0,\dots,k}$  tiende a cero cuando  $t$  tiende a infinito. Esto implica que para cualquier conjunto finito  $\{y(jT)\}_{j=0,\dots,k}$  existe un número positivo  $M$ , que depende de  $\{y(jT)\}_{j=0,\dots,k}$ , tal que:

$$\begin{aligned} |y(kT)| &\leq M < +\infty \\ \lim_{k \rightarrow +\infty} |y(kT)| &= 0 \end{aligned} \tag{A1.10}$$

denominándose también estabilidad asintótica este tipo de estabilidad. Para que el sistema sea estable de entrada nula, las raíces de la ecuación característica deben localizarse dentro del círculo unidad en el plano  $z$ . Como se observa, los dos tipos de estabilidad definidos poseen el mismo requisito sobre las raíces de la ecuación característica. Por tanto, si un sistema es estable EASA, también será estable de entrada nula o asintóticamente estable. Debido a esto, simplemente se hablará de sistema estable o inestable, según verifique o no alguna de las definiciones anteriormente expuestas.

Resumiendo las condiciones de estabilidad:

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <i>Estable</i>               | Todas las raíces poseen módulo menor que 1.                                   |
| <i>Marginalmente Estable</i> | No hay raíces con módulo mayor que 1, pero alguna raíz simple tiene módulo 1. |
| <i>Inestable</i>             | Alguna raíz tiene módulo mayor que 1 o alguna raíz múltiple tiene módulo 1.   |

En la práctica para estudiar la estabilidad de sistemas lineales discretos sin tener que resolver directamente la ecuación característica se pueden emplear los métodos de análisis para sistemas continuos: Criterio de Routh-Hurwitz, Criterio de Nyquist y Diagrama de Bode. Para ello se utiliza una transformación bilineal que hace corresponder el círculo unidad en el plano  $z$  con el eje imaginario en el plano  $s$ , es decir, establece una

correspondencia entre los límites de estabilidad en cada plano. Sin embargo, aplicaremos un método directo que se conoce con el nombre de Criterio de Jury.

Si  $F(z)$  es el polinomio característico de grado  $n$  de un sistema discreto lineal autónomo, la ecuación característica es de la forma:

$$F(z) = \sum_{i=0}^n a_i z^i = 0 \tag{A1.11}$$

donde todos los coeficientes son reales. Se construye la Tabla de Jury:

$$\begin{array}{cccccc}
 a_0 & a_1 & a_2 & \cdots & \cdots & a_{n-1} & a_n \\
 a_n & a_{n-1} & a_{n-2} & \cdots & \cdots & a_1 & a_0 \\
 b_0 & b_1 & b_2 & \cdots & \cdots & b_{n-1} & \\
 b_{n-1} & b_{n-2} & b_{n-3} & \cdots & \cdots & b_0 & \\
 c_0 & c_1 & c_2 & \cdots & c_{n-2} & & \\
 c_{n-2} & c_{n-3} & c_{n-4} & \cdots & c_0 & & \\
 \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & & & \\
 r_0 & r_1 & r_2 & r_3 & & & \\
 r_3 & r_2 & r_1 & r_0 & & & \\
 s_0 & s_1 & s_2 & & & & 
 \end{array} \tag{A1.12}$$

$$\begin{aligned}
 b_k &= \begin{vmatrix} a_0 & a_{n-k} \\ a_n & a_k \end{vmatrix} & c_k &= \begin{vmatrix} b_0 & b_{n-1-k} \\ b_{n-1} & b_k \end{vmatrix} \\
 s_0 &= \begin{vmatrix} r_0 & r_3 \\ r_3 & r_0 \end{vmatrix} & s_1 &= \begin{vmatrix} r_0 & r_2 \\ r_3 & r_1 \end{vmatrix} & s_2 &= \begin{vmatrix} r_0 & r_1 \\ r_3 & r_2 \end{vmatrix}
 \end{aligned}$$

El Criterio de Jury establece que las condiciones necesarias y suficientes para que todas las raíces de la ecuación (A1.11) son:

---


$$\begin{aligned}
& F(1) > 0 \\
& F(-1) \begin{cases} > 0 & n \text{ par} \\ < 0 & n \text{ impar} \end{cases} \\
& |a_0| < a_n \\
& |b_0| > |b_{n-1}| \\
& |c_0| > |c_{n-2}| \\
& \vdots \\
& |r_0| > |r_3| \\
& |s_0| > |s_2|
\end{aligned} \tag{A1.13}$$

Si particularizamos el Criterio de Jury para una ecuación característica de 2º y 3º grado se obtienen los siguientes resultados:

$$F(z) = a_0 + a_1z + a_2z^2 \Rightarrow \begin{cases} a_0 + a_1 + a_2 > 0 \\ a_0 - a_1 + a_2 > 0 \\ |a_0| < a_2 \\ |a_0 + a_2| > |a_1| \end{cases} \tag{A1.7}$$

$$F(z) = a_0 + a_1z + a_2z^2 + a_3z^3 \Rightarrow \begin{cases} a_0 + a_1 + a_2 + a_3 > 0 \\ a_0 - a_1 + a_2 - a_3 > 0 \\ |a_0| < a_3 \\ |a_0^2 - a_3^2| > |a_0a_2 - a_1a_3| \\ |a_0(a_0 + a_2) - a_3(a_3 + a_1)| > |a_0a_1 - a_2a_3| \end{cases}$$

## A2. Técnica del Lugar de las Raíces.

En el Apéndice A1 se ha indicado la importancia de los polos de la función de transferencia de lazo cerrado en el comportamiento dinámico del sistema. La localización de estos polos, raíces de la ecuación característica, en el plano  $s$  o  $z$  (según el sistema sea continuo o discreto) gobierna la estabilidad absoluta y relativa y las propiedades del comportamiento transitorio de un sistema. Por ello, una etapa muy importante del proceso de análisis de un sistema es el estudio de la evolución de dichos polos conforme algún parámetro del sistema varía. Es decir, la determinación de las trayectorias o *lugar geométrico de las raíces de la ecuación característica del sistema* cuando cierto parámetro del sistema toma valores en un intervalo concreto. En caso de haber varios parámetros variables, los lugares geométricos de las raíces se denominan *contornos de las raíces*.

En este apéndice se mostrará cómo construir los Diagramas del Lugar de las Raíces utilizando reglas simples de las cuales no se indicará su demostración, ya que en la bibliografía se encuentra ampliamente desarrollado este método (*Distefano et al., 1992; Leigh, 1992; Kuo, 1992; Kuo, 1996*). En nuestro caso no es importante que dichos diagramas no sean exactos; el aspecto esencial es la posibilidad de obtener información cualitativa sobre las características del sistema.

La técnica del lugar de las raíces no está restringida al estudio de sistemas. Es un método que se aplica de forma genérica al análisis del comportamiento de las raíces de cualquier ecuación algebraica con parámetros variables. Aplicada a sistemas controlados, es un ejemplo más, aparte del método de Nyquist o de Bode, de cómo las características de la función de transferencia en lazo abierto determinan el comportamiento del sistema en lazo cerrado.

Supongamos que en un sistema lineal autónomo controlado la relación entre la

---

señal de entrada,  $X(s)$ , y la de salida,  $Y(s)$ , viene dada por:

$$Y(s) = \frac{G(s)}{1 + G(s)G_{FB}(s)} X(s) \quad (\text{A2.1})$$

donde  $G(s)$  es la función de transferencia directa,  $G_{FB}(s)$  es la función de transferencia de retroalimentación,  $G(s)G_{FB}(s)$  es la función de transferencia en lazo abierto y todo el factor que multiplica a  $X(s)$  es la función de transferencia en lazo cerrado del sistema. La ecuación característica del sistema se obtiene al anular el denominador de la función de transferencia en lazo cerrado o polinomio característico:

$$1 + G(s)G_{FB}(s) = 0 \quad (\text{A2.2})$$

y las raíces de esta ecuación son los polos de la función de transferencia en lazo cerrado del sistema. Consideremos que la función de transferencia en lazo abierto contiene un parámetro variable  $K$  tal que, a partir de la ec. (A2.2), se puede llegar a la expresión siguiente:

$$1 + K \frac{Q(s)}{P(s)} = 0 \quad (\text{A2.3})$$

donde  $Q(s)$  y  $P(s)$  son polinomios de la variable  $s$ . Y esta última ecuación se puede escribir:

$$P(s) + KQ(s) = 0 \quad (\text{A2.4})$$

de modo que el problema de determinar el lugar geométrico de las raíces de un sistema controlado se puede identificar con el problema general de obtener el lugar geométrico de las raíces de una ecuación algebraica con parámetros variables. A la hora de aplicar esta técnica en el análisis del dispositivo microcalorimétrico el parámetro  $K$  será el parámetro (o los parámetros) de control, ya que los demás parámetros instrumentales son fijos.

Se definen los siguientes conceptos:

- *lugar de las raíces* parte del lugar geométrico de las raíces donde  $K$  toma valores positivos ( $0 \leq K < +\infty$ ).
- *lugar de las raíces complementario* parte del lugar geométrico de las raíces donde  $K$  toma valores negativos ( $-\infty < K \leq 0$ ).
- *contorno de las raíces* lugar geométrico de las raíces cuando hay más de un parámetro variable.

En lo que sigue se demostrará cómo el lugar geométrico de las raíces se puede construir a partir del conocimiento de las propiedades de  $Q(s)/P(s)$ , es decir, de las propiedades de la función de transferencia en lazo abierto,  $G(s)G_{FB}(s)$ . Se considerará que esta última función se puede expresar:

$$G(s)G_{FB}(s) = KG_1(s) = K \frac{Q(s)}{P(s)} \quad (\text{A2.5})$$

donde  $G_1(s)$  no depende del parámetro  $K$ . Entonces, la ec. (A2.2) se puede escribir:

$$G_1(s) = -\frac{1}{K} \quad (\text{A2.6})$$

por lo que si un punto  $s_0$  pertenece al lugar de las raíces, deben cumplirse simultáneamente dos condiciones:

- Condición de módulo

$$|G_1(s_0)| = \frac{1}{|K|} \quad -\infty < K < +\infty \quad (\text{A2.7})$$

- Condición de argumento

$$\left. \begin{aligned} \arg(G_1(s_0)) &= (2i+1)\pi & K \geq 0 \\ \arg(G_1(s_0)) &= 2i\pi & K \leq 0 \end{aligned} \right\} \quad i = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots \quad (\text{A2.8})$$

En la práctica, la segunda condición se emplea para determinar gráficamente el lugar geométrico de las raíces en el plano  $s$  (método de análisis de sistemas) y la primera condición se utiliza para determinar los valores de  $K$  sobre el lugar geométrico de las raíces una vez obtenidos los diagramas correspondientes (método de diseño).

La construcción del lugar geométrico de las raíces requiere el conocimiento de los polos,  $-p_i$ , y los ceros,  $-z_i$ , de la función de transferencia en lazo abierto, que se podrá escribir como:

$$G(s)G_{FB}(s) = KG_1(s) = K \frac{\prod_{i=1}^m (s + z_i)}{\prod_{i=1}^n (s + p_i)} \quad n > m \quad (\text{A2.9})$$

Si se aplican las condiciones de módulo y argumento (ecs. (A2.7) y (A2.8)), se obtiene el siguiente resultado:

$$|G_1(s_0)| = \frac{\prod_{i=1}^m |s_0 + z_i|}{\prod_{i=1}^n |s_0 + p_i|} = \frac{1}{|K|} \quad -\infty < K < +\infty \quad (\text{A2.10})$$

$$\begin{aligned} \arg(G_1(s_0)) &= \sum_{i=1}^m \arg(s_0 + z_i) - \sum_{i=1}^n \arg(s_0 + p_i) = (2i+1)\pi & K \geq 0 \\ \arg(G_1(s_0)) &= \sum_{i=1}^m \arg(s_0 + z_i) - \sum_{i=1}^n \arg(s_0 + p_i) = 2i\pi & K \leq 0 \end{aligned} \quad (\text{A2.11})$$

La ec. (A2.11) constituye un método gráfico de construcción del lugar geométrico de las raíces:

- Si un punto  $s_0$  del plano  $s$  pertenece al lugar de las raíces, la diferencia entre las sumas de los ángulos de los vectores dibujados desde los ceros y aquellos

dibujados desde los polos de  $G(s)G_{FB}(s)$  hasta  $s_0$  es un múltiplo impar de  $\pi$  radianes.

- Si un punto  $s_0$  del plano  $s$  pertenece al lugar de las raíces complementario, la diferencia entre las sumas de los ángulos de los vectores dibujados desde los ceros y aquellos dibujados desde los polos de  $G(s)G_{FB}(s)$  hasta  $s_0$  es un múltiplo par de  $\pi$  radianes.

Una vez determinado el lugar geométrico de las raíces, los valores de  $K$  a lo largo de éste se pueden obtener mediante la ec. (A2.10):

$$|K| = \frac{\prod_{i=1}^m |s_0 + p_i|}{\prod_{i=1}^n |s_0 + z_i|} \quad (\text{A2.12})$$

lo que indica que en cada punto  $s_0$  del lugar geométrico de las raíces el valor de  $|K|$  viene dado por el cociente entre los productos de los módulos de los vectores dibujados desde los polos y aquellos dibujados desde los ceros de  $G(s)G_{FB}(s)$  hasta  $s_0$ . El signo de  $K$  es positivo o negativo si  $s_0$  pertenece al lugar de las raíces o al lugar complementario, respectivamente.

El procedimiento de construcción del lugar geométrico de las raíces presentado no es operativo, salvo si se dispone de programas eficientes cálculo, ya que se limitaría a emplear el método de ensayo y error en la búsqueda de los posibles puntos  $s_0$  que pertenecen a dicho lugar, es decir, que verifiquen la condición de argumento (ecs. (A2.8) o (A2.11)). Por esta razón, es conveniente disponer de un conjunto de reglas, basadas en propiedades del lugar geométrico de las raíces, que permitan construir de forma rápida y manual, sin recurrir a cálculos engorrosos, los diagramas del lugar geométrico de las raíces. Los siguientes teoremas constituyen el conjunto de reglas básicas mencionado.

### Teorema 1

Los puntos del lugar geométrico de las raíces donde  $K=0$  son los polos (finitos o infinitos)

---

de  $G(s)G_{FB}(s)$ .

Los puntos del lugar geométrico de las raíces donde  $K=\pm\infty$  son los ceros (finitos o infinitos) de  $G(s)G_{FB}(s)$ .

A la hora de confeccionar los diagramas del lugar geométrico de las raíces se dibujan trayectorias en el plano  $s$  que comienzan en  $K=0$  y terminan en  $K=+\infty$  (lugar de las raíces) y trayectorias que comienzan en  $K=0$  y terminan en  $K=-\infty$  (lugar de las raíces complementario).

### Teorema 2

El número de ramas del lugar geométrico de las raíces de la ec. (A2.2) es igual al grado del polinomio característico.

### Teorema 3

El lugar geométrico de las raíces es simétrico respecto a los ejes de simetría de la configuración de polos y ceros de  $G(s)G_{FB}(s)$ . En concreto, el lugar geométrico de las raíces es simétrico respecto al eje real del plano  $s$ .

### Teorema 4

El lugar de las raíces posee  $2|n-m|$  asíntotas cuyos ángulos con el eje real vienen dados por:

$$\theta_i = \frac{2i+1}{|n-m|} \pi \quad i = 0, 1, 2, \dots, |n-m|-1 \quad (\text{A2.13})$$

El lugar de las raíces complementario posee  $2|n-m|$  asíntotas cuyos ángulos con el eje real vienen dados por:

$$\theta_i = \frac{2i}{|n-m|} \pi \quad i = 0, 1, 2, \dots, |n-m|-1 \quad (\text{A2.14})$$

### Teorema 5

El punto de intersección de las  $2|n-m|$  asíntotas del lugar geométrico de las raíces,  $\sigma_I$ , está localizado en el eje real del plano  $s$  y viene dado por:

$$\sigma_1 = \frac{-1}{n-m} \left( \sum_{i=1}^n p_i - \sum_{i=1}^m z_i \right) \quad (\text{A2.15})$$

### Teorema 6

El eje real completo del plano  $s$  está ocupado por el lugar geométrico de las raíces.

Un intervalo del eje real del plano  $s$  pertenece al lugar de las raíces si el número total de polos y ceros de  $G(s)G_{FB}(s)$  a la derecha de dicho intervalo es impar.

Un intervalo del eje real del plano  $s$  pertenece al lugar de las raíces complementario si el número total de polos y ceros de  $G(s)G_{FB}(s)$  a la derecha de dicho intervalo es par.

### Teorema 7

Los puntos de ruptura sobre el lugar geométrico de las raíces,  $\sigma_2$ , corresponden a raíces múltiples de la ec. (A2.2), es decir, polos múltiples de la función de transferencia en lazo cerrado, y satisfacen la siguiente condición (no suficiente):

$$\left. \frac{dG_0(s)}{ds} \right|_{s=\sigma_2} = 0 \quad (\text{A2.16})$$

Si en un punto de ruptura confluyen  $n$  ramas, llegan o parten con ángulos de  $\pi/n$  radianes.

A partir del lugar geométrico de las raíces se pueden determinar los valores máximos y mínimos permitidos para el parámetro  $K$  de modo que el sistema sea estable. Se definen dos índices que se utilizan para representar la estabilidad relativa:

#### Margen de ganancia (MG)

$$MG = \frac{K|_{\text{límite}}}{K} \quad (\text{A2.17})$$

#### Margen de fase (MF)

$$\begin{aligned} MF &= 180^\circ + \arg(G(s_1)G_{FB}(s_1)) \\ s_1 &= j\omega_1 \quad |G(s_1)G_{FB}(s_1)| = 1 \end{aligned} \quad (\text{A2.18})$$

Todo el desarrollo anterior considera un único parámetro  $K$  variable en la ecuación característica (ec. (A2.2)). A veces aparecen varios parámetros variables en la ecuación característica y se debe recurrir a una generalización del lugar geométrico de las raíces

---

denominada *contornos de las raíces*. Los contornos de las raíces poseen las mismas propiedades que el lugar geométrico de las raíces para un parámetro sencillo, por lo que el procedimiento de construcción es el mismo.

Supongamos que la ecuación característica desarrollada análoga a la ec. (A2.4) es:

$$P(s) + K_1 Q_1(s) + K_2 Q_2(s) = 0 \quad (\text{A2.19})$$

donde  $K_1$  y  $K_2$  son los parámetros variables y  $P(s)$ ,  $Q_1(s)$  y  $Q_2(s)$  son polinomios en  $s$ . Primero se considera que uno de los parámetros ( $K_2$ , por ejemplo) es nulo. Entonces, la ec. (A2.19) queda:

$$P(s) + K_1 Q_1(s) = 0 \quad (\text{A2.20})$$

que únicamente contiene un parámetro variable,  $K_1$ , por lo que es posible construir el lugar geométrico de las raíces para el parámetro  $K_1$  correspondiente a la ec. (A2.20) teniendo en cuenta la configuración de polos y ceros de  $G_1(s)$ :

$$1 + K \frac{Q_1(s)}{P(s)} = 1 + K G_1(s) = 0 \quad (\text{A2.21})$$

Ahora se considera que  $K_1$  es un parámetro fijo y que  $K_2$  es un parámetro variable. La ec. (A2.19) se puede expresar:

$$1 + K_2 \frac{Q_2(s)}{P(s) + K_1 Q_1(s)} = 1 + K_2 G_2(s) = 0 \quad (\text{A2.22})$$

y se construye el lugar geométrico de las raíces para el parámetro  $K_2$  correspondiente a la ec. (A2.22) teniendo en cuenta la configuración de polos y ceros de  $G_2(s)$ . Los polos de  $G_2(s)$  son justamente las raíces de la ec. (A2.21), por lo que los contornos de las raíces cuando  $K_2$  es variable deben comenzar ( $K_2=0$ ) sobre el lugar geométrico de las raíces de la ec. (A2.21).

La técnica del lugar geométrico de las raíces es aplicable a sistemas discretos en el tiempo. Obtenida la función de transferencia en lazo cerrado, o en su caso la respuesta impulso unitario, en términos de la Transformada Z, se puede construir el lugar geométrico de las raíces en el plano  $z$  empleando las mismas reglas básicas que se han indicado en el desarrollo anterior. La ecuación característica del sistema en el plano  $z$  es:

$$1 + [GG_{FB}](z) = 0 \quad (\text{A2.23})$$

y en el plano  $s$  se escribe:

$$1 + (GG_{FB})^*(s) = 0 \quad (\text{A2.24})$$

donde el asterisco indica una operación muestreo, de modo que:

$$(GG_{FB})^*(s) = \frac{1}{T} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} G(s + jn\omega_s)G_{FB}(s + jn\omega_s) \quad (\text{A2.25})$$

donde  $T$  y  $\omega_s$  son el período y la frecuencia de muestreo. Al ser la expresión indicada en la ec. (A2.25) una serie infinita, los polos y ceros de  $(GG_{FB})^*(s)$  en el plano  $s$  serán infinitos en número y esto complica la construcción del lugar geométrico de las raíces en el plano  $s$ . La solución de este problema consiste en utilizar la ec. (A2.23) en el plano  $z$  como ecuación característica. Siendo  $[GG_{FB}](z)$  una función racional de la variable  $z$ , tendrá un número finito de polos y ceros.

## Bibliografía.

Adamson A.W., *Physical Chemistry of Surfaces* Ed. John Wiley & Sons, New York (1976).

Adkins C.J., *Termodinámica del Equilibrio* Ed. Reverté S.A., Spain (1977).

Afinsen C.B., *Science* **181** (1973) 223.

Afinsen C.B., Scheraga H.A., *Adv. Prot. Chem.* 29 (1975) 205.

Aki H., Goto M., Yamamoto M., *Thermochim. Acta* **251** (1995) 379.

Al-Malah K., McGuire J., Sproull R., *J. Colloid Interface Sci.* **170** (1995) 261.

Ambrosetti R., Ceccanti N., Festa C., *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **16** (1983) 265.

Anderson H., Hartmann H., *Thermochim. Acta* **229** (1993) 229.

Arai T., Norde W., *Colloids Surfaces* **51** (1990) 1.

Arena G., Calí R., Maccarrone G., Purrello R., *Thermochim. Acta* **155** (1989) 353.

Bagchi P., Birnbaum S.M., *J. Colloid Interface Sci.* **85** (1981) 460.

Bagchi P., Birnbaum S.M., *J. Colloid Interface Sci.* **91** (1981b) 248.

Baldwin R.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83** (1986) 8069.

Bale Oenick M.D., Warshawsky A., *Colloid Polym. Sci.* **269** (1991) 139.

Barthel J., *Thermometric Titrations*, Ed. John Wiley & Sons, U.S.A. (1975).

Basinska T., Slomkowski S., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **3** (1991) 115.

Bastos González D., Ortega Vinuesa J.L., De las Nieves F.J., Hidalgo Álvarez R., *J.*

---

*Colloid Interface Sci.* **176** (1995) 232.

Beezer A.E., *Application of Calorimetry in Life Sciences* (I. Lamprecht y B. Schaarschmidt, Eds.) Ed. Walter de Gruyter, Berlin (1977) 109.

Beezer A.E., *Biological Microcalorimetry* Ed. Academic Press, U.K. (1980) 331.

Betton F., Theretz A., Elaissari A., Pichot C., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **1** (1993) 97.

Blume A., *Thermochim. Acta* **193** (1991) 299.

Bondi A., *J. Phys. Chem.* **68** (1964) 441.

Bos M.A., Shervani Z., Anusiem A.C.I., Giesbers M., Norde W., Kleijn J.M., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **3** (1994) 91.

Bowers L.D., Carr P.W., *Anal. Chem.* **48** (1976) 544A.

Buckingham A.D. et al., *Chem. Rev.* **88** (1988) 963.

Buckton G., *Thermochim. Acta* **248** (1995) 117.

Calvet E., Prat H., *Microcalorimétrie: Applications physicochimiques et biologiques* Ed. Masson, Paris(1956).

Calvet E., Prat H., *Recent Progress in Microcalorimetry* Ed. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris (1963).

Cesari E., Torra V., Macqueron J.L., Prost R., Dubes J.P., Tachoire H., *Thermochim. Acta* **53** (1982a) 1.

Cesari E., Viñals J., Torra V., *Thermochim. Acta* **53** (1982b) 67.

Cesari E., Viñals J., Torra V., Ortín J., Macqueron J.L., Dubes J.P., Kechavarz R., Tachoire H., *Thermochim. Acta* **79** (1984) 23.

Chang I.N., Lin J.N., Andrade J.D., Herron J. N., *J. Colloid Interface Sci.* **174** (1995) 10.

Chaves M.M., Lima e Silva F.C., Mares-Guia M., Nogueira Machado J.A., *Thermochim. Acta* **241** (1994) 87.

Chen W.Y., Lee J.F., Wu C.F., Tsao H.K., *J. Colloid Interface Sci.* **190** (1997) 49.

Chiu T.H., Nyilas E., Turcotte L.R., *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs* **24** (1978) 389.

Christensen J.J., Izatt R.M., *J. Phys. Chem.* **66** (1962) 1030.

- Christensen J.J., Izatt R.M., Hansen L.D., *Rev. Sci. Instrum.* **36** (1965) 779.
- Christensen J.J., Rytting J.H., Izatt R.M., *J. Chem. Soc.* (1970a) 1643.
- Christensen J.J., Rytting J.H., Izatt R.M., *Biochem.* **9** (1970b) 4907.
- Christensen J.J., Ruckman J., Eatough D.J., Izatt R.M., *Thermochim. Acta* **3** (1972) 203.
- Christensen J.J., Gardner J.W., Eatough D.J., Izatt R.M., Watts D.J., Hart R.M., *Rev. Sci. Instrum.* **44** (1973) 481.
- Christensen J.J., Hansen L.D., Eatough D.J., Izatt R.M., Hart R.M., *Rev. Sci. Instrum.* **47** (1976a) 730.
- Christensen J.J., Hansen L.D., Izatt R.M., *Handbook of Proton Ionization Heats and Related Thermodynamic Quantities* Ed. John Wiley & Sons, New York (1976b).
- Christensen J.J., Hansen L.D., Izatt R.M., Eatough D.J., Hart R.M., *Rev. Sci. Instrum.* **52** (1981) 1226.
- Cortijo M., Beldarrain A., Molina A.D., López Lacomba J.L., *Meas. Sci. Technol.* **6** (1995) 1086.
- Cullen D.C., Lowe C.R., *J. Colloid Interface Sci.* **166** (1994) 102.
- Dabrowski A., Podkoscielny P., Goworek J., Garbacz J.K., *Thermochim. Acta* **259**, (1995) 71.
- Dantzer P., Guillot A., *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **15** (1985) 1373.
- Dékány I., Marosi T., Király Z., Nagy L.G., *Colloid Surfaces* **49** (1990) 81.
- Della Gatta G., *Thermochim. Acta* **96** (1985) 349.
- Dill K.A., *Biochem.* **29** (1990) 7133.
- Distefano J.J., Stubberud A.R., Williams I.J., *Retroalimentación y Sistemas de Control* Ed. McGraw-Hill Interamericana S.A. Colombia (1992).
- Douillard R., Lefebvre J., Tran V., *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **78** (1993) 109.
- Dubes J.P., Barres M., Tachoire H., *Thermochim. Acta* **19** (1977) 101.
- Dubes J.P., Kechavarz R., Tachoire H., *Thermochim. Acta* **79** (1984) 15.
- Duinhoven S., Poort R., Van der Voet G., Agerof W.G.M., Norde W., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.* **170** (1995a) 340.

---

Duinhoven S., Poort R., Van der Voet G., Agterof W.G.M., Norde W., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.* **170** (1995b) 351.

Dunn M.J., *Determination of total protein concentration* En *Protein Purification Methods* (Eds. Harris E.L.V., Angal S.) Ed. IRL Press Oxford University Press (1989).

Eatough D.J., Christensen J.J., Izatt R.M., *Thermochim. Acta* **3** (1972a) 219.

Eatough D.J., Izatt R.M., Christensen J.J., *Thermochim. Acta* **3** (1972b) 233.

Elgersma A.V. Zsom R.L.J., Norde W., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.*, **138** (1990) 145.

Elgersma A.V. Zsom R.L.J., Norde W., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.*, **154** (1991) 89.

El Harrous M., Gill S.J., Parody Morreale A., *Meas. Sci. Technol.* **5** (1994a) 1065.

El Harrous M., López Mayorga O., Parody Morreale A., *Meas. Sci. Technol.* **5** (1994b) 1071.

Evans S.V., Brayer G. D., *J. Mol. Biol.* **213** (1990) 885.

Everett D.H., *Trans. Faraday Soc.* **60** (1964) 1803.

Everett D.H., *Trans. Faraday Soc.* **61** (1965) 2478.

Feng L., Andrade J.D., *J. Biomed. Mater. Res.* **27** (1993) 177.

Filippov L., *Colloid Polym. Sci.* **272** (1994) 1043.

Filippova N.L., *J. Colloid Interface Sci.* **195** (1997) 203.

Fisicaro E., *Thermochim. Acta* **113** (1987) 125.

Fubini B., *Thermochim. Acta* **135** (1988) 19.

Fubini B., *Thermochim. Acta* **148** (1989) 37.

Fujieda S., Nakanishi M., *Thermochim. Acta* **94** (1985) 277.

Fujieda S., Nakanishi M., *Thermochim. Acta* **111** (1987) 167.

Fujieda S., *Thermochim. Acta* **126** (1988) 165.

Fujieda S., Kawahito J., *Thermochim. Acta* **190** (1991) 175.

Freire E., López Mayorga O., Straume M., *Anal. Chem.* **62** (1990) 950A.

- Fujita T., Nunomura K., *Calorimetric studies of yeast metabolism under nongrowing conditions*. En *Applications of Calorimetry in Life Sciences* (I. Lamprecht y B. Schaarschmidt, Eds.) Ed. Walter de Gruyter, Berlin (1977) 119.
- Gaillard J.L., *Thermochim. Acta* **90** (1985) 15.
- Galisteo González F., *Tesis Doctoral* Universidad de Granada (1992).
- Galisteo González F., Puig J., Martín Rodríguez A., Serra Domènech J., Hidalgo Álvarez R., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2** (1994a) 435.
- Galisteo González F., Martín Rodríguez A., Hidalgo Álvarez R., *Colloid Polym. Sci.* **272** (1994b) 352.
- Galisteo F., Norde W., *J. Colloid Interface Sci.* **172** (1995) 502.
- Galisteo F., Norde W., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **4** (1995b) 389.
- Galisteo F., Norde W., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **4** (1995c) 375.
- García Fuentes L., *Tesis Doctoral* Universidad de Granada (1994).
- Gebben B., van Houwelingen G.D.B., Zhang W., van den Boomgaard T., Smolders C.A., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **3** (1994) 75.
- Giacomelli C.E., Avena M.J., De Pauli C.P., *J. Colloid Interface Sci.* **188** (1997) 387.
- Gorry P., *Anal. Chem.* **62** (1990) 570.
- Gravelle P.C., *Thermochim. Acta* **72** (1984) 103.
- Gravelle P.C., *Thermochim. Acta* **96** (1985) 365.
- Grønlund F., *Thermochim. Acta* **175** (1991) 63.
- Gutte B., Merrifield R.B., *J. Amer. Chem. Soc.* **91** (1969) 501.
- Hajra S., Chattoraj D.K., *Ind. J. Biochem. & Biophys.* **28** (1991) 114.
- Handy B.E., Sharma S.B., Spiewak B.E., Dumesic J.A., *Meas. Sci. Technol.* **4** (1993) 1350.
- Hansen L.D., Jensen T.E., Mayne S., Eatough D.J., Izatt R.M., Christensen J.J., *J. Chem. Thermodyn.* **7** (1975) 919.
- Hansen L.D., Eatough D.J., *Thermochim. Acta* **70** (1983) 257.
- Harvey S.C., *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **5** (1989) 78.

- 
- Hatt J., Margas E., Zielenkiewicz W., *Thermochim. Acta* **64** (1983) 305.
- Haynes C.A., Norde W., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* (1994a) 1.
- Haynes C.A., Norde W., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2** (1994b) 517.
- Haynes C.A., Sliwinsky E., Norde W., *J. Colloid Interface Sci.* **164** (1994b) 394.
- Haynes C.A., Norde W., *J. Colloid Interface Sci.* **169** (1995) 313.
- Heminger W., Höhne G., *Calorimetry. Fundamentals and Practice* Ed. Verlag Chemie GmbH, Germany (1984).
- Hidalgo Álvarez R., Galisteo F., *Heter. Chem. Rev.* **2** (1995) 249.
- Höhne G.W.H., *Thermochim. Acta* **22** (1978) 347.
- Hunter R.J., *Zeta Potential in Colloid Science* Ed. Academic Press (1981).
- Hunter R.J., *Foundations in Colloid Science* vol. 1-2 Ed. Clarendon Press, Oxford (1989).
- Ippolito J.A. et al., *J. Mol. Biol.* **215** (1990) 457.
- Israelachvili J.N., *Quart. Rev. Biophys.* **6** (1982) 341.
- Israelachvili J.N., *Intermolecular and Surface Forces* Ed. Academic Press, U.K. (1995).
- Izatt R.M., Rytting J.H., Christensen J.J., *J. Phys. Chem.* **71** (1967) 2700.
- Izatt R.M., Redd E.H., Christensen J.J., *Thermochim. Acta* **64** (1983) 355.
- Johnson J.E., Matijevic E., *Colloid Polym. Sci.* **270** (1992) 353.
- Jordan J., Grime J.K., Wangh D.H., Miller C.D., Cullis H.M., Lohr D., *Anal. Chem.* **48** (1976) 427A.
- Karlsen L., Sjøberg H., Villadsen J., *Thermochim. Acta* **72** (1984) 83.
- Király Z., Dékány I., *Colloid Surfaces*, **49** (1990) 95.
- Klaassen K.B., van Peppen J.C.L., *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **19** (1986) 577.
- Kollman P.A., *Acc. Chem. Res.* **10** (1977) 365.
- Kondo A., Oku S., Higashitani K., *Biotech. & Bioeng.* **37** (1991) 537.
- Kondo A., Higashitani K., *J. Colloid Interface Sci.* **150** (1992) 344.
- Koutsoukos P.G., Mumme Young C.A., Norde W., Lyklema J., *Colloids Surfaces* **5** (1982)

93.

Koutsoukos P.G., Norde W., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.* **95** (1983) 385.

Kronberg B., *J. Colloid Interface Sci.* **96** (1983) 55.

Kronberg B., Stenius P., *J. Colloid Interface Sci.* **102** (1984) 410.

Kuo B.C., *Digital Control Systems* 2nd Ed. Saunders College Publishing, U.S.A (1992).

Kuo, B.C., *Sistemas Automáticos de Control* Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A., Méjico (1996).

Lahti M., Avela A., Seppälä J., *Thermochim. Acta* **262** (1995) 13.

Landau R.N., *Thermochim. Acta* **289** (1996) 101.

LeBlond C., Wang J., Larsen R.D., Orella C.J., Forman A.L., Landau R.N., Laquidara J., Sowa J.R., Blackmond D.G., Sun Y.K., *Thermochim. Acta* **289** (1996) 189.

Leigh J.R., *Applied Digital Control: Theory, Design and Implementation* 2nd Ed. Prentice Hall International, U.K. (1992).

Löblich K.R., *Thermochim. Acta* **231** (1994a) 7.

Löblich K.R., *Thermochim. Acta* **236** (1994b) 39.

Löfås S., Johnsson B., Tegendal K., Rönnerberg I., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **1** (1993) 83.

López Mayorga O., Mateo P.L., Mira J., Cortijo M., *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **17** (1984) 1231.

López Mayorga O., Mateo P.L., Cortijo M., *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **20** (1987) 265.

Lu D.R., Lee S.J., Park K., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **3** (1991) 127.

Lyklema J., *Fundamentals of Interface and Colloid Science* Ed. Academic Press, Londres (1991).

Lyklema J., Norde W., *Progr. Colloid Polym. Sci.* **101** (1996) 9.

Macqueron J.L., Ortín J., Thomas G., Torra V., *Thermochim. Acta* **67** (1983) 213.

Makhatadze G.I., Privalov P.L., *Adv. Prot. Chem.* **47** (1995) 307.

Marco F., Rodríguez de Rivera M., *Thermochim. Acta* **89** (1985) 315.

- 
- Marco F., Rodríguez de Rivera M., Ortín J., Serra T., Torr, *Thermochim. Acta* **102** (1986a) 173.
- Marco F., Rodríguez de Rivera M., Ortín J., Serra T., Torra V., *Thermochim. Acta* **107** (1986b) 149.
- Margas E., Zielenkiewicz W., *Thermochim. Acta* **215** (1993a) 9.
- Margas E., Torra V., Zielenkiewicz W., *Thermochim. Acta* **215** (1993b) 15.
- Martín A., Puig J., Galisteo F., Serra J., Hidalgo Álvarez R., *J. Dispersion Sci. & Technol.* **13** (1992) 399.
- Martín A., *Tesis Doctoral* Universidad de Granada (1993).
- Matthew J.B., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **14** (1985) 387.
- McGlashan M.L., *Thermochim. Acta* **72** (1984) 55.
- McKinnon I.R., Fall L., Parody Morreale A., Gill S.J., *Anal Biochem.* **139** (1984) 134.
- Melcor, *Miniature Ceramic Modules Series FC* Materials Electronics Products Corporation, U.S.A. 1985.
- Molina Bolívar J.A., *Memoria de Licenciatura* Universidad de Granada (1995).
- Monkanol D., Wadsö I., *Acta Chem. Scand.* **22** (1968) 1842.
- Moore J.H., Davis C.C., Coplan M.A., *Building Scientific Apparatus* Ed. Addison Wesley Publishing Company (1983) U.S.A.
- Müller K.H., Plessner T., *Thermochim. Acta* **119** (1987) 189.
- Müller N., *Acc. Chem. Res.* **23** (1990) 23.
- Nakanishi M., Fujieda S., *Thermochim. Acta* **43** (1981) 189.
- Navarro J., Cesari E., Torra V., Macqueron J.L., Dubes J.P., Tachoire H., *Thermochim. Acta* **52** (1982) 175.
- Norde W., *Tesis Doctoral* Universidad de Wageningen, Países Bajos (1976).
- Norde W., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.* **66** (1978) 257.
- Norde W., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.* **71** (1979) 350.
- Norde W., *Croat. Chem. Acta* **56** (1983) 705.
- Norde W., *Colloids Surfaces* **10** (1984) 21.

- Norde W., *Probing Protein Adsorption via Microcalorimetry En Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers* (J.D. Andrade Ed.) Ed. Plenum Press, New York, (1985).
- Norde W., MacRitchie F., Nowicka G., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.* **112** (1986) 447.
- Norde W., Lyklema J., *Colloids Surfaces* **38** (1989) 1.
- Norde W., Arai T., Shirahama H., *Biofouling* **4** (1991a) 37.
- Norde W., Lyklema J., *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **2** (1991b) 183.
- Norde W., Favier J.P., *Colloids Surfaces* **64** (1992) 87.
- Norde W., Anusiem A.C.I., *Colloids Surfaces* **66** (1992a) 73.
- Norde W., *Clin. Mater.* **11** (1992b) 85.
- Norde W., *J. Dispersion Sci. & Technol.* **13** (1992c) 363.
- Norde W., *Pure Appl. Chem.* **66** (1994) 491.
- Norde W., Galisteo González F., Haynes C.A., *Polym. Adv. Technol.* **6** (1994b) 518.
- Nyilas E., Chiu T.C., Herzlinger G.A., *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs* **20** (1974) 480.
- Oppenheim A.V., Schafer R.W., *Digital Signal Processing, Ed. Prentice-Hall, U.S.A.* (1975)
- Ortega Vinuesa J.L., Hidalgo Álvarez R., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1** (1993) 365.
- Ortega Vinuesa J.L. Hidalgo Álvarez R., *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **6** (1994) 269.
- Ortega Vinuesa J.L. *Tesis Doctoral* Universidad de Granada (1995a).
- Ortega Vinuesa J.L., Bastos González D., Hidalgo Álvarez R., *J. Colloid Interface Sci.* **176** (1995b) 240.
- Ortega Vinuesa J.L., Gálvez Ruiz M.J., Hidalgo Álvarez R., *J. Surface Sci. Technol* **11** (1995b) 59.
- Ortega Vinuesa J.L., Bastos González D. Hidalgo Álvarez R., *J. Colloid Interface Sci.* **184** (1996) 331.
- Ortín J., Ramos A., Torra V., Viñals J., *Thermochim. Acta* **75** (1984a) 173.

---

Ortín J., Ramos A., Torra V., Viñals J., Margas E., Zielenkiewicz W., *Thermochim. Acta* **76** (1984b) 325.

Ortín J., Torra V., Thomas G., Álvarez L., Rodríguez de Rivera M., *Thermochim. Acta* **97** (1986) 203.

Oscarson J.L., Izatt R.M., Christensen J.J., *Thermochim. Acta* **100** (1986) 271.

Owens A.R., *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **15** (1982) 789.

Pefferkorn E., *Adv. Colloid Interface Sci.* **56** (1995) 33.

Peula García J.M., *Tesis Doctoral* Universidad de Granada (1995).

Peula García J.M., Hidalgo Álvarez R., De las Nieves F.J., *J. Colloid Interface Sci.*, **200** (1998a).

Peula García J.M., Hidalgo Álvarez R., De las Nieves F.J., *J. Colloid Interface Sci.*, **200** (1998b).

Picker P., Jolicoeur C., Desnoyers J.E., *J. Chem. Thermodyn* **1** (1969) 459.

Pimentel G.C., McLellan A.L., *Ann. Rev. Phys. Chem.* **22** (1971) 347.

Pollard J.H., *Numerical and Statistical Techniques* Ed. Cambridge University Press, U.K. (1977).

Pratt L.R., Chandler D., *J. Chem. Phys.* **67** (1977) 3683.

Privalov P.L., Plotnikov V.V., Filimonov V.V., *J. Chem. Thermodyn.* **7** (1975) 41.

Privalov P.L., Gill S.J., *Adv. Prot. Chem.* **39** (1988) 191.

Privalov P.L., Gill S.J., *Pure Appl. Chem.* **61** (1989) 1097.

Quesada Pérez M., Callejas Fernández J., Hidalgo Álvarez R., *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* (1998) enviado para su publicación.

Randzio S.L., *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **11** (1978) 145.

Randzio S.L., Suurkuusk J., *Interpretation of Calorimetric Thermograms and their Dynamic Corrections*. En *Biological Microcalorimetry* (A.E. Beezer, Ed.) Ed. Academic Press, U.K. (1980) 331.

Randzio S.L., *Thermochim. Acta* **44** (1981) 1.

Rañada A., *Dinámica Clásica* Ed. Alianza Editorial S.A., Madrid (1994).

Regenass W., *Thermochim. Acta* **95** (1985) 351.

- Rey C., Rodríguez J.R., Pérez Villar V., *Thermochim. Acta* **61** (1983) 1.
- Rey C., Pérez Villar V., Rodríguez J.R., *Thermochim. Acta* **81** (1984) 87.
- Rey C., Pérez Villar V., Rodríguez J.R., *Thermochim. Acta* **87** (1985a) 297.
- Rey C., Pérez Villar V., Rodríguez J.R., Torra V., *Thermochim. Acta* **89** (1985b) 307.
- Rey C., *Thermochim. Acta* **147** (1989) 145.
- Rodríguez J.R., Rey C., Pérez Villar V., Torra V., Ortín J., Viñals J., *Thermochim. Acta* **63** (1983) 331.
- Rodríguez J.R., Rey C., Pérez Villar V., *Thermochim. Acta* **75** (1984) 51.
- Rodríguez de Rivera M., Socorro F., Dubes J.P., Tachoire H., Torra V., *Thermochim. Acta* **150** (1989) 11.
- Rogers N.K., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **48** (1986) 37.
- Röhl W., von Rybinski W., Schwuger M.J., *Progr. Colloid Polym Sci.* **84** (1991) 206.
- Rouquerol J., *Thermochim. Acta* **95** (1985a) 337.
- Rouquerol J., *Thermochim. Acta* **96** (1985b) 377.
- Rouquerol J., Zielenkiewicz W., *Thermochim. Acta* **109** (1986) 121.
- Rowe S.M., *Thermochim. Acta* **289** (1996) 167.
- Sadana A., *Chem. Rev.* **92** (1992) 1799.
- Sanahuja A., *Thermochim. Acta* **90** (1985) 9.
- Sari J.C., Gilli R., Peyrot V., Briand C., *Thermochim. Acta* **147** (1989) 119.
- Sarkar D., Chattoraj D.K., *J. Surface Sci. Technol.* **8** (1992) 231.
- Sarkar D., Chattoraj D.K., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2** (1994) 411.
- Sarobe J., Molina Bolívar J.A., Forcada J., Galisteo F., Hidalgo Álvarez R., *Macromol.* (1998) aceptado para su publicación.
- Savitzky A., Golay M.J.E., *Anal. Chem.* **36** (1964) 1627.
- Schachinger L., Hochhäuser E., Ohiaeri J., *Thermochim. Acta* **69** (1983) 269.
- Schönborn K.H., *Thermochim. Acta* **69** (1983) 103.

- 
- Seidel J., *Thermochim. Acta* **229** (1993) 257.
- Sharp K.A., Honig B., *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **19** (1990) 301.
- Shirahama H., Lyklema J., Norde W., *J. Colloid Interface Sci.* **139** (1990) 177.
- Sigma, *Catálogo de Reactivos Bioquímicos y Orgánicos para Biociencias*, Sigma Chemical Co. (1997)
- Silva da Rocha M., Iha K., Faleiros A.C., Corat, Vázquez Suárez Iha M.E., *J. Colloid Interface Sci.* **185** (1997) 493.
- Smith E.B., Barnes C.S., Carr P.W., *Anal. Chem.* **44** (1972) 1663.
- Spink C.H., Wadsö I., *Methods in Biochemical Analysis* (D. Glick, Eds.) Ed. Wiley, New York (1975).
- Spokane R.B., Gill S.J., *Rev. Sci. Instrum.* **52** (1981) 1728.
- Stryer L., *Bioquímica* Ed. Reverté, Barcelona (1988).
- Sturtevant J.M., *Methods in Enzymology* (C.H.W. Hirs y S.N. Timasheff. Eds.) Ed. Academic Press, New York (1972) 227.
- Suen C-H., Morawetz H., *Makromol. Chem.* **186** (1985) 255.
- Tachoire H., Torra V., *Thermochim. Acta* **110** (1987) 171.
- Tadros T.F., *Polymer in Colloid Systems. Adsorption, Stability and Flow* Ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1988).
- Tanaka S., *Thermochim. Acta* **25** (1978) 269.
- Tanaka S., *Thermochim. Acta* **61** (1983) 147.
- Tanaka S., *Thermochim. Acta* **115** (1987) 303.
- Tanaka S., *Thermochim. Acta* **156** (1989) 117.
- Tanaka S., *Thermochim. Acta* **204** (1992) 261.
- Tanaka S., Maeda Y., *Thermochim. Acta* **273** (1996) 269.
- Taylor R., Kennard O., *Acc. Chem. Res.* **17** (1977) 320.
- van Dulm P., Norde W., Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.* **82** (1981) 77.
- van Dulm P., Norde W., *J. Colloid Interface Sci.* **91** (1983) 248.

- van Oss C.J., Singer J.M., *J. Reticuloend. Soc.* **3** (1966) 29.
- Velázquez Campoy A., López Mayorga O., Cabrerizo Vélchez M.A., *J. Thermal Anal.* (1998a) aceptado para su publicación.
- Velázquez Campoy A., López Mayorga O., Cabrerizo Vélchez M.A., *J. Thermal Anal.* (1998b) aceptado para su publicación.
- Wadsö I., *Application of Calorimetry in Life Sciences* (I. Lamprecht y B. Schaarschmidt, Eds.) Ed. Walter de Gruyter, Berlin, New York (1977) 225.
- Wadsö I., *Thermochim. Acta* **85** (1985a) 245.
- Wadsö I., *Thermochim. Acta* **88** (1985b) 35.
- Wadsö I., *Thermochim. Acta* **88** (1985c) 169.
- Wadsö I., *Thermochim. Acta* **96** (1985d) 313.
- Wadsö I., *Thermochim. Acta* **169** (1990) 151.
- Wadsö I., *Thermochim. Acta* **267** (1995) 45.
- Wadsö I., *Thermochim. Acta* **294** (1997a) 1.
- Wadsö I., *Thermochim. Acta* **300** (1997b) 1.
- Warshel A., Russel S.T., *Rev. Biophys.* **17** (1984) 283.
- Weichert L., *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **16** (1983) 1003.
- Wiseman T., Williston S., Brandts J.F., Lin L.N., *Anal. Biochem.* **179** (1989) 131.
- Wu C.F., Chen W.Y., Lee J.F., *J. Colloid Interface Sci.* **183** (1996) 236.
- Wyman J., Gill S.J., *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules* Ed. University Science Books, Mill Valley, California (1990).
- Yamane T., Katayama S., Todoki M., *Thermochim. Acta* **183** (1991) 329.
- You H.X., Lowe C.R., *J. Colloid Interface Sci.* **182** (1996) 586.
- Young B.R., Pitt W.G., Cooper S.L., *J. Colloid Interface Sci.* **124** (1988) 28.
- Yu D., Ziming Q., Xiaoping W., *Thermochim. Acta* **123** (1988) 213.
- Yun W.X., Kang H.Y., Ning W.C., *Thermochim. Acta* **123** (1988) 177.

---

Zahra C., Lagarde L., Romanetti R., *Thermochim. Acta* **6** (1973) 145.

Zhong G., Ma S., Zhao H., Shen J., Huang Y., *Thermochim. Acta* **123** (1988) 93.

Zielenkiewicz W., *Thermochim. Acta* **204** (1992) 1.

Zoungrana T., Findenegg G.H., Norde W., *J. Colloid Interface Sci.* **190** (1997) 437.