



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

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

Antonio Calvo López

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorat en Química

Dirigida por Julián Alonso Chamarro

**Departament de Química
Facultat de Ciències**

2017

Capítulo 4

Microsistemas para la monitorización de indicadores de calidad en procesos de reciclado de agua en misiones espaciales tripuladas

Con los constantes avances en materia de aeronáutica espacial, la intención de las diferentes agencias espaciales a medio y largo plazo es la de llevar a cabo viajes espaciales tripulados de larga duración.¹⁻³ Para ello, se requiere de sistemas de soporte vital (SSV) que satisfagan todas las necesidades básicas para la vida en un entorno hostil, como es el extraterrestre. Estos sistemas deben proporcionar un ambiente habitable con una atmósfera y temperaturas controladas, protección contra agentes externos (radiación o meteoritos) y todos los consumibles necesarios para la supervivencia de la tripulación (oxígeno, agua potable, comida y agua de higiene), además de reciclar o eliminar los desechos generados (CO₂, restos del agua de higiene, orina y heces).⁴ Hasta la fecha, en las misiones espaciales de corto alcance, como viajes a la estación espacial internacional (ISS), los SSV están basados en un concepto de ciclo abierto de aprovisionamiento directo. Mediante lanzaderas, se hacen llegar los consumibles producidos en la Tierra como oxígeno, parte del agua (hay una proporción que se recicla a bordo) y comida, almacenándose en órbita. Sin embargo, este formato es inviable en misiones espaciales tripuladas de larga duración, como las que pasan por establecer asentamientos en la Luna o en Marte (Figura 4.1), donde, debido a restricciones económicas, de energía y de espacio, es imposible proveer de todos los suministros

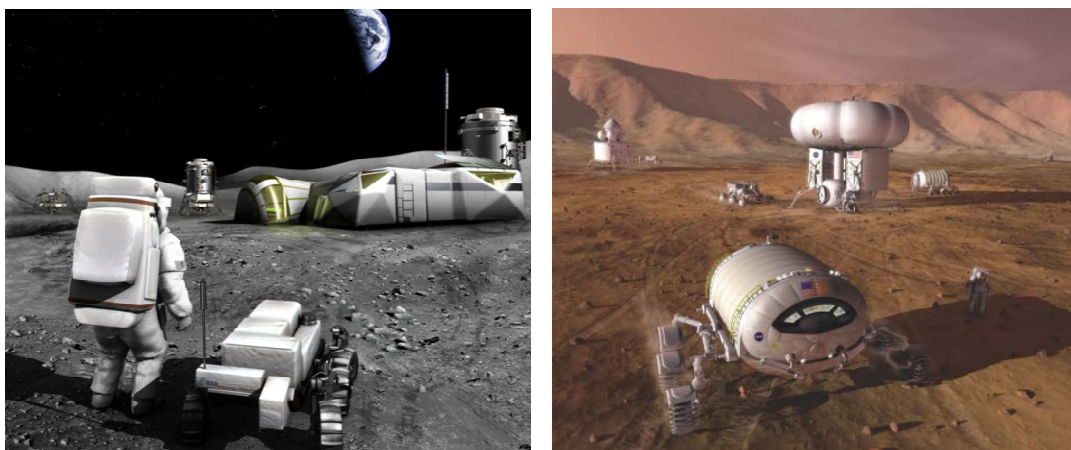


Figura 4.1. Recreación de un asentamiento lunar (izquierda) y en Marte (derecha). (Imágenes cedidas por la ESA y la NASA, respectivamente)

acumulan ciertos contaminantes químicos con los ciclos de potabilización, se requieren una serie de analizadores que permitan monitorizar on-line diferentes parámetros indicadores de calidad y que, a su vez, cumplan las especificaciones adicionales requeridas para su uso en misiones espaciales. Estas son reunir unas características analíticas predeterminadas, una alta miniaturización, bajo peso, bajo consumo de muestra y reactivos, un nivel de automatización y autonomía elevado (para evitar la intervención de la tripulación) y un adecuado funcionamiento en condiciones de microgravedad.

Tabla 4.1. Límites permitidos de algunos parámetros en el agua reciclada según la normativa de la ESA⁵.

| Parámetro | Unidades | Agua potable | Agua Higiénica |
|-------------------------------|---------------------|--------------|----------------|
| pH | - | 6.5 - 8.5 | 5 - 8.5 |
| Conductividad | mS/cm ⁻¹ | 0.75 | 3 |
| Turbidez | NTU | 2.5 | 10 |
| COT | mg L ⁻¹ | 0.5 | 10 |
| F ⁻ | mg L ⁻¹ | 1 | 10 |
| Cl ⁻ | mg L ⁻¹ | 200 | 1000 |
| NO ₃ ⁻ | mg L ⁻¹ | 25 | 50 |
| PO ₄ ²⁻ | mg L ⁻¹ | 5 | 50 |
| SO ₄ ²⁻ | mg L ⁻¹ | 250 | TBD |
| Na ⁺ | mg L ⁻¹ | 150 | 750 |
| K ⁺ | mg L ⁻¹ | 12 | 120 |
| NH ₄ ⁺ | mg L ⁻¹ | 0.5 | 0.5 |

En este capítulo se presentará el trabajo realizado en el marco de dos proyectos financiados por la ESA (*“Preliminary definition of on-line chemical water quality analysis equipment”* y *“On-line ammonium analysis for water recycling systems”*), donde se propone el diseño conceptual, la fabricación y la validación experimental de diferentes microanalizadores. El objetivo principal es el de verificar la posibilidad de obtener, en un futuro próximo, un único analizador capaz de medir todos los parámetros necesarios en el agua reciclada, en misiones espaciales tripuladas de larga duración, cumpliendo con los requisitos establecidos.

4.1. Microsistema potenciométrico biparamétrico para la monitorización de iones potasio y nitrato

Dos de los parámetros considerados por la ESA como indicadores clave del correcto funcionamiento del sistema de reciclado de agua son los iones nitrato y potasio. El nitrato es producto del proceso de nitrificación que convierte el ión amonio, procedente de la orina, en ión nitrato mediante procesos oxidativos realizados por bacterias.¹⁰ Posteriormente es eliminado a través de diversas etapas de separación como ultrafiltración y osmosis inversa. Por su parte, el ión potasio es un buen

indicador del correcto funcionamiento del proceso de remineralización y purificación del agua para obtener agua de consumo.

Existen numerosos trabajos reportados en la literatura referentes a la determinación por separado de iones nitrato y potasio usando ESIs y la técnica FIA en diferentes matrices como alimentos,^{11,12} agua potable,¹³ agua residual,¹⁴ fertilizantes^{14,15} y fármacos.^{14,16} Existen, también, trabajos que describen la detección simultánea de ambos iones, uno en muestras de dentífrico¹⁷ y otro en muestras de extractos de nutrientes en suelos,¹⁸ usando técnicas potenciométricas y FIA. Sin embargo, estos equipos no cumplen con los requisitos prefijados para ser aplicados en misiones espaciales, como ser de tamaño reducido, de bajo peso, tener alta robustez y confiabilidad de la instrumentación, y tener la posibilidad de monitorizar on-line y de forma autónoma, sin participación de la tripulación.

El Grupo de Sensores y Biosensores (GSB) de la Universidad Autónoma de Barcelona tiene una vasta experiencia en el desarrollo de analizadores potenciométricos miniaturizados aplicados a la monitorización de diversos parámetros de calidad en distintos tipos de aguas usando la tecnología LTCC.^{19,20} Partiendo de esta experiencia, el objetivo del trabajo que se presenta en esta sección es el desarrollo de un prototipo de microanalizador potenciométrico robusto, basado en la tecnología LTCC, para monitorizar simultáneamente la presencia de iones potasio y nitrato usando la técnica FIA. El dispositivo miniaturizado integrará monolíticamente la microfluídica y el sistema de detección, siendo de tamaño inferior a una tarjeta de crédito. El sistema de detección estará basado en dos ESIs de membrana polimérica, uno para medir potasio y otro para nitrato, y un electrodo de referencia de Ag/AgCl serigrafiado. El funcionamiento del prototipo desarrollado será validado mediante el análisis de muestras reales procedentes de la planta de tratamiento de agua Concordia ubicada en la Antártida.

4.1.1. Materiales y reactivos

Para la fabricación del microanalizador se han usado como sustrato estructural capas cerámicas de 254 μm de grosor en estado verde (DupontTM Green TapeTM 951) de la casa comercial Dupont (Alemania).

Se han evaluado tres materiales diferentes como transductores y pistas conductoras en la fabricación del sistema de detección. Estos consistían en dos pastas serigrafiables de plata, compatibles con el proceso de sinterización de las cerámicas usadas, una especial para soldadura (tipo I) (Dupont 6146) y otra especial para pistas internas (tipo II) (Dupont 6145) y una resina polimérica de epoxi-grafito. Esta última estaba constituida por una mezcla de grafito en polvo de 50 μm de tamaño de partícula (Merck, Alemania), epoxi Araldite-M y endurecedor HR (ambos de Ciba Geigy, España).

Para la preparación de las membranas sensoras de ión nitrato se utilizó nitrato de tetraoctilamonio (T12) o nitrato de tridocoecilmetilamonio (T8) como elemento de reconocimiento, fosfato de tris(2-etilhexilo) (TEHP) como plastificante, cloruro de polivinilo (PVC) como matriz polimérica y tetrahidrofurano (THF) como disolvente volátil. Para la preparación de la membrana sensora de potasio se utilizó valinomicina como elemento de reconocimiento, sebacato de bis(2-etilhexilo) (DOS) como plastificante, tetrakis(4-colorofenil) borato de potasio (KtpClPB) como aditivo, cloruro de polivinilo (PVC) como matriz polimérica y tetrahidrofurano (THF) como disolvente volátil. Todos los componentes para preparar las membranas sensoras fueron adquiridos en Fluka (Barcelona, España).

Todos los reactivos usados para la optimización y la caracterización del microsistema fueron de calidad analítica o superior. El Tris-(hidroximetil) aminometano (Tris) y el sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) fueron adquiridos en J.T. Baker (Holanda). El sulfato de sodio (Na_2SO_4) y el nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) fueron comprados a Panreac (Barcelona, España). El nitrato de potasio (KNO_3) fue proporcionado por Merk (Alemania). El cloruro de sodio (NaCl), el cloruro de potasio (KCl), el ácido sulfúrico al 98 % (H_2SO_4) y la sal sódica de fluoresceína fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). El acetato de sodio (NaAc), el acetato de magnesio (MgAc_2) y el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) fueron adquiridos en Fluka (Barcelona, España).

La resina conductora epoxi usada como soporte conductor de los electrodos fue preparada mezclando Araldite-M y endurecedor HR en una proporción 1:0.4. Posteriormente, esta se mezcló con grafito en polvo en una relación 1:1.

La membrana polimérica selectiva de nitrato fue preparada siguiendo una composición previamente optimizada^{13,21,22} mediante pesada y mezcla de un 6 % del elemento de reconocimiento (T8 o T12), 65 % de plastificante TEHP, 29 % de PVC y 3 mL de THF. Del mismo modo, la membrana selectiva de potasio, optimizada previamente,^{15,21} fue preparada pesando y mezclando un 1 % de valinomicina, 65.5 % de plastificante DOS, 0.5 % del aditivo KtpClPB, 33 % de PVC y 3 mL de THF.

Todas las disoluciones acuosas fueron preparadas usando agua doblemente destilada o Milli-Q. Las disoluciones estándar de KNO_3 se prepararon por sucesivas diluciones de una disolución madre de 0.1 M obtenida por pesada y disolución de la sal. Como disolución auxiliar para mantener el potencial del electrodo de referencia constante se usó KCl 0.1 M. Como disoluciones acondicionadoras para mantener la fuerza iónica estable se probaron disoluciones 0.1 M de Na_2SO_4 , NaAc , NaCl y Tris, y 0.05 M de Na_2SO_4 ajustada a pH 3 con H_2SO_4 . Para el estudio de interferentes se prepararon disoluciones estándar de KNO_3 de concentración creciente, fijando la del compuesto interferente en 0.01 M para $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgAc_2 , NaCl y NaHCO_3 , y en 0.001 M para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.1.2. Montaje experimental

El montaje del sistema de flujo continuo utilizado se puede observar en la figura 4.3. Este consistió en una bomba peristáltica externa de 4 canales Gilson Minipuls® 3 (Wisconsin, EEUU) equipada con tubos de Tygon® (Ismatec, Wertheim, Alemania) de 1.14 mm de diámetro interno y una válvula de inyección de 6 vías (Hamilton MVP, Reno, US). Mediante tubos de Teflón de 0.8 mm de diámetro interno (Scharlab, S.L., Cambridge, Inglaterra) se conectó el microsistema a los diferentes elementos externos. La adquisición de la señal y su procesamiento se llevaron a cabo mediante un potenciómetro TMI (Barcelona, España) que incorporaba un software específico para el procesamiento de la información. Gracias a la interfaz gráfica de este, se pudo ver en tiempo real el registro de las señales medidas por la pantalla de un PC. La diferencia de potencial se midió entre los electrodos indicadores y el electrodo de referencia de Ag/AgCl integrados en la misma plataforma microfluidica del dispositivo.

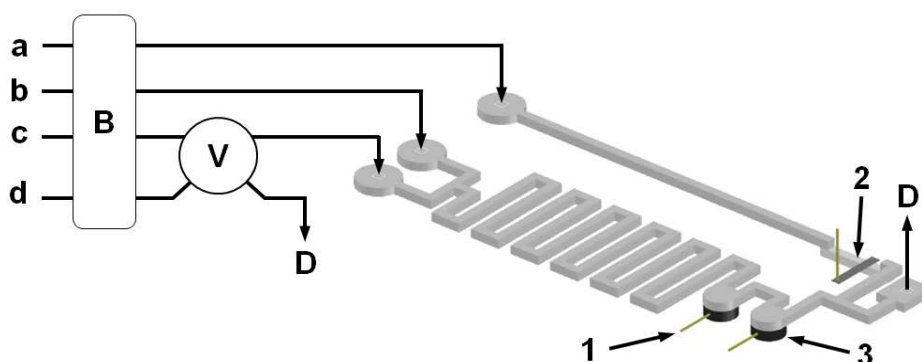


Figura 4.3. Diagrama esquemático de la microfluídica, el sistema de detección y el montaje experimental. (a) disolución auxiliar de KCl 0.1 M; (b) disolución acondicionadora de Na_2SO_4 0.05 a pH 3; (c) H_2O como disolución portadora; (d) muestra; (B) bomba peristáltica; (V) válvula de inyección de seis vías; (D) desecho; (1) conectores eléctricos; (2) electrodo de referencia; (3) electrodos indicadores.

4.1.3. Diseño y optimización del microsistema analítico

El microanalizador fue fabricado mediante la tecnología LTCC, cuyas potencialidades y proceso de fabricación han sido explicados previamente (§1.2.2. y §3.1.). El diseño tipo CAD del dispositivo (Figura 4.4.A) permitió fabricar dos microsistemas idénticos a la vez. Estos estaban formados por trece capas de cerámica (1 x a, 1 x b, 2 x c, 1 x d, 2 x e and 6 x f) las cuales, una vez superpuestas, proporcionaron la estructura tridimensional requerida para esta aplicación. Las dimensiones exteriores de cada microanalizador fueron de 24.1 x 54.2 x 2.7 mm después de sinterizar y su peso fue de 6 g. El prototipo final incluía tres entradas de líquidos (Figura 4.3). Dos de ellas convergen en un punto de confluencia en forma de T. Por la primera de ellas entra la disolución portadora (H_2O), donde es

inyectada la muestra, y por la otra se introduce una disolución tampón de concentración elevada (disolución acondicionadora), con el fin de mantener el pH y la fuerza iónica constante de la mezcla resultante. Posteriormente, después de pasar por la zona del micromezclador, la disolución homogénea obtenida es llevada hacia las cámaras de detección y finalmente hacia la salida de desecho. A través de la tercera entrada de líquidos, se impulsa continuamente, a $200 \mu\text{L min}^{-1}$, una disolución auxiliar de KCl 0.1 M para mantener constante el potencial del electrodo de referencia.¹⁹ Las dimensiones de los canales fueron de 0.9 mm de ancho y 0.4 mm de alto, el diámetro de cada una de las cámaras de detección fue de 3 mm y el volumen muerto total del microsistema fue de $150 \mu\text{L}$ una vez realizado el proceso de sinterizado.

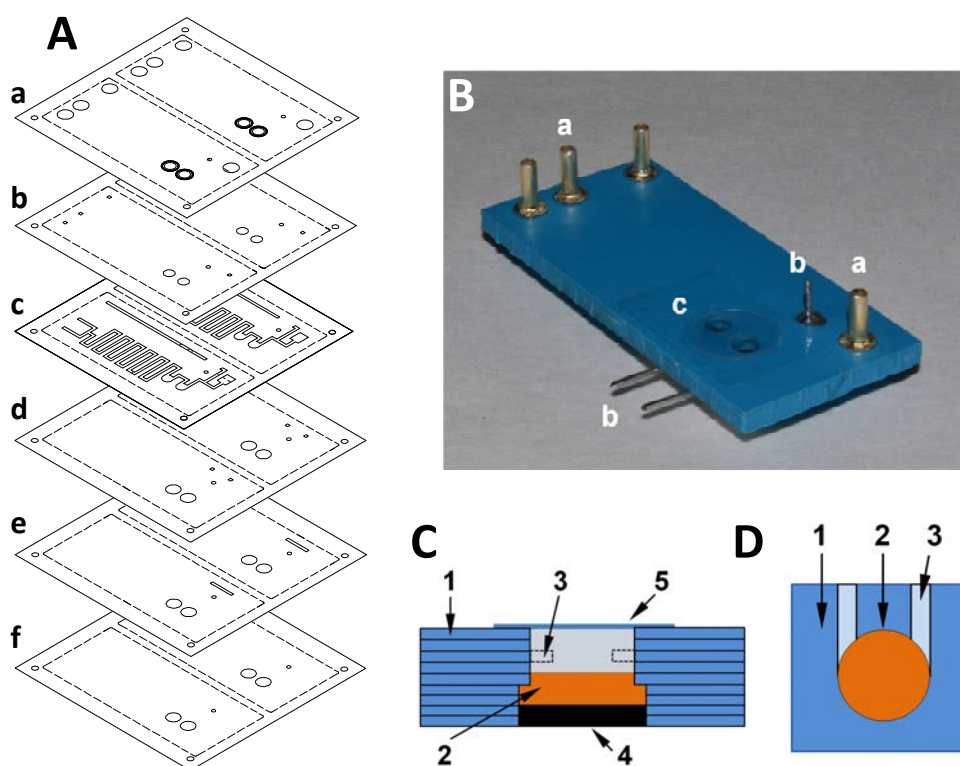


Figura 4.4. **A)** Diseño del prototipo de microsistema biparamétrico. **B)** Fotografía del dispositivo final construido: (a) conectores fluidicos; (b) conectores eléctricos; (c) cámara de detección, sellada con un vidrio cubreobjetos adherido mediante un film adhesivo, con las membranas poliméricas depositadas en su interior; **C)** Diagrama esquemático de la sección frontal de la cámara de detección: (1) capas cerámicas; (2) membrana polimérica; (3) posición del canal microfluídico; (4) resina de epoxi-grafito actuando como transductor o soporte conductor; (5) vidrio cubreobjetos adherido con un film adhesivo para cerrar la cámara. **D)** Diagrama esquemático de la vista superior de la cámara de detección: (1) capa cerámica; (2) resina de epoxi-grafito con la membrana polimérica depositada encima de esta; (3) canal microfluídico.

Los elementos no compatibles con el proceso de fabricación fueron añadidos con posterioridad a la sinterización. Así, los conectores fluidicos fueron pegados sobre los puertos de entrada y salida con pegamento epoxi y los conectores eléctricos

fueron soldados en sus correspondientes vías (Figura 4.4.B). La resina de epoxi-grafito fue colocada en la correspondiente cavidad (Figura 4.4.C) y fue curada a 40 °C durante 24 h. Las membranas poliméricas selectivas a nitrato y potasio fueron depositadas gota a gota en el interior de la correspondiente cavidad (Figura 4.4.C y D), que estaba definida sobre el soporte conductor de epoxi-grafito, siguiendo un procedimiento optimizado que se mostrará más adelante (§4.1.3.3.)

4.1.3.1. Configuración de las cámaras de detección

Con la finalidad de optimizar diferentes características analíticas del sistema como la sensibilidad, el límite de detección (LD) y el tiempo de análisis, se testaron dos configuraciones de cámara de detección: una con un perfil lineal de entrada de líquido, habitualmente utilizada en los dispositivos fabricados por el grupo de investigación (Figura 4.5.A),^{19,20,23} y otra con un perfil circular de entrada de líquido (Figura 4.5.E). Para verificar cuál era el perfil hidrodinámico en cada caso, se llevó a cabo un estudio usando fluoresceína como trazador. La fluoresceína es un fluoróforo con un máximo de excitación, disuelta en agua, a 489 nm y un máximo de emisión a 515 nm²⁴ por lo que, mediante la excitación con luz ultravioleta-visible y la monitorización con una cámara, se puede observar el patrón hidrodinámico seguido por el colorante en el interior de las cámaras de detección. Para ello se inyectaron 25 µL de disolución diluida de fluoresceína en un canal de agua a modo de disolución portadora, a un caudal de 800 µL min⁻¹. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 4.5.

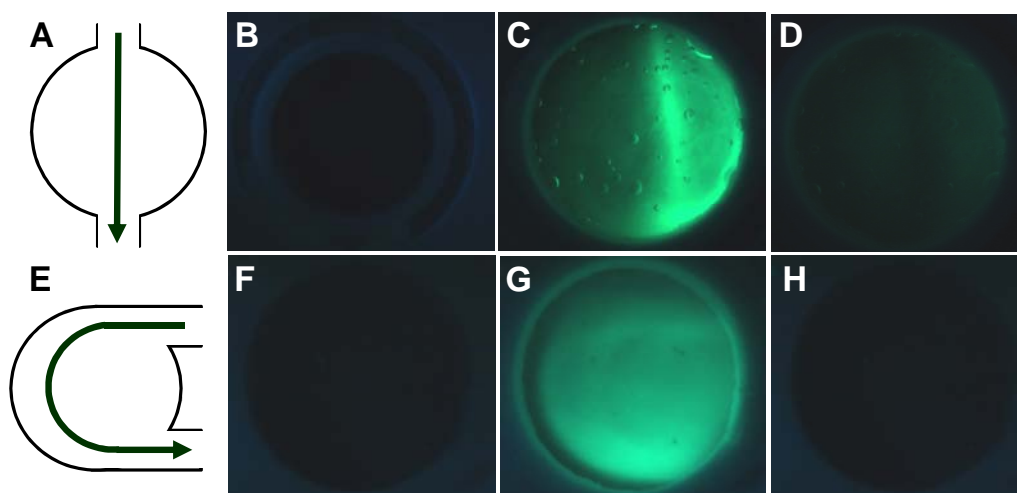


Figura 4.5. Secuencia de imágenes de la experiencia realizada para comparar la dinámica del fluido en el interior de las cámaras, usando como trazador fluoresceína. La fila superior muestra la configuración de cámara de detección con perfil lineal de entrada de líquido (A) e imágenes a diferentes tiempos desde la inyección de la muestra: 0 s (B), 5 s (C) y 20 s (D). La fila inferior muestra la configuración con perfil circular (E) e imágenes a diferentes tiempos desde la inyección: 0 s (F), 5 s (G) y 20 s (H). Las flechas verdes indican la dirección del flujo en el interior de la cámara.

Tal y como se puede observar en la secuencia de imágenes, en el tipo de cámara con perfil circular de entrada de líquido (Figura 4.5.G) la muestra cubría una superficie mayor y más homogénea del ESI que con el perfil lineal (Figura 4.5.C). Este hecho podría mejorar tanto las alturas de pico como la repetitividad de las medidas. Otra ventaja del perfil circular fue que la cámara de detección se limpiaba más rápidamente (Figura 4.5.H) que en la de perfil lineal (Figura 4.5.D), permitiendo el retorno a línea base de la señal con mayor rapidez. Este hecho comporta claramente una reducción del tiempo de análisis y por tanto un menor consumo de reactivos. Este mismo estudio permitió también observar que en el caso de la cámara de detección con perfil de flujo circular, la eliminación de las burbujas que se pudieran introducir en su interior era mucho más fácil que en el caso de la cámara con perfil lineal. Esto permitiría obtener una línea base con menos ruido, dotando de mayor robustez al nuevo sistema. En base a estos resultados, se escogió la configuración de cámara de detección con perfil circular de entrada de líquidos, prosiguiendo, a continuación, con la optimización del microsistema.

4.1.3.2. Integración de los electrodos indicadores y de referencia

Una de las partes fundamentales de un microanalizador potenciométrico es el soporte conductor o transductor sobre el que se depositará la membrana polimérica selectiva del analito a determinar. Su correcta elección es de enorme importancia para obtener unas características analíticas adecuadas de los ESIs. Con esta premisa en mente, se evaluaron distintos materiales conductores. Para la fabricación del electrodo de referencia se usó una pasta de plata cosinterizable (tipo I - DuPont 6146), como ya se había usado previamente en otros trabajos reportados por el GSB.²³ En el caso de los ESIs se evaluaron dos pastas cerámicas cosinterizables de plata (tipo I y II - DuPont 6146 y 6145) y una resina de epoxi-grafito, ampliamente usada por el GSB como soporte conductor en dispositivos potenciométricos no miniaturizados.^{13,25,26} Puesto que la resina no es compatible con el proceso de sinterización, se tuvieron que realizar diferentes diseños del dispositivo para poder integrar cada uno de los tipos de material conductor. Así, para dispositivos con pasta de plata compatible con el proceso de fabricación se usó el diseño que se muestra en la figura 4.6.A, mientras que para integrar la resina de epoxi-grafito, con posterioridad al proceso de sinterizado, se utilizaron los diseños B y C de la misma figura. A modo de inciso, cabe destacar que en vista de los resultados obtenidos en pruebas previas al diseño del dispositivo, se evitó solapar las pistas conductoras con los canales de microfluídica en el diseño A. El objetivo fue impedir que en el proceso de laminación y sinterizado, las pistas sufrieran estrés o ligeras deformaciones. Estas microfracturas en las pistas conductoras se traducen en un incremento de la resistencia eléctrica (del orden de 1-2 Ω en lugar

de los previsibles $0,1-0,5 \Omega$),²⁷ lo que podría repercutir negativamente en la respuesta analítica del sistema.

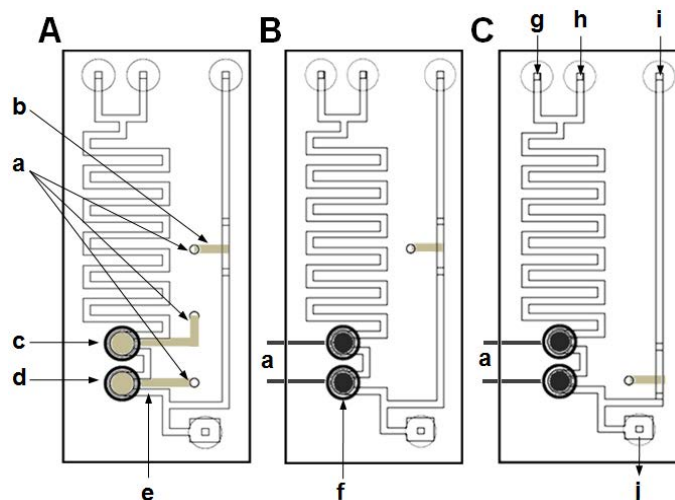


Figura 4.6. Distintos diseños de dispositivo evaluados. **A)** Diseño para transductor fabricado con pastas de plata cosinterizables. **B y C)** Diseño para transductor construido con resina de epoxi-grafito. (a) conectores eléctricos; (b) electrodo de referencia de Ag/AgCl; (c) soporte conductor del electrodo de potasio; (d) soporte conductor del electrodo de nitrato; (e) pasta conductora de plata (tipo I o II) cosinterizable; (f) resina de epoxi-grafito; (g) muestra o disolución estándar; (h) disolución acondicionadora; (i) Disolución auxiliar de KCl; (j) desecho.

Para caracterizar la respuesta analítica de los dispositivos fabricados, con los correspondientes materiales conductores, se realizaron distintos calibrados por triplicado, inyectando $150 \mu\text{L}$ de disoluciones estándar de KNO_3 de concentración creciente. Como ionóforos para determinar potasio y nitrato, se emplearon valinomicina y T12, respectivamente. Como disolución acondicionadora se utilizó arbitrariamente Tris, ya que al ser una molécula neutra en su forma básica, en un principio, no sería interferente de ninguno de los dos ESI. Como se puede ver en la figura 4.7, los electrodos que proporcionaban mejores características analíticas, llegando a un compromiso en términos de altura de pico, sensibilidad y límites de detección, fueron los construidos con la resina de epoxi-grafito, a pesar de que la pasta de plata de tipo II proporcionaba mejores resultados en cuanto a altura de pico y límites de detección. Sin embargo, se observó que con el tiempo de uso, la repetitividad de las medidas con los transductores fabricados con cualquiera de las dos pastas de plata no era muy buena, viéndose también afectadas tanto la estabilidad de la línea base como el ruido de esta. Una de las posibles razones que justificarían esta falta de reproducibilidad, ya descritas en la bibliografía previamente,²⁷ sería la existencia de problemas de adherencia de la membrana a la superficie del soporte conductor. Este hecho ocasiona que con el paso continuado del líquido, la membrana se vaya despegando del transductor y pierda contacto eléctrico, produciéndose la disminución de la sensibilidad y el incremento de la variabilidad y el ruido en línea base hasta que se despegan definitivamente. A

pesar de haber diseñado la cámara de detección (Figura 4.4.C) con una morfología que dificulta este efecto (con la base más ancha que la parte superior de la membrana polimérica, estilo ancla), no se consiguió eliminarlo completamente. Este inconveniente no se presentaba con los electrodos fabricados con la resina de epoxi-grafito observándose una mejor adherencia de la membrana al soporte conductor. Este hecho podría estar relacionado con el ataque de la superficie del soporte polimérico conductor, durante el proceso de deposición, por parte del disolvente volátil (THF) utilizado en la preparación de la membrana polimérica selectiva. Esto provocaría una mejor adherencia de la membrana sobre el soporte.

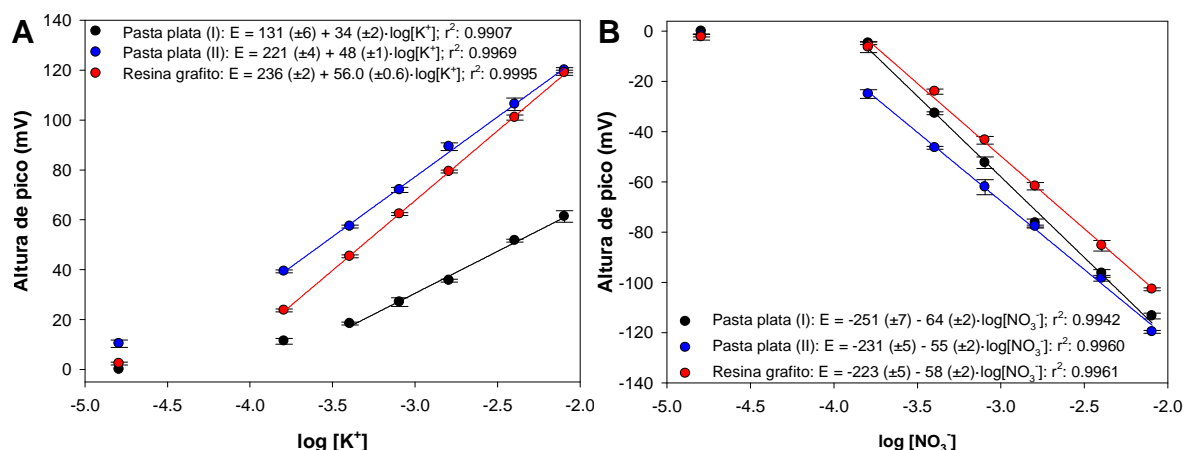


Figura 4.7. Curvas de calibrado por triplicado ($n = 5$ o 6 , 95 % confianza) del sensor de potasio (A) y nitrato (B) usando diferentes materiales conductores como transductor de los ESIs.

Así pues, y a pesar de presentar el transductor de pasta de plata tipo II mejores LD, se decidió escoger el transductor de epoxi-grafito para continuar con la optimización del microsistema, por su ya mencionada estabilidad de medida y por la durabilidad de la membrana. En este caso se primó, más que la simplificación del proceso de fabricación, la obtención de un dispositivo lo más robusto, estable y autónomo posible para su uso en futuras misiones espaciales.

Por último, se estudió también la influencia de la distancia entre los electrodos indicadores y el de referencia (Figura 4.6.C y D). Los resultados obtenidos no revelaron resultados significativamente diferentes en función de la distancia entre electrodos por lo que se tomó la opción mostrada en la figura 4.6.C, con una distancia corta entre electrodos.

4.1.3.3. Optimización del proceso de deposición de membrana

Un momento crítico en la fabricación de un microsistema potenciométrico basado en ESIs de membrana polimérica es el de la deposición de la propia membrana (también denominada cóctel sensor) sobre el soporte conductor. Tradicionalmente, en el GSB, se solía depositar dicho cóctel sin un control estricto ni del volumen

depositado ni del tiempo de evaporación del THF. Esto, que durante la fabricación de sensores convencionales no altera las características de respuesta obtenidas, provocaba unas características de respuesta poco reproducibles entre los diferentes microsistemas fabricados. Esto hecho, probablemente sea debido a que mientras se está depositando la membrana pueden quedar burbujas de aire en el seno de esta, generando problemas de contacto y adherencia entre membrana y transductor. Con el fin de mejorar la reproducibilidad de los dispositivos se desarrolló una nueva metodología de deposición de las membranas. Hay que comentar que el protocolo de deposición establecido únicamente es útil para el tamaño de cámara de detección evaluado, siendo necesario reajustarlo cuando dicho tamaño cambie. No adecuar el protocolo de deposición al cambiar el tamaño, podría provocar el taponamiento de los canales o una deposición insuficiente de membrana (Figura 4.4.C). Para realizar este estudio, se procedió a depositar membrana mediante micropipeta, lo que permitió controlar el volumen de cada deposición. También, para controlar la eliminación del disolvente volátil de la membrana (THF), se procedió a confinar el microsistema en una cámara de baja presión entre deposiciones. Esto permitió eliminar la máxima cantidad de disolvente antes de realizar la siguiente disposición y se evitó la aparición de burbujas atrapadas en el seno de la matriz de la membrana durante el proceso. La aplicación de vacío se llevó a cabo mediante una bomba de paletas (Telstar, Barcelona, España) que aplicaba un vacío de $5 \cdot 10^{-2}$ mm Hg. Con el fin de optimizar el proceso de deposición en cuanto a tiempo (duración del proceso) y calidad (aspecto de la membrana), se evaluaron diferentes periodos de vacío entre deposiciones y diferentes viscosidades (concentraciones) de cóctel sensor, definidas por el volumen de THF añadido. El volumen de THF optimizado previamente para las cantidades de cóctel sensor preparadas fue de 3 mL.²⁸ En el presente estudio se usaron cócteles con 2, 2.5, 3 y 3.5 mL de THF, y tiempos de vacío entre deposiciones de 5 y 10 minutos. En cuanto al volumen de cada deposición, inicialmente fue de 2 μ L y a medida que la cámara se iba llenando, este fue disminuyendo a 1.5 y 1 μ L. Los resultados se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4. 2. Resultados del estudio de deposición de membrana.

| $T_{\text{vacío}}=5$ min | | Volumen de THF en el cóctel sensor (mL) | | | |
|---------------------------|-------------|---|-----|----|-----|
| | | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 |
| Número de deposiciones | 2 μ l | 4 | 7 | 19 | 26 |
| | 1,5 μ l | 6 | 4 | 2 | 4 |
| | 1 μ l | 13 | 15 | 6 | 2 |
| $T_{\text{vacío}}=10$ min | | Volumen de THF en el cóctel sensor (mL) | | | |
| | | 2 | 2.5 | 3 | 3.5 |
| Número de deposiciones | 2 μ l | 7 | 11 | 27 | 27 |
| | 1.5 μ l | 18 | 14 | 2 | 5 |
| | 1 μ l | 2 | 2 | 3 | 3 |

Como es lógico, a mayor viscosidad (concentración) del cóctel sensor (menor volumen de THF manteniéndose siempre las mismas cantidades del resto de componentes), se requería un menor número de deposiciones para obtener un mismo grosor de membrana.

Para poder interpretar debidamente los resultados, se realizó seguimiento fotográfico del aspecto final de cada membrana (Figura 4.8). Como se puede observar, en las membranas depositadas a partir de cócteles sensores con poco volumen de THF (por debajo de la cantidad optimizada) aparecieron burbujas (A, B, E, y F). Esto pudo ser debido a que la alta viscosidad del cóctel impedía que el disolvente volátil pudiera escapar antes de la formación de la membrana, generándose así las burbujas. Por encima de 3 mL de THF, las membranas obtenidas no presentaban burbujas y su aspecto era uniforme y homogéneo (C, D, G y H).

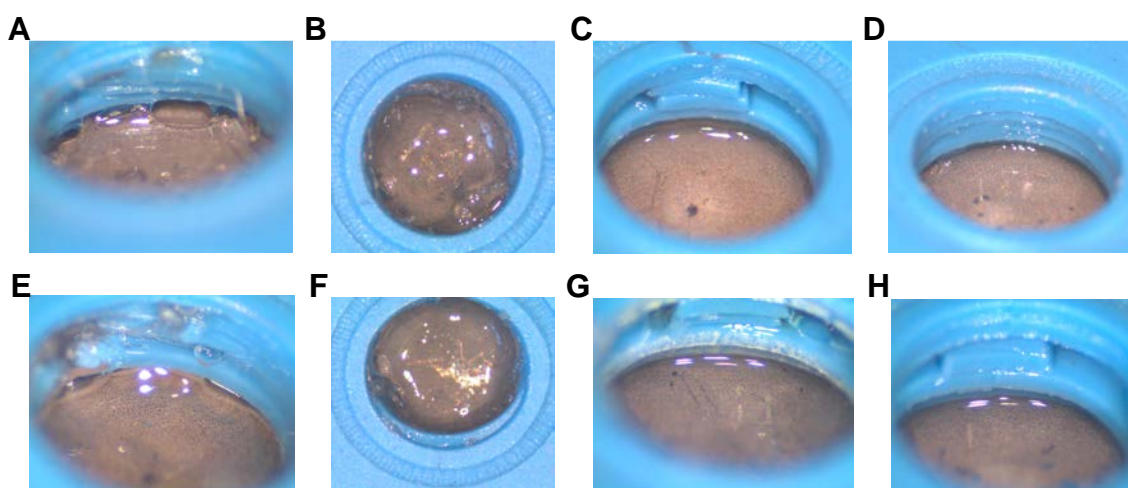


Figura 4.8. Aspecto final de las membranas después del proceso de deposición. De (A) a (D) con 5 minutos de vacío entre deposiciones y de (E) a (H) con 10 minutos de vacío entre deposiciones. (A) y (E): membrana depositada a partir del cóctel de 2 mL. (B) y (F): del de 2.5 mL. (C) y (G): del de 3 mL. (D) y (H): del de 3.5 mL.

En vista de los resultados obtenidos, se decidió escoger como protocolo de deposición de membrana aquél que permitía obtener, en un menor tiempo, una membrana exenta de burbujas. El cóctel sensor finalmente seleccionado contenía 3 mL de THF, aplicándose 5 minutos de vacío entre deposiciones.

4.1.3.4. Evaluación de las variables químicas e hidrodinámicas

Con el microsistema estructuralmente optimizado se eligió una disolución acondicionadora que permitiera obtener las mejores características analíticas del microanализador. En la bibliografía, como se ha comentado previamente (§4.1), abundan estudios y trabajos en los que se desarrollan analizadores selectivos para

potasio y nitrato por separado, incluso hay alguno con medida simultánea de ambos. En ellos hacen uso de diferentes disoluciones de sales como de sulfato sódico¹⁷, acetato sódico,²⁹ cloruro sódico³⁰ o Tris,^{16,27} a modo de disolución acondicionadora. Con el fin de encontrar la disolución acondicionadora adecuada para el microsistema desarrollado, se procedió a realizar diferentes calibrados usando cada una de estas disoluciones, con una concentración de 0,1 M de cada compuesto. Para obtener los calibrados, se utilizaron disoluciones estándar mixtas de KNO_3 que comprendían un rango de 1 a 500 mg L^{-1} NO_3^- y de 0.63 a 315 mg L^{-1} K^+ . Por su parte, los elementos de reconocimiento de las membranas usados en este estudio fueron la valinomicina y T12 o T8 para la membrana de potasio y nitrato, respectivamente. Como se puede extraer de los resultados (Figura 4.9), la disolución acondicionadora de Tris y de sulfato sódico eran las que mejores características analíticas proporcionan en el global de los dos ESIs, sobretodo en términos de sensibilidad, ya que eran las únicas disoluciones que permitían obtener comportamientos Nernstianos en ambos ESIs. Además también se observó una mayor reproducibilidad en las medidas con estas disoluciones. A la hora de decantarse por una de estas dos disoluciones se tuvo en cuenta la aplicación final del microanalyzer y, considerando que el TRIS es una sustancia que tiende a degradarse, térmica y bacteriológicamente, con suma facilidad en disolución, se escogió como disolución acondicionadora el sulfato sódico. Esta disolución conserva sus propiedades intactas por más tiempo. Sin embargo, a pesar de obtener sensibilidades adecuadas en ambos ESIs, en el caso del sensor de nitrato, usando el elemento de reconocimiento T12, el LD era ligeramente alto. Recurriendo a la experiencia del GSB, se decidió testar un elemento de reconocimiento alternativo (T8), que había dado buenos resultados en algunas aplicaciones anteriores,³¹ consiguiendo mejorar de esta manera los resultados en término de altura de pico y, por consiguiente, en LD (Figura 4.9.B).

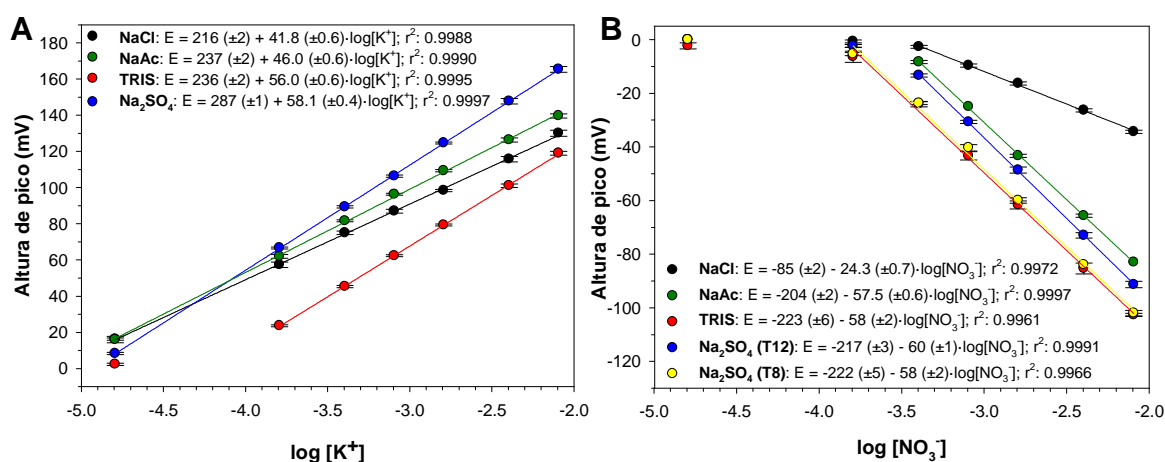


Figura 4.9: Curvas de calibrado por triplicado ($n = 5, 6$ o 7 ; 95 %) del sensor de potasio (A) y nitrato (B) usando varias disoluciones acondicionadoras.

Una vez seleccionado el sulfato de sodio como solución acondicionadora y el T8 como elemento de reconocimiento de la membrana selectiva de nitrato, se procedió a evaluar, mediante un proceso de optimización univariante, los parámetros hidrodinámicos (volumen de inyección y caudal) y los químicos (concentración de la disolución acondicionadora), con el fin de llegar a un compromiso entre la sensibilidad de las medidas analíticas, un adecuado rango de trabajo lineal de los ESIs, un bajo consumo de reactivos y una adecuada frecuencia de análisis.

En primer lugar, se optimizó el volumen de inyección. Para ello se realizaron inyecciones, por triplicado, de dos disoluciones estándar mixtas de KNO_3 con una diferencia entre ellas de una década de concentración (de 10 y 100 $\text{mg L}^{-1} \text{NO}_3^-$ y de 6.3 y 63 $\text{mg L}^{-1} \text{K}^+$). De esta manera, con solo dos medidas se podía tener una idea de si el comportamiento del electrodo era Nerstiano (sensibilidades próximas a la teórica de $59.2 \text{ mV dec.}^{-1}$) y de las alturas de pico, que están íntimamente relacionadas con el LD de cada ESI. Como caudal de cada una de los canales (H_2O /disolución estándar/muestra y disolución acondicionadora) se tomó arbitrariamente uno de $800 \mu\text{L min}^{-1}$, usando sulfato sódico 0,1 M como disolución acondicionadora. Se evaluaron volúmenes de inyección de entre 50 y 500 μL . En vista de los resultados (Figura 4.10), se decidió escoger un volumen de inyección de 225 μL , ya que mayores volúmenes de inyección no proporcionaban un aumento significativo de la altura de pico y, sin embargo, sí que aumentaban el tiempo de análisis y el consumo de muestra considerablemente. Por contra, un volumen de inyección menor, disminuía las alturas de pico aumentando el LD, a pesar de disminuir el tiempo de análisis y, en el caso del sensor de nitrato, reducía también la sensibilidad.

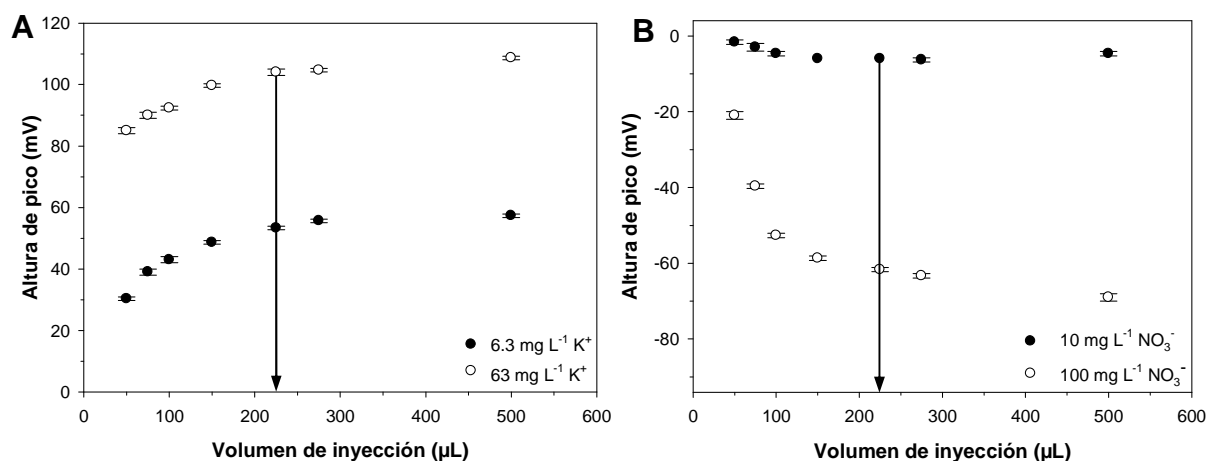


Figura 4.10: Resultados por triplicado de la optimización del volumen de inyección para el electrodo selectivo de potasio (A) y para el de nitrato (B).

Para optimizar el caudal, tanto del canal de la disolución portadora de H_2O como del de la disolución acondicionadora (el caudal de la disolución auxiliar de referencia de KCl , para de mantener el potencial del electrodo de referencia

constante, se mantuvo siempre a $200 \mu\text{L min}^{-1}$), se realizó la misma experiencia que en el caso anterior, fijando en esta ocasión el valor optimizado de volumen de inyección de $225 \mu\text{L}$. Se testaron valores de caudal entre 400 y $1200 \mu\text{L min}^{-1}$. El caudal escogido tanto para el canal donde se inyectaba la muestra como para el canal por donde circulaba la disolución acondicionadora fue de $800 \mu\text{L min}^{-1}$. Atendiendo a los resultados obtenidos (Figura 4.11), no existían diferencias sustanciales en cuanto a altura de pico y sensibilidades a diferentes caudales. El problema radicaba en que a caudales bajos el tiempo de análisis era muy alto y a caudales altos, las concentraciones bajas de los analitos eran difíciles de determinar, debido al poco tiempo de residencia en la cámara de detección y a la propia velocidad de respuesta de cada una de las membranas. Cabe recordar que la difusión del analito hacia la superficie de la membrana está controlada por el gradiente de concentración que, en este caso, era pequeño.

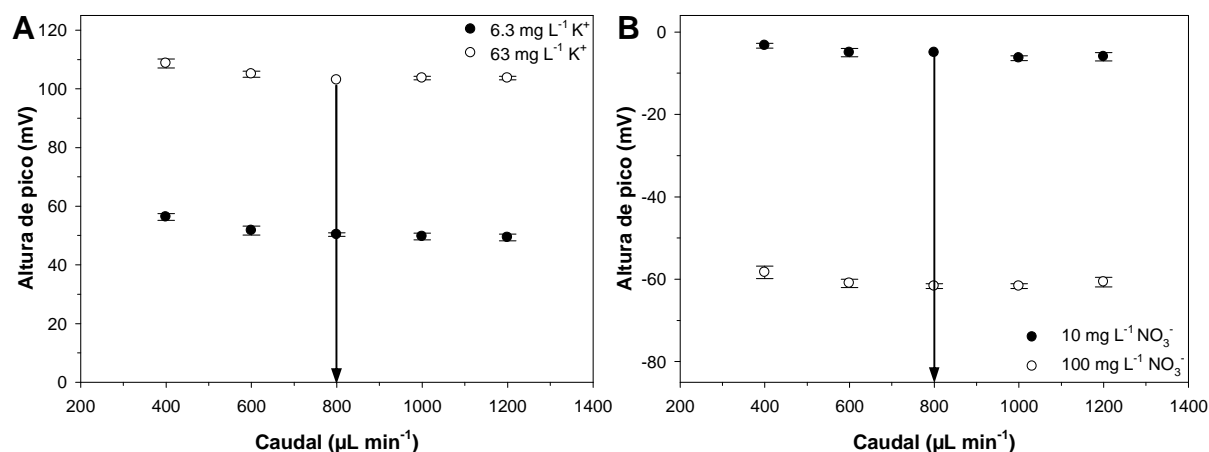


Figura 4.11: Resultados por triplicado de la optimización del caudal para el electrodo selectivo de potasio (A) y para el de nitrato (B).

Finalmente se optimizó la concentración de la disolución acondicionadora. Con el mismo procedimiento que en los casos anteriores, se testaron concentraciones de sulfato sódico entre 0.01 y 0.1 M fijando los valores optimizados de volumen de inyección y caudal de los canales de entrada de H_2O /muestra/disoluciones estándar y de disolución acondicionadora en $225 \mu\text{L}$ y $800 \mu\text{L min}^{-1}$ respectivamente. Los resultados mostraron (Figura 4.12) que a concentraciones bajas de disolución acondicionadora, las alturas de pico eran mayores que a concentraciones más altas. Sin embargo, a concentraciones bajas aparecía una variación grande de la fuerza iónica al inyectar la muestra, dando lugar a pre-picos en la señal muy pronunciados, además de presentar los ESIs comportamientos poco Nernstianos. Por su parte, concentraciones altas evitaban estos problemas de cambios en la fuerza iónica, pero, a su vez, hacían disminuir la altura de pico y por tanto aumentaban el LD, debido, posiblemente, a los efectos interferentes a concentraciones muy altas del Na^+ sobre el electrodo selectivo de potasio y del SO_4^{2-} .

sobre el electrodo selectivo de nitrato. Por este motivo se escogió una concentración de disolución acondicionadora de 0.05 M.

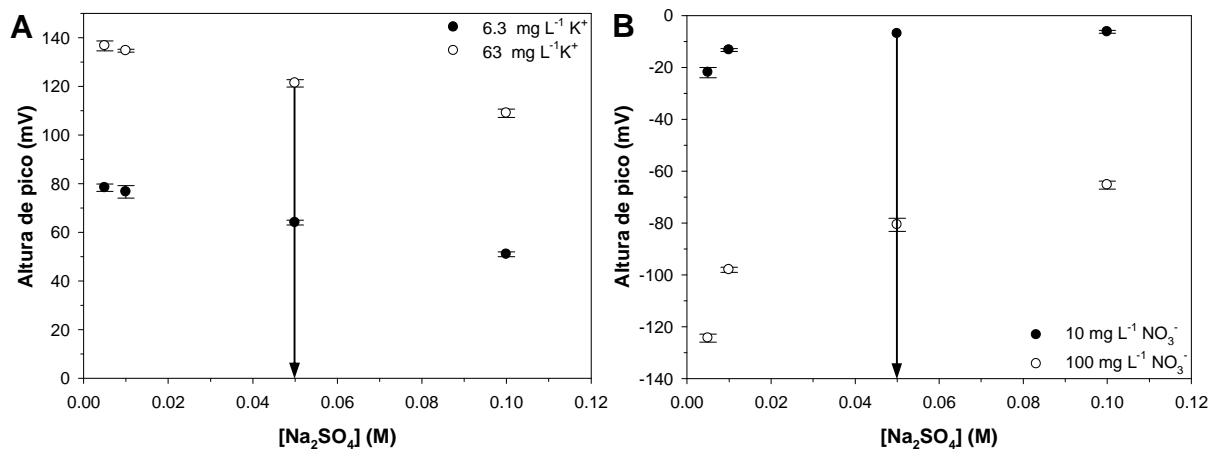


Figura 4.12: Resultados por triplicado de la optimización de la concentración de disolución acondicionadora para el electrodo selectivo de potasio (A) y para el de nitrato (B).

Una vez optimizado todo el sistema, se procedió a evaluar el efecto de los posibles iones interferentes, que pueden estar presentes en el tipo de agua a analizar, sobre la respuesta de los dos electrodos indicadores. Según la bibliografía, el electrodo de nitrato puede presentar una importante interferencia del bicarbonato y del cloruro,³² mientras que para el electrodo selectivo de potasio pueden serlo el amonio, el sodio, el calcio y el magnesio.^{33,34} Para verificar el grado de interferencia real, se calcularon los coeficientes de selectividad potenciométricos ($\log K_{i,j}^{pot}$) para los electrodos de potasio y de nitrato usando el método de la interferencia fija, recomendado por la IUPAC.³⁵ El procedimiento seguido consistió en fijar una concentración de fondo del compuesto interferente de 0.01 M excepto para el ión amonio, que fue fijada en 0.001 M.

Tabla 4.3. Coeficientes de selectividad potenciométricos calculados, $\log K_{i,j}^{pot}$, para los electrodos selectivos de K^+ y NO_3^- usando el método de interferencia fija.

| Interferente (j) para el electrodo selectivo de K^+ | $\log K_{i,j}^{pot}$ | Interferente (j) Para el electrodo selectivo de NO_3^- | $\log K_{i,j}^{pot}$ |
|---|----------------------|--|----------------------|
| Na^+ | -4.00 | HCO_3^- | -1.93 |
| NH_4^+ | -1.07 | Cl^- | -1.54 |
| Ca^{2+} | -5.02 | | |
| Mg^{2+} | -5.00 | | |

Los resultados mostraron que el amonio era el mayor interferente del electrodo de potasio, mientras que para el electrodo de nitrato lo eran tanto el cloruro como, en menor grado, el bicarbonato (Tabla 4.3).

Si miramos las especificaciones del agua reciclada tanto para uso higiénico como de consumo según la ESA (Tabla 4.1), vemos que la cantidad de amonio esperada es de 0.5 mg L^{-1} . En el experimento realizado se estudió la interferencia de una concentración 0.001 M de amonio, lo que equivalía a 18 mg L^{-1} . Teniendo en cuenta que el efecto interferente del amonio depende tanto del coeficiente de selectividad como de la concentración de interferente (ecuación 1.8), significaba que en muestras reales, la interferencia del amonio sería prácticamente despreciable.

Por su parte, el efecto interferente del bicarbonato puede ser eliminado fácilmente mediante la acidificación de la muestra al mezclarse con la disolución acondicionadora. Si se ajusta el pH de dicha disolución con ácido sulfúrico concentrado a pH 3, el equilibrio $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$ se desplaza hacia la formación de ácido carbónico, provocando la desaparición del bicarbonato presente en la muestra.³¹ A pesar de parecer un pH excesivamente agresivo, se ha demostrado que este pH no daña las membranas selectivas de iones a corto y medio plazo.^{27,31}

El ión cloruro, sin embargo, sí que podía ser un inconveniente importante para alcanzar la exactitud deseada en la determinación de nitrato. El hecho de que haya una presencia importante de este ión en el agua a analizar, y que no se pueda eliminar, ya que técnicas de precipitación podrían obturar el microsistema, hacían que este fuera un verdadero problema. De acuerdo con la constante de selectividad, si la relación $[\text{Cl}^-]/[\text{NO}_3^-]$ es inferior a 35, el efecto interferente sería negligible, permitiendo la determinación de nitrato con una aceptable exactitud. En caso de que la relación fuera mayor, una posible solución sería integrar en el mismo microsistema un electrodo selectivo de ión cloruro, que permitiera eliminar el efecto interferente, mediante una corrección matemática, usando la ecuación de Nikolski-Eisenmann.²³

4.1.4. Características analíticas del sistema

Las características analíticas del microsistema propuesto fueron determinadas mediante calibraciones sucesivas. A modo de ejemplo, la figura 4.13 muestra el registro obtenido para uno de los calibrados. Las curvas de calibrado obtenidas para cada electrodo fueron $E = -231.0 (\pm 1.4) - 60.6 (\pm 0.5) \log[\text{NO}_3^-]$ con $r^2 = 0.996$ y $E = 256 (\pm 2) + 56 (\pm 1) \log[\text{K}^+]$ con $r^2 = 0.992$. Los rangos lineales obtenidos fueron de $10\text{-}1000 \text{ mg L}^{-1}$ y de $1.9\text{-}155 \text{ mg L}^{-1}$ para el electrodo selectivo de nitrato y potasio, respectivamente (concentraciones mayores de nitrato no fueron testadas). Los límites de detección, calculados de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC, por medio de la intersección de las rectas extrapoladas de los segmentos lineales (rango de trabajo Nerstiano) y no lineales (zona de no respuesta del sensor) de las curvas de calibración,³⁶ fueron $9.56 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 6$, 95 % confianza) para el electrodo selectivo de nitrato y $0.98 \pm 0.07 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 6$, 95 % confianza) para el de

potasio. Como se puede constatar, el LIRL de cada ESI se encontraba muy por debajo del valor máximo permitido más restrictivo en aguas recicladas, que es de 25 y 12 mg L⁻¹ de nitrato y potasio, respectivamente, en agua de consumo (Tabla 4.1).

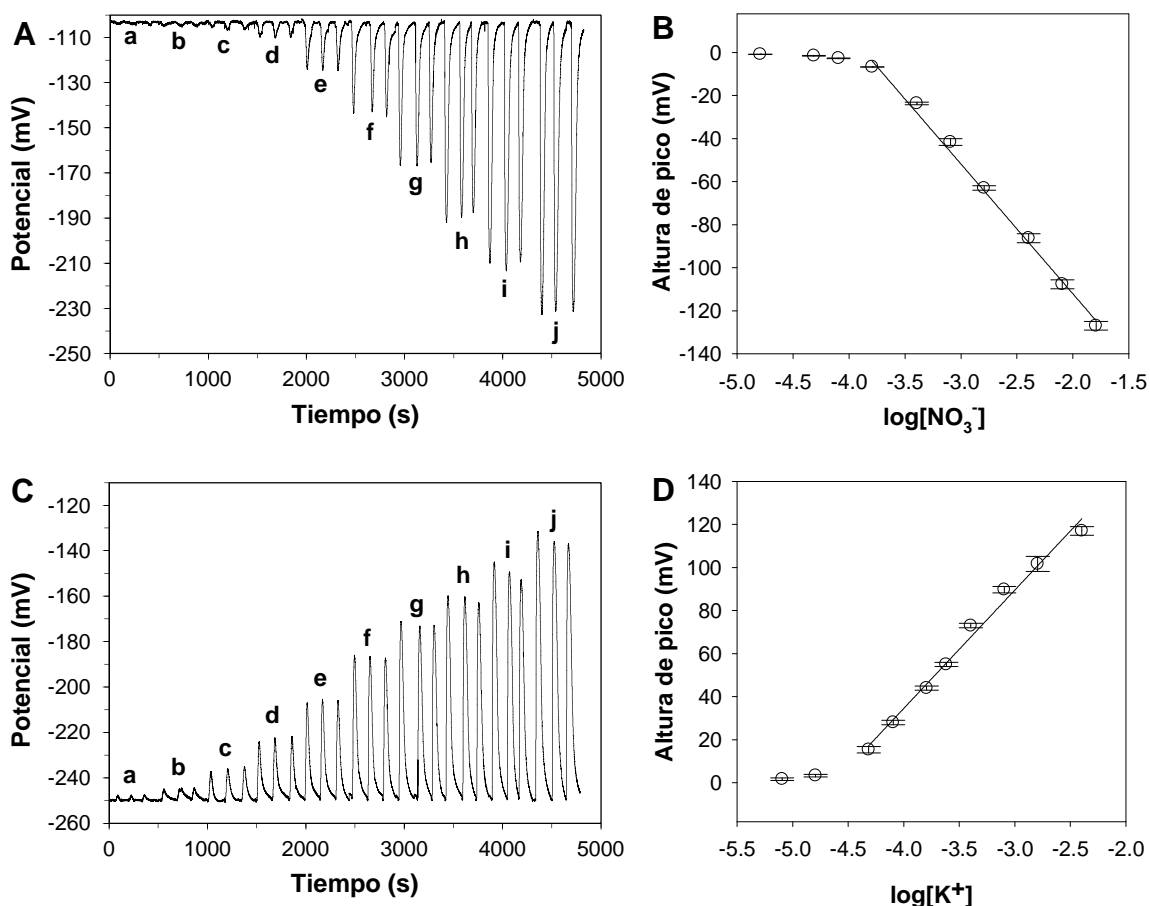


Figura 4.13. Registro de la señal y curvas de calibrado obtenidas por los ESIs del microanalizador usando disoluciones estándar de KNO₃. **(A)** y **(B)** electrodo de nitrato, disoluciones de NO₃⁻ de 1 mg L⁻¹ (a), 3 mg L⁻¹ (b), 5 mg L⁻¹ (c), 10 mg L⁻¹ (d), 25 mg L⁻¹ (e), 50 mg L⁻¹ (f), 100 mg L⁻¹ (g), 250 mg L⁻¹ (h), 500 mg L⁻¹ (i) y 1000 mg L⁻¹ (j). **(C)** y **(D)** electrodo de potasio: disoluciones de K⁺ de 0.3 mg L⁻¹ (a), 0.6 mg L⁻¹ (b), 1.9 mg L⁻¹ (c), 3.2 mg L⁻¹ (d), 6.3 mg L⁻¹ (e), 9.5 mg L⁻¹ (f), 15.8 mg L⁻¹ (g), 32 mg L⁻¹ (h), 63 mg L⁻¹ (i) and 155 mg L⁻¹ (j).

Se realizaron estudios de repetitividad (Figura 4.14) mediante inyecciones sucesivas de dos disoluciones estándar de 0.2 y 0.6 mM de KNO₃. El porcentaje de los coeficientes de variación (CV %) de las señales fueron 1.8 % (para 0.2 mM) y 1.5 % (para 0.6 mM) para el electrodo selectivo de potasio y 4.7 % (para 0.2 mM) y 1.4 % (para 0.6 mM) para el electrodo selectivo de nitrato.

La reproducibilidad del microsistema fue también estudiada mediante la realización de tres calibrados, a lo largo de los primeros 15 días de vida del microsistema, usando reactivos y disoluciones estándar nuevos cada vez (Figura 4.15). Se obtuvieron valores de sensibilidad promedios de 59.5 y 55.5 mV déc.⁻¹ y

CV % de 3 % y 1.5 % para el electrodo selectivo de nitrato y potasio, respectivamente, demostrando de esta manera la reproducibilidad del microsistema. Todos estos resultados muestran la robustez de todo el microsistema, incluso cuando las concentraciones estaban cerca del límite de detección.

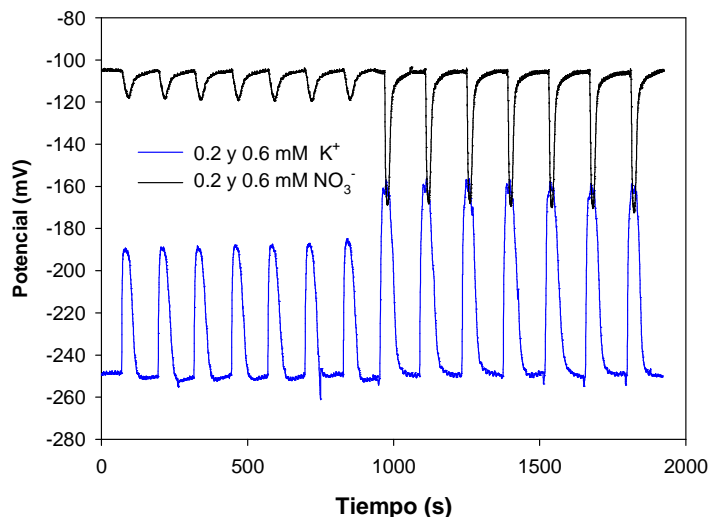


Figura 4.14. Registro de la señal de 7 inyecciones consecutivas de dos disoluciones estándar de 0.2 y 0.6 mM de KNO_3 con el objetivo de calcular la repetitividad del microsistema.

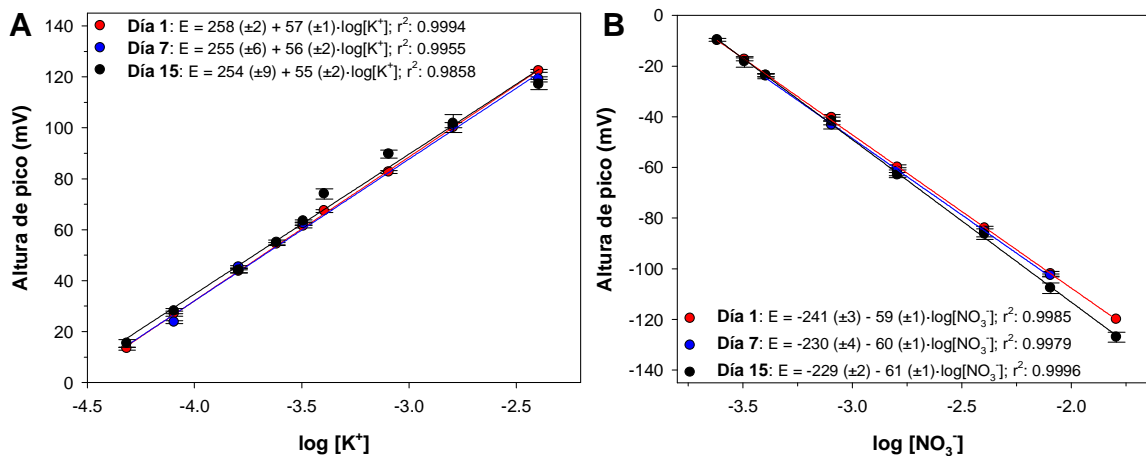


Figura 4.15. Curvas de calibración por triplicado obtenidas para cada uno de los ESI (A) potasio, B) nitrato) a lo largo de los primeros 15 días con el fin de calcular la reproducibilidad del microsistema.

Con la configuración del microsistema y los parámetros químicos e hidrodinámicos optimizados, se obtuvo una frecuencia de análisis de 30 muestras h^{-1} , aunque este factor no comporta una limitación para la aplicación final del microsistema en misiones espaciales tripuladas, ya que la frecuencia de análisis será relativamente baja.

4.1.5. Análisis de muestras reales

Finalmente, el microsistema fue aplicado para la determinación simultánea de iones nitrato y potasio en diferentes muestras de agua, proporcionadas por la ESA, procedentes de la unidad de reciclado de agua ubicada en la estación de pruebas Concordia de la Antártida (Figura 4.16).

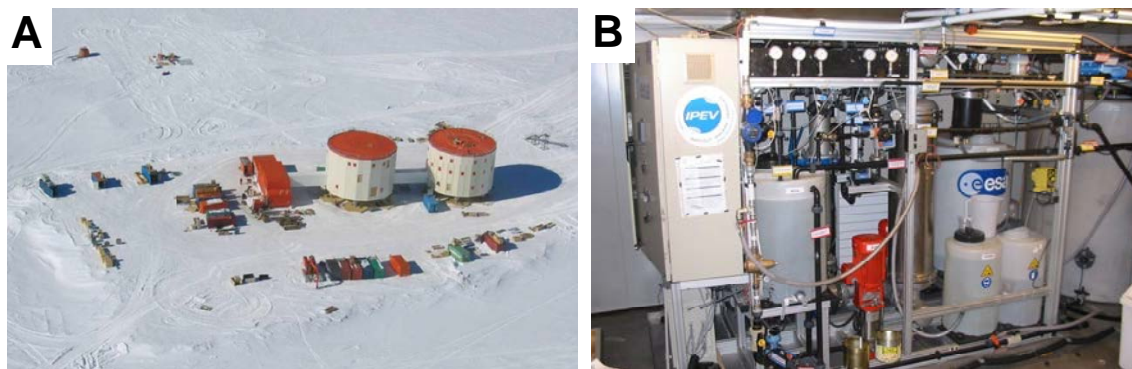


Figura 4.16. A) Imagen aérea de la base de pruebas Concordia situada en la Antártida. B) Imagen del prototipo de sistema de reciclado de agua que está siendo testado en Concordia.

Concretamente, las muestras analizadas procedían del efluente de la primera etapa de osmosis inversa del proceso de reciclado (Figura 4.2). Los resultados obtenidos fueron validados mediante la comparación de estos con los obtenidos mediante el análisis por espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES),³⁷ para determinar el ión potasio, y mediante cromatografía iónica (CI),³⁸ para determinar el nitrato. Además, para evaluar la potencial interferencia de cloruro sobre el electrodo de nitrato, su concentración fue medida por CI, obteniéndose una concentración promedio en las muestras de 18.70 mg L^{-1} . Los resultados se muestran en la tabla 4.4.

En el caso del nitrato, la concentración de tres muestras estaba bajo el LD del ESI. Con el fin de obtener valores para poder comparar los resultados de todas las muestras, se realizó un ajuste no lineal de los datos experimentales, aplicando la ecuación de Nikolskii-Eisenmann (ecuación 1.7), a la hora de construir la curva de calibrado. De esta manera, la ecuación no lineal de calibración ($n = 6$, 95 % de confianza) obtenida fue $E = -254.6 (\pm 4.2) - 73.8 (\pm 1.8) \log [[\text{NO}_3^-] + 3.1 \cdot 10^{-4} (\pm 3 \cdot 10^{-5})]$ con $r^2=0.994$. Los resultados mostrados en la tabla 4.4 para el electrodo selectivo de nitrato se obtuvieron por interpolación en esta ecuación no lineal. A pesar de ser menos precisa que la ecuación de Nernst, permitió obtener resultados válidos.

Como se desprende de los resultados, en muestras con bajas concentraciones, por debajo de los requerimientos de la ESA tanto en agua de higiene como para consumo (50 y $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$, respectivamente), los valores de concentración obtenidos eran ligeramente más altos que los obtenidos por CI. Esto podía estar relacionado con el efecto interferente del ión cloruro sobre la respuesta analítica del

electrodo de nitrato a concentraciones muy bajas de este, cercanas al LD. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que a concentraciones ligeramente más altas (muestra 4), pero todavía lejos de los 25 mg L⁻¹ NO₃⁻ establecidos por la ESA, la exactitud de los resultados obtenidos mejoraba considerablemente. Por el contrario, en el caso de la determinación de potasio, los resultados obtenidos por el microanalizador no fueron significativamente diferentes a los obtenidos por ICP-OES según la prueba de t de Student apareada ($t_{\text{calc}} = 1.000$; $t_{\text{tab}} = 3.182$; $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$). Estos resultados confirmaban que el microsistema analítico propuesto es útil para la determinación simultánea de nitrato y potasio en este tipo de muestras de agua.

Tabla 4.4. Valores promedio de concentración en mg L⁻¹ (n = 3, 95 %) del análisis de muestras de agua reales usando el microsistema propuesto.

| Muestra | Nitrato | | | Potasio | | |
|---------|------------|-------|---------|-----------|---------|---------|
| | ESI LTCC | IC | % error | ESI LTCC | ICP-OES | % error |
| 1 | 3.0 ± 0.4 | 1.82 | 61.1 | 3.2 ± 0.2 | 3.32 | 3.3 |
| 2 | 4.1 ± 0.4 | 2.88 | 40.6 | 3.9 ± 0.4 | 3.99 | 2.8 |
| 3 | 8.8 ± 0.5 | 7.82 | 12.6 | 6.9 ± 0.3 | 6.94 | 0.4 |
| 4 | 14.2 ± 0.6 | 13.31 | 6.7 | 9.9 ± 0.4 | 10.2 | 2.5 |

4.1.6. Conclusiones

En esta parte del trabajo han sido demostradas las posibilidades que la tecnología LTCC ofrece para el desarrollo de analizadores biparamétricos miniaturizados simples y robustos para aplicaciones que requieren de dispositivos con un elevado grado de integración y tamaño reducido. En este sentido, se ha desarrollado, caracterizado y aplicado al análisis de muestras reales satisfactoriamente, un prototipo de microanalizador para la determinación simultánea de iones nitrato y potasio, basado en medidas potenciométricas. La plataforma microfluídica y el sistema de detección han sido diseñados y optimizados con la finalidad de maximizar la autonomía operacional, requisito necesario en misiones espaciales tripuladas, y conseguir unas características analíticas adecuadas. Además, la compatibilidad entre la tecnología LTCC y la resina de epoxi-grafito, usada como soporte conductor de los ESIs, ha sido también demostrada.

Las características analíticas obtenidas están en concordancia con los requisitos establecidos por la ESA. Sin embargo, a pesar de ser una buena prueba de concepto para demostrar que se pueden alcanzar los objetivos planteados, hay algunos detalles que deben ser mejorados. En la siguiente sección se presentará un nuevo microanalizador multiparamétrico, desarrollado con la intención de superar las limitaciones del microsistema recientemente presentado en términos de interferentes, autonomía, automatización y miniaturización de todo el montaje experimental.

4.2. Microsistema potenciométrico automatizado multiparamétrico para la monitorización de iones potasio, nitrato y cloruro

En el apartado anterior (§4.1), se ha presentado un microsistema biparamétrico basado en la tecnología LTCC para determinar potenciométricamente nitrato y potasio en muestras de agua reciclada en misiones espaciales tripuladas. Sin embargo, el prototipo desarrollado muestra algunas limitaciones: el efecto interferente del ión cloruro sobre el electrodo selectivo de nitrato y la falta de miniaturización y automatización de todo el sistema de flujo en continuo, compuesto por bombas y válvulas de inyección convencionales de considerable tamaño. Estas limitaciones pueden comprometer el uso del microsistema en la aplicación para la que ha sido desarrollado. Por este motivo se han buscado distintas soluciones para superar estos problemas. Por un lado, existen diferentes opciones para eliminar la interferencia del ión cloruro sobre el electrodo de nitrato. Hay algunos sistemas analíticos reportados que usan un agente enmascarante o secuestrante, como por ejemplo el sulfato de plata (Ag_2SO_4), con la finalidad de conseguir la precipitación del ión cloruro en forma cloruro de plata (AgCl).^{13,39} Sin embargo, esta no sería la mejor opción puesto que el Cl^- es otro de los parámetros a determinar según la ESA para verificar el correcto funcionamiento del sistema de reciclado de agua (Tabla 4.1) y, además, el precipitado podría obturar los microcanales. Otros sistemas analíticos reportados proponen el uso de lenguas electrónicas basadas en una matriz de sensores inespecíficos combinados con un complejo procesado de los datos, para superar la mencionada interferencia de cloruro.^{40,41} Finalmente, otro enfoque utilizado consiste en la integración, en sistemas analíticos de flujo en continuo, de un electrodo selectivo de ión cloruro junto al electrodo selectivo de ión nitrato. Así, en base al valor de la concentración del ión cloruro obtenido, es posible corregir de forma muy sencilla el efecto interferente de este ión sobre el electrodo de nitrato, utilizando la ecuación de Nikolski-Eisenmann.^{23,31} Con esta última opción se podría obtener, en combinación con los electrodos selectivos de nitrato y potasio optimizados previamente, un prototipo de microsistema multiparamétrico que cumpliera con los requisitos demandados por la ESA de compactación de los sistemas analíticos y, por consiguiente, de disminución del consumo de reactivos y muestra. Por otro lado, como se ha podido ver en el capítulo introductorio (§1.1.2.2), para alcanzar la miniaturización y la automatización necesarias en el montaje experimental, se puede recurrir al uso de microbombas y microválvulas solenoides que, en combinación con procedimientos de multiconmutación, permiten obtener sistemas de gestión de fluidos completamente automáticos y autónomos.⁴²⁻⁴⁴ Estos sistemas, además de reducir el tamaño y el peso del montaje experimental, permiten

preparar automáticamente disoluciones estándar en línea, mediante dilución por multiconmutación de una disolución madre. El objetivo radica en disponer de un proceso de autocalibrado y análisis de muestras automático, realizado sin la participación de los miembros de la tripulación.

El GSB, como se ha comentado previamente (§4.1), tiene una vasta experiencia en el desarrollo de microanalizadores fabricados mediante la tecnología LTCC, incorporando detección potenciométrica. Sin embargo, y a pesar de haberse utilizado para la fabricación de microanalizadores con detección espectrofotométrica y permitir la obtención de dispositivos con menor fragilidad y peso que los cerámicos, la tecnología de polímeros no se ha utilizado para construir este tipo de microanalizadores potenciométricos.⁴⁵⁻⁴⁷ Este hecho se ha debido, en gran medida, a las dificultades para encontrar materiales conductores compatibles con el sustrato polimérico.

Por todo esto, y con el objetivo secundario de explotar e introducir una nueva área de aplicación de la tecnología de polímeros en el GSB, en esta parte del trabajo se propone desarrollar un nuevo y robusto prototipo de microanalizador fabricado en COC para la monitorización simultánea de iones potasio, cloruro y nitrato, que mejore el rendimiento del microsistema biparamétrico previamente desarrollado. Este nuevo dispositivo analítico pretende minimizar la interferencia de cloruro sobre el electrodo de nitrato y miniaturizar y automatizar el sistema de gestión de líquidos incorporando microbombas (peristálticas y solenoides) y microválvulas. El microanalizador integrará la microfluídica y el sistema de detección, siendo su tamaño muy inferior al de una tarjeta de crédito. El sistema de detección consistirá en dos ESIs, para determinar nitrato y potasio, y dos electrodos serigrafados de Ag/AgCl, uno actuando como electrodo selectivo de cloruro y el otro como electrodo de referencia. El prototipo, finalmente, será aplicado en el análisis de muestras sintéticas preparadas con una matriz similar a la de las muestras reales obtenidas de la planta de reciclado de agua de la estación Concordia de la Antártida.

4.2.1. Materiales y reactivos

El microsistema fue fabricado usando placas y láminas de COC suministradas por Topas Advanced Polymers (Florence, KY, EEUU) en diferentes grados y grosores: placas Topas 5013 de 1 mm de grosor y láminas Topas 8007 de 25 µm de grosor.

Como soporte conductor de los ESIs de membrana polimérica, se utilizó la misma resina epoxi-grafito utilizada anteriormente (§4.1.1), constituida por una mezcla al 50 % de grafito en polvo de 50 µm de tamaño de partícula (Merck, Alemania), 36 % de epoxi Araldite-M y 14 % de endurecedor HR (ambos de Ciba Geigy, España). Para fabricar tanto el electrodo selectivo de ión cloruro como el electrodo de referencia se testaron tres tipos de pastas conductoras: una pasta de Ag/AgCl

C2030812D3 (Gwent, Pontypool, Reino Unido) y dos pastas epoxi conductoras bicomponente de plata: CircuitWorks® (Chemtronics, Holanda) y EPO-TEK® H20E (Epoxy Technologies, Massachusetts, EEUU).

Para la preparación de las membranas sensoras se usaron los mismos componentes y en la misma proporción que en la sección anterior (§4.1.1). Así, para la membrana selectiva de nitrato se utilizó un 6 % de T8 como elemento de reconocimiento, un 65 % de TEHP como plastificante, un 29 % de PVC como matriz polimérica y 3 mL de THF como disolvente volátil mientras que para la de potasio se utilizó un 1 % de valinomicina como elemento de reconocimiento, un 65.5 % de DOS como plastificante, 0.5 % de KtpClPB como aditivo, 33 % de PVC como matriz polimérica y 3 mL de THF. Todos los componentes para preparar las membranas sensoras fueron adquiridos en Fluka (Barcelona, España).

Todos los reactivos usados para la optimización y la caracterización del microsistema fueron de calidad analítica o superior. El sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) fue adquirido en J.T. Baker (Holanda). El sulfato de sodio (Na_2SO_4) y el nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) fueron comprados a Panreac (Barcelona, España). El nitrato de potasio (KNO_3) fue proporcionado por Merk (Alemania). El cloruro de sodio (NaCl), el cloruro de potasio (KCl) y el ácido sulfúrico al 98 % (H_2SO_4) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). El acetato de magnesio (MgAc_2) y el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) fueron adquiridos en Fluka (Barcelona, España). Todas las disoluciones fueron preparadas usando agua doblemente destilada o Milli-Q. Tanto la disolución madre mixta de $630 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ y $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ (utilizada en el proceso de calibración mediante dilución automática por multiconmutación) como las disoluciones estándar preparadas manualmente por dilución sucesiva (utilizadas para verificar el buen funcionamiento del programa de dilución automática), fueron obtenidas a partir de una disolución madre de 0.1 M de KNO_3 y 0.1 M de NaCl . Las disoluciones estándar de K^+ y NO_3^- solo, fueron preparadas a partir de una madre de 0.1 M de KNO_3 . Como disolución auxiliar de referencia, para mantener el potencial del electrodo de referencia constante, se usó KCl 0.1 M. Como disolución acondicionadora, para mantener la fuerza iónica estable, se usó Na_2SO_4 0.05 M ajustada a pH 3 con H_2SO_4 .

Para el estudio de interferentes, se prepararon las mismas disoluciones ya descritas anteriormente (§4.1.1).

4.2.2. Montaje experimental

El montaje experimental utilizado se puede observar en la figura 4.17 y consiste en tres partes principales: el microanalizador desarrollado, el sistema de gestión de fluidos y el sistema de adquisición y procesado de datos. El sistema de gestión de fluidos estaba constituido por un híbrido entre sistemas multibomba y

multiconmutación compuesto por dos microbombas solenoides: una (Figura 4.17, BS1) de 4 μL por pulso (P/N 030SP124-4TV) y otra (Figura 4.17, BS2) de 10 μL por pulso (P/N 120SP1210-5TP) (ambas de BiochemValve Inc., Montluçon Cedex, Francia), una microbomba peristáltica (Kamoer KP-S10DGC0, Shanghai, China) con un controlador de revoluciones hecho a medida (TMI, Barcelona, España) usando tubo de Tygon® de 0.19 mm de diámetro interno (Ismatec, Wertheim, Alemania) y tres microválvulas solenoides de tres vías (161T031, NResearch, Suiza). Para la conexión hidráulica entre los diferentes actuadores y el microsistema analítico se usó tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno (Scharlab, S.L., Cambridge, Inglaterra). Se utilizó un controlador de actuadores fluidicos (Flowtest™, Biotray, Francia) con su correspondiente software, con el fin de programar el proceso de autocalibración mediante multiconmutación y para automatizar completamente el proceso analítico evitando así la necesidad de intervención por parte del usuario.

La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron mediante un potenciómetro personalizado (TMI, Barcelona, España) y el software asociado.

Tanto el controlador de actuadores fluidicos como el potenciómetro fueron controlados, a su vez, por un ordenador.

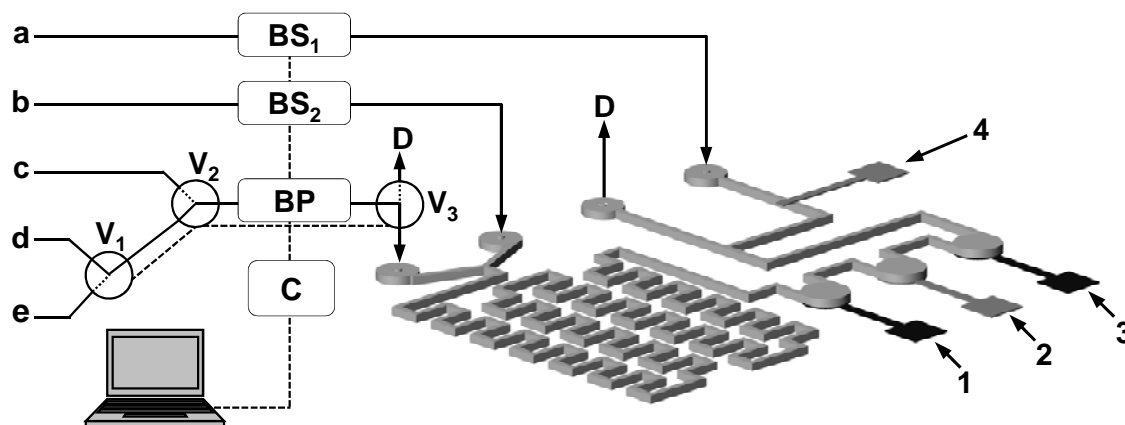


Figura 4.17. Esquema del montaje experimental: (a) disolución auxiliar de KCl 0.1 M; (b) disolución acondicionadora de Na_2SO_4 0.05 M a pH 3; (c) muestra; (d) H_2O ; (e) disolución madre de 1000 mg L^{-1} NO_3^- , 630 mg L^{-1} K^+ y 1000 mg L^{-1} Cl^- ; (D) desecho; (V_x) microválvulas solenoides de tres vías; (BP) microbomba peristáltica; (BS_x) microbombas solenoides; (C) controlador de elementos de gestión de fluidos; (1) electrodo selectivo de potasio; (2) electrodo selectivo de cloruro; (3) electrodo selectivo de nitrato; (4) electrodo de referencia.

4.2.3. Diseño y optimización del sistema analítico

El microanalizador fue fabricado mediante la tecnología de polímeros, usando como sustrato COC. El proceso de fabricación y las ventajas asociadas a este han sido explicadas en detalle previamente (§1.2.1.1 y §3.2). El diseño del dispositivo (Figura 4.18.A) permitió fabricar simultáneamente dos microsistemas idénticos.

Estos estaban formados por cinco capas, 3 placas de 1 mm (Topas 5013) (“a”, “b” y “c”) y 2 láminas de 25 μm (Topas 8007) previamente laminadas sobre la capa “a” y la capa “c”, de manera que una vez superpuestas y laminadas, proporcionaron la estructura tridimensional deseada. Las dimensiones exteriores de cada microanalyzer fueron 40 x 30 x 3 mm y su peso total fue de 4 g. La microfluídica en el interior del microsistema presentaba 3 entradas y una salida de líquidos (Figura 4.17). Como se puede observar, dos de las entradas convergen en un punto de confluencia en forma de Y que mezcla la disolución procedente del subsistema de multiconmutación (ya sea agua, muestra o disolución estándar) con la disolución acondicionadora, con el fin de mantener constante la fuerza iónica y el pH de la mezcla resultante. Posteriormente, esta disolución es llevada, a través del micromezclador, hacia las cámaras de detección, donde cada analito es determinado por su correspondiente electrodo selectivo. Finalmente la disolución es dirigida al desecho. Con la finalidad de mantener en un valor constante el potencial suministrado por el electrodo de referencia,¹⁹ a través de la tercera entrada de líquidos del microsistema se introduce una disolución auxiliar de KCl 0.1 M impulsada continuamente a un caudal de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. Dicha disolución fluye a lo largo del canal donde está serigrafiado el electrodo de referencia hacia un punto de confluencia donde se mezcla con la disolución que fluye por el canal principal.

Las dimensiones de los canales fueron de 0.4 mm de ancho por 0.25 mm de alto, el diámetro de cada una de las cámaras de detección fue de 3.5 mm y el volumen muerto de cada una de ellas fue de 15 μL , siendo el volumen muerto total del microsistema de 70 μL .

La resina de epoxi-grafito utilizada como soporte conductor de las membranas sensoras fue colocada en la correspondiente cavidad hecha por grabado en bajo-relieve (Figura 4.18.C y D), fue curada a 40 °C durante 24 h y finalmente su superficie fue lijada y pulida previamente a la laminación final del dispositivo. Las membranas poliméricas selectivas a nitrato y potasio fueron depositadas gota a gota, con posterioridad a la laminación final, en el interior de la correspondiente cavidad (Figura 4.18.C y D) siguiendo un procedimiento optimizado que se mostrará más adelante (§4.2.3.2.). Estas cavidades estaban definidas sobre el soporte conductor de epoxi-grafito y por debajo de los microcanales.

Finalmente, los conectores fluídicos fueron fijados sobre las entradas/salidas del microanalyzer mediante un soporte auxiliar y tornillos (Figura 4.18.B).

En la sección anterior (§4.1.), se optimizó tanto el material del soporte conductor de los ESIs como la configuración de la cámara de detección, para obtener las mejores características analíticas en términos de sensibilidad, estabilidad de línea base, límites de detección y tiempo de análisis. Por este motivo, en esta parte del trabajo se usó la misma configuración de entrada de líquido circular en la cámara de detección y la misma resina de epoxi-grafito como transductor.

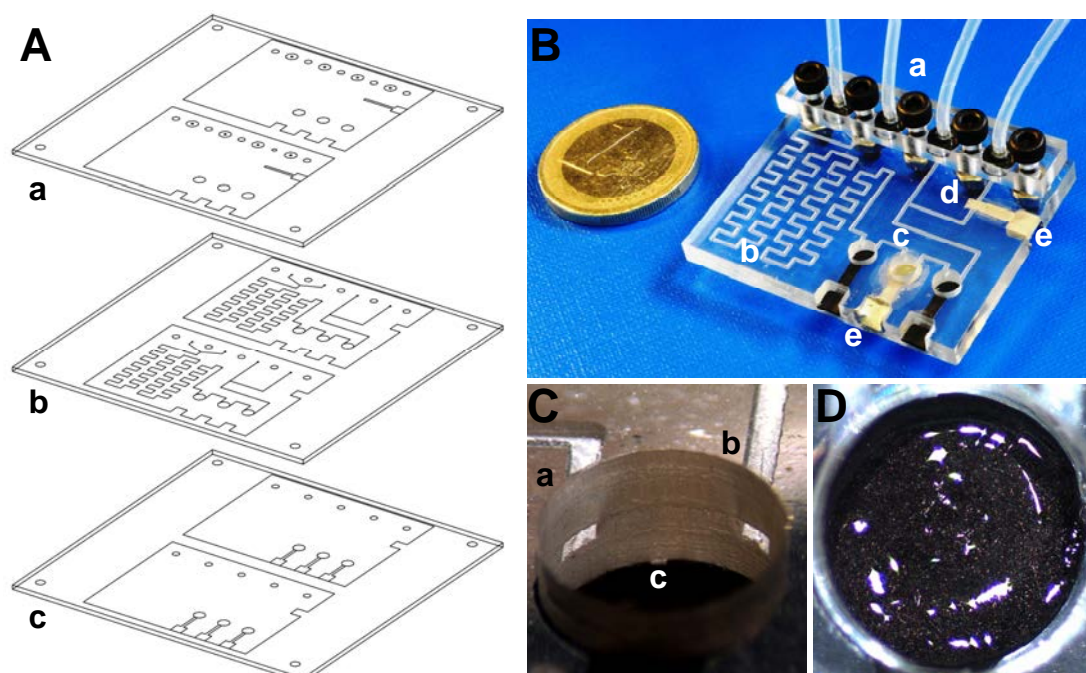


Figura 4.18. **A)** Diseño del prototipo de microsistema multiparamétrico. **B)** Fotografía del dispositivo final construido: (a) conectores fluidicos; (b) plataforma de microfluídica; (c) cámaras de detección con las membranas poliméricas depositadas en su interior; (d) electrodo de referencia; (e) conectores eléctricos. **C)** Detalle del interior de una cámara de detección: (a) microcanal de entrada a la cámara de detección; (b) microcanal de salida; (c) membrana polimérica selectiva de iones depositada sobre el soporte conductor de resina epoxi-grafito. **D)** Imagen cenital de una de las cámaras de detección donde se puede ver la superficie brillante de la membrana polimérica selectiva de iones depositada sobre el soporte conductor.

Con el objetivo en mente de reducir el consumo de muestra y reactivos, la microfluídica fue rediseñada y optimizada reduciendo un 50 % el volumen muerto total del microsistema, en comparación al previamente desarrollado. Esto a pesar de que el nuevo dispositivo integraba un electrodo selectivo más (y por tanto una cámara de detección más) y un micromezclador más largo. En este sentido, la clave residió, fundamentalmente, en la reducción del tamaño de los canales. En relación a las prestaciones y características del microanalizador requeridas por la ESA, el uso de la tecnología de polímeros permitió, además, la obtención de un microsistema analítico mucho menos frágil, reduciendo su peso en un 67 %.

4.2.3.1. Integración del electrodo de Ag/AgCl como electrodo indicador y de referencia

Uno de los retos que presenta la implementación de técnicas electroquímicas en los dispositivos analíticos fabricados con COC es la integración de los materiales conductores. Estos pueden actuar, propiamente, como sensores o como soporte conductor sólido de las membranas sensoras, constituyendo electrodos, o pueden actuar como pistas conductoras de circuitos de conexión embebidos. Existen

numerosos trabajos en los que se integran materiales conductores mediante tecnología de capa fina (o *thin-film*) usando pulverización anódica (*sputtering*), fotolitografía y galvanizado (*electroplating*).⁴⁸⁻⁵⁰ Sin embargo no hay prácticamente ningún trabajo reportado en el que se use una tecnología de capa gruesa (o *thick-film*) como la serigrafía, a pesar de ser mucho más simple y económica. Existen en el mercado un amplio surtido de pastas y tintas, constituidas por distintos materiales conductores (plata, oro, grafito, etc.), que son compatibles para su deposición mediante serigrafado sobre polímeros termoplásticos como polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC) y poliestireno (PS). Estas pastas poseen una serie de disolventes que atacan la superficie del sustrato polimérico permitiendo de esta manera su adhesión. Sin embargo, el COC presenta una mayor resistencia química frente a numerosos compuestos y disolventes (§1.2.1.1.), cosa que hace que encontrar una pasta o tinta conductora perfectamente compatible con este material sea más complicado. Gracias a la colaboración de la empresa Gwent Grup, dedicada a la formulación de tintas y pastas conductoras para diferentes tipos de aplicaciones, se consiguió desarrollar una pasta de Ag/AgCl (C2030812D3) que según las especificaciones teóricas debería ser compatible con el sustrato utilizado. Paralelamente, se seleccionaron otras dos pastas conductoras de tipo epoxi bicomponente, que en principio podían ser también compatibles con el COC y que estaban formadas por Ag en lugar de Ag/AgCl (CircuitWorks® y EPO-TEK® H20E).

Inicialmente, para evaluar la compatibilidad de los tres materiales conductores con el sustrato, se realizaron dos pruebas: un test de adhesión estándar de las pastas serigrafiadas sobre el sustrato⁵¹ y un test de laminación. El test de adhesión consistió en pegar un trozo de cinta adhesiva sobre la pasta o tinta serigrafiada para, posteriormente, retirarla. Si la cinta adhesiva no elimina ninguna parte de la capa serigrafiada, la adhesión se considera buena. Por su parte, el test de laminación consistió en laminar dos placas de COC, con estas pastas serigrafiadas entre medio, para verificar que se producía un sellado hermético. Los motivos serigrafiados para estas pruebas fueron unas pistas conductoras en línea recta de 1 cm de longitud y 3 mm de ancho.

El test de adhesión arrojó resultados razonablemente aceptables para los tres tipos de materiales conductores. Sin embargo, en el caso de las dos pastas de epoxi-plata no se pudo llevar a cabo un correcto serigrafado de las pistas conductoras debido a la alta viscosidad del producto. A simple vista se observaban discontinuidades en la capa serigrafiada, cosa que repercutía negativamente en la conductividad eléctrica y obligaba a realizar varias veces el proceso de serigrafado para obtener una pista homogénea. Este proceso aumentaba el grosor de la capa, haciendo que los resultados del test de laminación con las pastas epoxi-plata no fueran satisfactorios, ya que el grosor que tenían las pistas provocaba la deformación de

las placas de COC y, por consiguiente, un mal sellado entre estas. Por el contrario, los resultados del test de laminación para la pasta de Ag/AgCl fueron completamente satisfactorios. En vista de los resultados obtenidos se decidió proceder a caracterizar electroquímicamente únicamente la pasta de Ag/AgCl. Para ello se construyeron una serie de electrodos utilizando esta pasta (Figura 4.19.A) siendo evaluados para establecer su viabilidad como electrodos de referencia de Ag/AgCl y como electrodos indicadores de cloruros. Adicionalmente, se trató de usar esta pasta como soporte conductor de un ESI de membrana polimérica para, con ello, simplificar el proceso de integración de electrodos. Sin embargo, los resultados no fueron positivos debido a que al depositar gota a gota la membrana sensora, el THF disolvía la pasta conductora inutilizando su uso como soporte conductor.

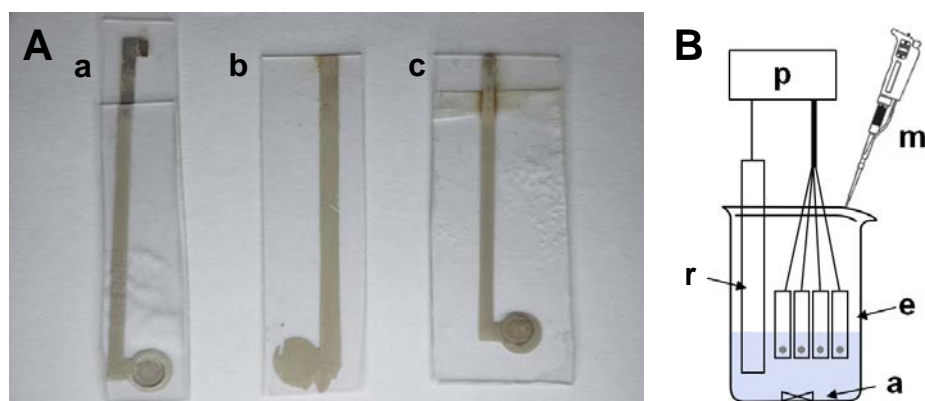


Figura 4.19. A) Electrodos construidos con la pasta de Ag/AgCl para ser usados como electrodos indicadores de cloruros y referencia (a y b) y como soporte conductor de un electrodo selectivo de iones de membrana polimérica (c). B) Montaje experimental para realizar las medidas en discontinuo: (a) agitador magnético; (e) electrodos construidos a testar; (m) micropipeta; (p) potenciómetro; (r) electrodo de referencia comercial de Ag/AgCl.

Primero de todo, para verificar la viabilidad de los dispositivos construidos como electrodos de referencia, se llevó a cabo un experimento utilizando el montaje experimental que se muestra en la figura 4.19.B. El objetivo era evaluar la estabilidad de las medidas de potencial suministradas por los electrodos a lo largo del tiempo, sumergidos en una disolución de NaCl 0.1 M. El mantenimiento de un potencial constante indicaría que estos pueden ser usados como electrodos de referencia. Se usó un electrodo de referencia de Ag/AgCl comercial (Orion) y tres electrodos serigrafiados registrándose los valores de potencial de cada electrodo cada 30 segundos a lo largo de 40 minutos.

Los resultados obtenidos (Figura 4.20) mostraron una variabilidad de ± 0.2 mV de promedio a lo largo del tiempo del experimento, por lo que se pudo concluir que los electrodos construidos con la pasta de Ag/AgCl podían ser usados como electrodos de referencia.

Para verificar que estos mismos electrodos respondían de manera nerstiana a la concentración de ión cloruro, se realizaron una serie de calibrados usando el montaje experimental anterior (Figura 4.19.B). Esta vez se fueron adicionando volúmenes de disoluciones estándar de NaCl de concentración creciente con micropipeta y anotando el valor de potencial cada minuto para obtener la curva de calibrado de cada electrodo.

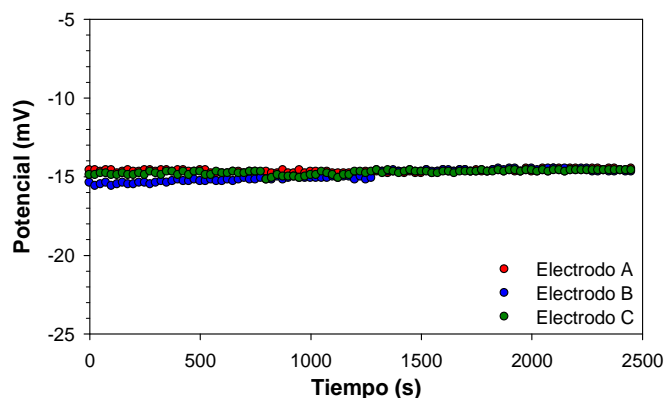


Figura 4.20. Registro de potencial de tres electrodos de Ag/AgCl, usando el montaje experimental para medidas en discontinuo, con la finalidad de evaluar su viabilidad como electrodos de referencia.

Como se puede observar en la figura 4.21, los electrodos respondían de manera lineal al $\log[\text{Cl}^-]$, según establece la ecuación de Nernst, obteniéndose una ecuación global de $E = -6 (\pm 3) - 56 (\pm 2) \log [\text{Cl}^-]$ con $r^2 = 0.9996$.

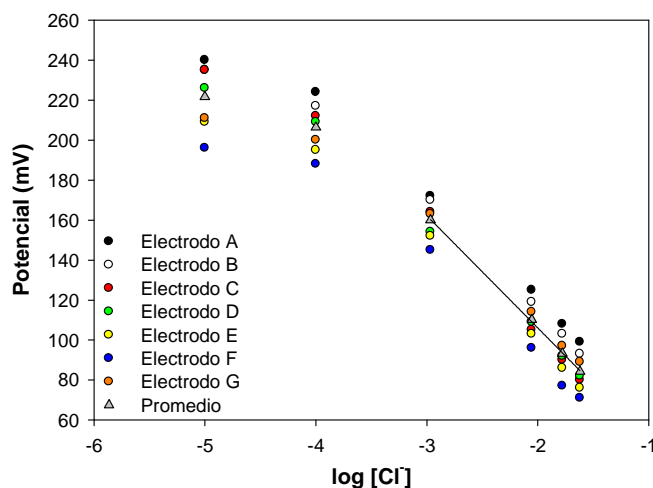


Figura 4.21. Curvas de calibración obtenidas para cada uno de los electrodos de Ag/AgCl testados, actuando como electrodos selectivos de cloruro.

Estos resultados permitieron verificar que los electrodos serigrafados con la pasta de Ag/AgCl podían actuar como electrodos de referencia y como electrodos selectivos de ión cloruro, indistintamente.

Llegados a este punto, el siguiente paso era verificar su buen funcionamiento integrados en microsistemas de flujo continuo. Para ello se diseñó y fabricó un microsistema modular, para permitir una fácil sustitución de los diferentes

elementos en caso de necesidad. Este constaba de dos partes: un módulo de detección (Figura 4.22.A y B), que integraba dos electrodos serigrafiados de Ag/AgCl, actuando uno como ESI y otro como electrodo de referencia y un módulo de mezcla (Figura 4.22.C y D), para poder homogeneizar la disolución resultante de la mezcla de la disolución estándar de Cl⁻ con la disolución acondicionadora. En este caso la disolución acondicionadora usada fue la optimizada para el dispositivo biparamétrico (§4.1.3.4), con el objetivo de poder evaluar el dispositivo triparamétrico en las mismas condiciones. La figura 4.22.E muestra el montaje experimental utilizado.

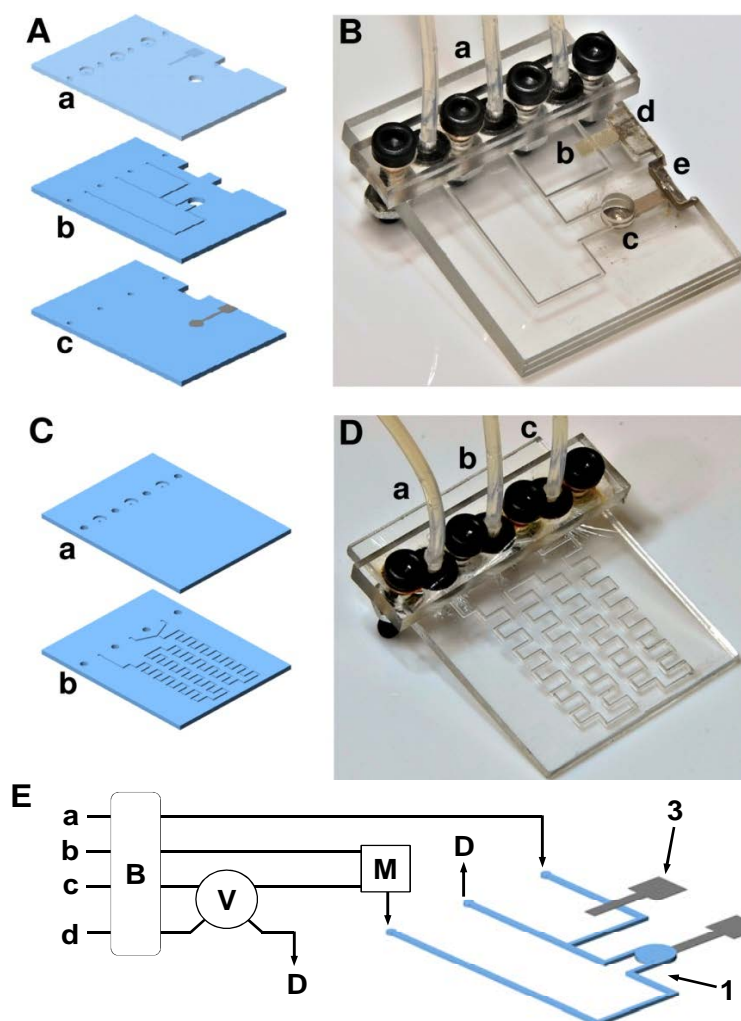


Figura 4.22. A) Diseño del módulo de detección formado por 3 capas de COC de 1mm de espesor: (a) capa superior que contiene las entradas y el electrodo de referencia serigrafiado; (b) capa intermedia que contiene la fluídica; (c) capa inferior que contiene el electrodo indicador serigrafiado. B) Imagen real del módulo de detección: (a) conectores fluídicos; (b) electrodo de referencia de Ag/AgCl; (c) cámara de detección con el electrodo selectivo de ión cloruro; (d) y (e) conectores eléctricos de los respectivos electrodos. C) Diseño del módulo de mezcla que consta de 2 capas de COC de 1 mm de espesor: (a) capa superior con las entradas; (b) capa inferior con la fluídica. D) Imagen real del módulo de mezcla: (a) canal de salida; (b) y (c) canales de entrada que se mezclan. E) Montaje experimental para realizar las pruebas en FIA: (a) KCl 0.1 M; (b) Na₂SO₄ 0.05 M a pH 3; (c) H₂O; (d) disoluciones estándar de Cl⁻; (B) bomba peristáltica de cuatro canales; (V) Válvula rotatoria de seis vías; (M) módulo de mezcla; (D) desecho; (1) cámara de detección; (2) ESI de Cl⁻; (3) electrodo de referencia.

Los resultados obtenidos del calibrado realizado (Figura 4.23), usando disoluciones estándar de NaCl que comprendían de 0.06 a 2287 mg L⁻¹ Cl⁻ y seleccionado arbitrariamente un caudal y volumen de inyección de 400 μL min⁻¹ y 225 μL, respectivamente, permitieron obtener una ecuación de la recta de $E = 253 (\pm 1) - 55.5 (\pm 0.5) \log[\text{Cl}^-]$ con $r^2 = 0.9994$. El rango de respuesta lineal fue de 2 a 2287 mg L⁻¹ y el LD fue de 1 mg L⁻¹ Cl⁻. Estos resultados mostraron que las características analíticas proporcionadas por ambos electrodos (indicador y referencia) eran lo suficientemente buenas como para considerarlos perfectamente aptos para la aplicación propuesta, por lo que la pasta de Ag/AgCl utilizada demostró ser completamente compatible con la fabricación en COC de microsistemas potenciométricos.

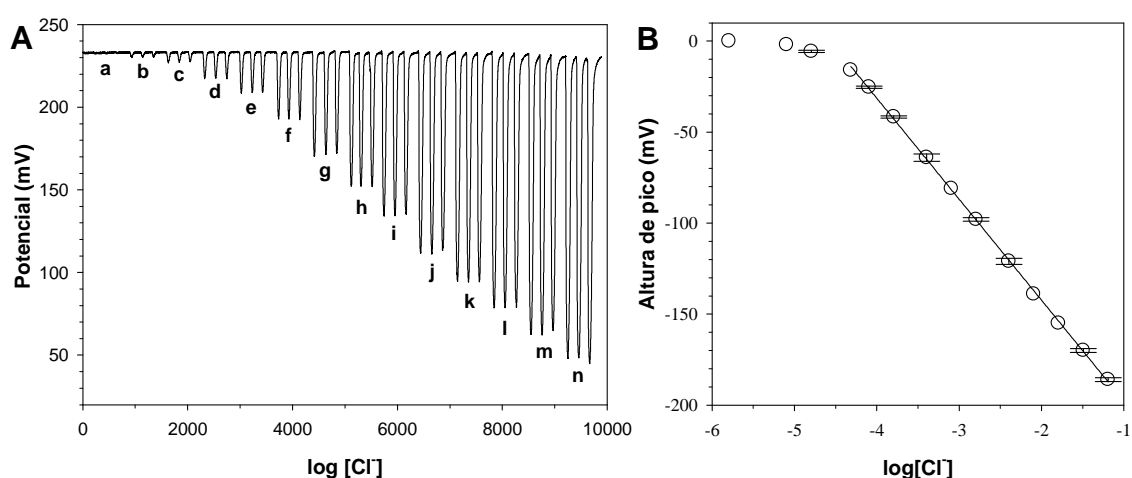


Figura 4.23. **A)** Registro de la señal obtenida durante el calibrado de uno de los electrodos selectivos de cloruro desarrollados usando disoluciones estándar de Cl⁻ (NaCl) de 0.06 mg L⁻¹ (a), 0.3 mg L⁻¹ (b), 0.6 mg L⁻¹ (c), 2 mg L⁻¹ (d), 3 mg L⁻¹ (e), 6 mg L⁻¹ (f), 14 mg L⁻¹ (g), 29 mg L⁻¹ (h), 57 mg L⁻¹ (i), 143 mg L⁻¹ (j), 286 mg L⁻¹ (k), 572 mg L⁻¹ (l), 1144 mg L⁻¹ (m) y 2287 mg L⁻¹ (n). **B)** Curva de calibración.

4.2.3.2. Optimización del proceso de deposición de membrana

Como se apuntaba en el apartado §4.1.3.3, el protocolo de deposición de membrana establecido debe ser reajustado cada vez que se cambie el tamaño de la cámara de detección. En este caso, no solo se cambió el tamaño de la cámara en sí, sino que también se cambiaron las dimensiones de los canales de entrada y salida de esta. Por este motivo, tomando como partida los valores de volumen depositado y tiempo entre deposiciones, optimizados previamente, se estableció un nuevo protocolo adaptado a cámaras de detección más pequeñas. Este consistió en realizar deposiciones de 2 μL del cóctel sensor preparado disolviendo los componentes en 3 mL de THF. La dosificación se realizó mediante micropipeta y dejando evaporar al aire durante 5 minutos entre deposiciones. En este caso, se observó que no hacía falta aplicar vacío para conseguir los mismos resultados. Prescindiendo de esta etapa, se ahorró un tiempo considerable en el proceso de fabricación de los microsistemas. El volumen total depositado fue de 40 μL.

4.2.3.3. Evaluación de variables químicas e hidrodinámicas

Con el microsistema estructuralmente optimizado y habiendo verificado también que la composición de disolución acondicionadora usada en el dispositivo biparamétrico (Na_2SO_4 0.05 M a pH 3) era adecuada para el microsistema triparamétrico, se procedió a evaluar, mediante un proceso de optimización univariante, los parámetros hidrodinámicos del sistema analítico. El objetivo era llegar a un compromiso entre un adecuado rango de trabajo lineal de los ESIs, una buena sensibilidad de las medidas analíticas, una buena estabilidad de la línea base, un bajo consumo de reactivos y una adecuada frecuencia de análisis. Este proceso de optimización se llevó a cabo con un montaje experimental como el mostrado en la figura 4.3, compuesto por bombas peristálticas y válvulas de inyección manual convencionales, en lugar de usar el montaje experimental automatizado (Figura 4.17). Este último se utilizará tras optimizar todos los parámetros.

Así, el volumen de inyección de la muestra fue testado entre 25 y 580 μL , fijando arbitrariamente un caudal para los canales de las disoluciones portadora (donde se inyectan las disoluciones estándar o la muestra) y acondicionadora de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$.

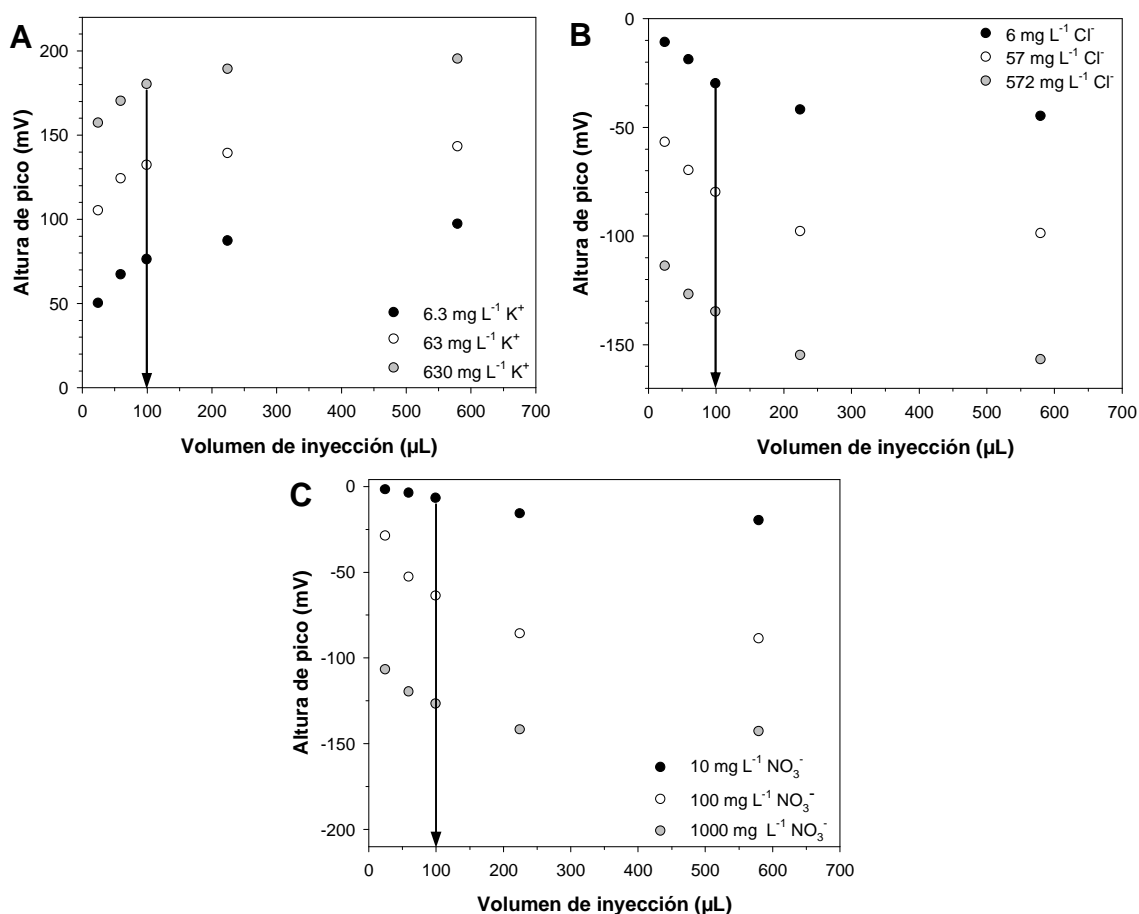


Figura 4.24. Resultados de la optimización del volumen de inyección para el electrodo selectivo de potasio (A), cloruro (B) y nitrato (C).

Los resultados mostraron que volúmenes de inyección bajos disminuían la altura de pico y aumentaban el LD, mientras que volúmenes de inyección muy altos apenas mejoraban las características analíticas de los ESIs pero aumentaban considerablemente el tiempo de análisis y por ende el consumo de reactivos. Para consumir menos muestra y reactivos manteniendo unas alturas de pico aceptables, se escogió un volumen de inyección de 100 μL .

Por su parte, el caudal del canal de las disoluciones portadora y acondicionadora fue testado entre 200 y 1000 $\mu\text{L min}^{-1}$ (manteniéndose siempre a 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ el de la disolución auxiliar de 0.1 M KCl). En esta experiencia el volumen de inyección se fijó en 100 μL .

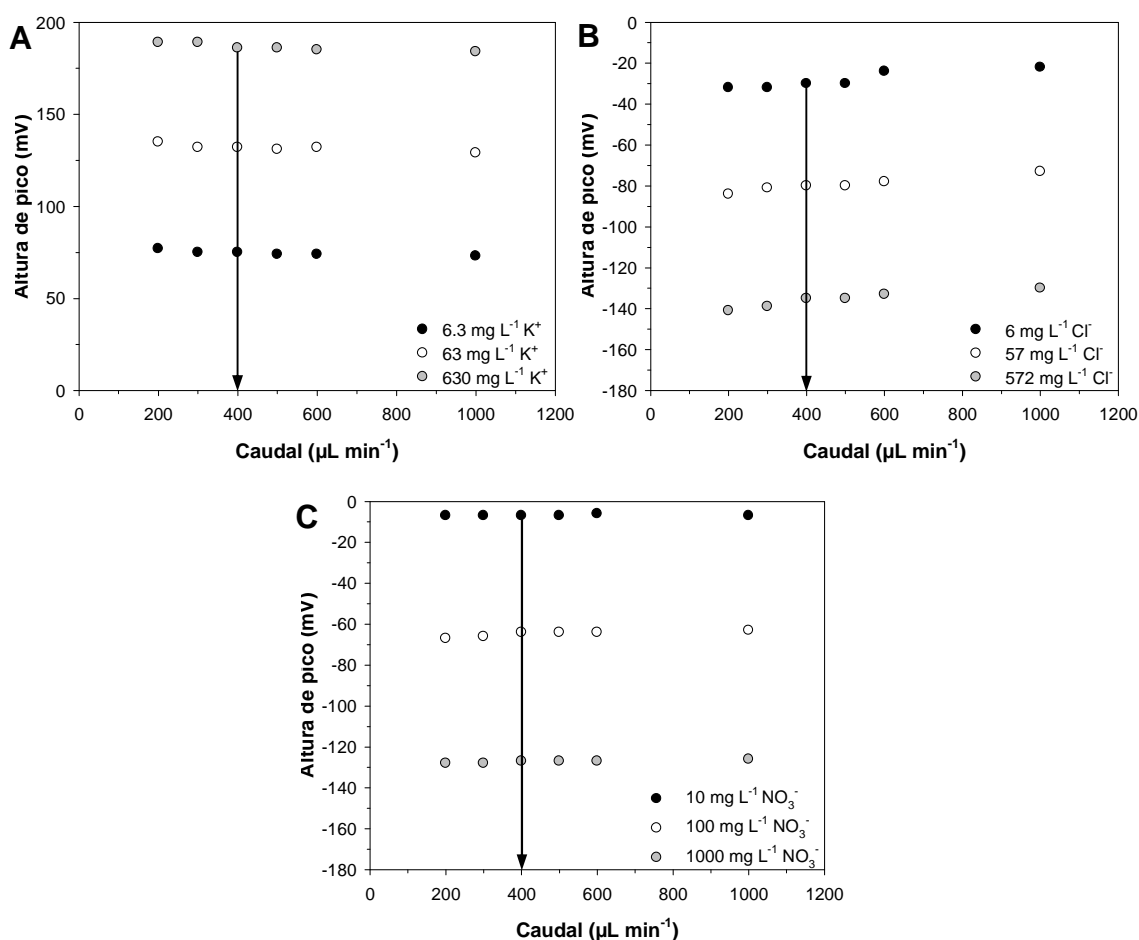


Figura 4.25. Resultados de la optimización del caudal para el electrodo selectivo de potasio (A), cloruro (B) y nitrato (C).

Atendiendo a los resultados obtenidos (Figura 4.25), no se apreciaron diferencias significativas en cuanto a altura de pico y sensibilidades a diferentes caudales. La diferencia radicó en que a caudales bajos el tiempo de análisis era realmente muy alto, mientras que a caudales elevados, concentraciones muy bajas de los analitos podían ser difíciles de determinar, debido al poco tiempo de residencia del analito

en la cámara de detección, y el consumo de reactivo se incrementaba. Por lo argumentado, se escogió un caudal de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$ tanto para el canal de la disolución portadora como para el de la acondicionadora. Con estas optimizaciones se consiguieron reducir considerablemente el caudal y el volumen de inyección con respecto al microsistema antecesor, logrando adecuarse más a los requerimientos marcados por la ESA. Sin embargo, como se puede observar, estas variables hidrodinámicas pueden ser adaptadas en función de nuevas necesidades o requerimientos puntuales sin verse comprometida la robustez del microsistema.

Una vez optimizado todo el sistema se procedió a evaluar el efecto de los posibles iones interferentes, de forma análoga a como se realizó para el microsistema biparamétrico (§4.1.3.4.). No se evaluó la influencia de potenciales compuestos interferentes sobre el electrodo de cloruro (básicamente I⁻, Br⁻ y CN⁻)⁵² ya que no se espera la presencia significativa de estos en las muestras de agua a analizar.

Tabla 4.5. Coeficientes de selectividad potenciométricos calculados, $\log K_{i,j}^{\text{pot}}$, para los electrodos selectivos de K⁺ y NO₃⁻ usando el método de interferencia fija.

| Interferente (j) para el electrodo selectivo de K ⁺ | $\log K_{i,j}^{\text{pot}}$ | Interferente (j) para el electrodo selectivo de NO ₃ ⁻ | $\log K_{i,j}^{\text{pot}}$ |
|--|-----------------------------|--|-----------------------------|
| Na ⁺ | -3.50 | HCO ₃ ⁻ | -2.22 |
| NH ₄ ⁺ | -1.24 | Cl ⁻ | -1.59 |
| Ca ²⁺ | -3.95 | | |
| Mg ²⁺ | -3.92 | | |

Los coeficientes de selectividad potenciométricos ($K_{i,j}^{\text{pot}}$) obtenidos (Tabla 4.5) fueron similares, como era de esperar, a los calculados para el microsistema biparamétrico. Como ya se discutió en aquella ocasión, el único ión potencialmente interferente del sistema analítico es el cloruro, incrementado la señal del electrodo selectivo de nitrato, ya que en las muestras de agua a analizar se presenta en concentraciones elevadas, a diferencia de lo que ocurre con el ión NH₄⁺, y no puede ser eliminado de la matriz, mediante cambio de pH o enmascarándolo (sin provocar la aparición de precipitado), como ocurre con el ión HCO₃⁻. Sin embargo, la integración del electrodo selectivo de cloruro y la información que proporciona, permite eliminar esta interferencia, además de conocer la concentración de Cl⁻, mediante la aplicación de la siguiente expresión matemática derivada de la ecuación de Nikolskii-Eisenman:^{23,31,52}

$$E = a + b \log \{[\text{NO}_3^-] + K_{i,j}^{\text{pot}} [\text{Cl}^-]\} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Como se puede apreciar, esta expresión incluye dentro del término de concentración aparente de nitrato, la concentración real de nitrato más el término que tiene en cuenta el efecto interferente del ión cloruro (o de cualquier otro compuesto interferente). De esta manera, conociendo $K_{i,j}^{\text{pot}}$ y la concentración de

ión cloruro en la muestra, es posible calcular la concentración de nitrato. Sin embargo, como el valor de $K_{i,j}^{\text{pot}}$ no es una constante termodinámica, sino que depende de las condiciones de trabajo como, por ejemplo, la concentración del ión interferente usada para calcular su valor o el estado en el que se encuentra la membrana sensora, siempre se cometerá un pequeño error al asumir este coeficiente como una constante. En el caso de este trabajo, la concentración que se usó para calcular el coeficiente de selectividad fue de 350 mg L^{-1} de Cl^- (0.01 M), del orden de las esperadas en las distintas muestras de agua a analizar según los requerimientos de la ESA (Tabla 4.1). En este sentido, el valor promedio de coeficiente de selectividad potenciométrico obtenido después de tres experimentos ($n = 3$, 95 % confianza) fue 0.026 ± 0.003 . De esta manera, la expresión matemática para determinar la concentración de nitrato, tomó la siguiente forma:

$$E = a + b \log \{[\text{NO}_3^-] + 0.026 (\pm 0.003) [\text{Cl}^-]\} \quad (\text{Ecuación 4. 2})$$

4.2.4. Sistema de flujo automatizado

Con la finalidad de miniaturizar y automatizar el montaje experimental para reducir el consumo de reactivos y muestra, se implementó un sistema híbrido que combina diferentes microbombas y microválvulas solenoides y una microbomba peristáltica, gestionadas mediante un controlador (FlowTest™). De esta manera, se pudo programar una secuencia de dilución por multiconmutación que permitió obtener, en línea, todas las disoluciones estándar necesarias para realizar un proceso de autocalibración. Para ello se partió de una única disolución madre concentrada que contenía los tres analitos a determinar. Además, la automatización de todo el proceso de análisis evitó la necesidad de disponer de un operario para preparar las disoluciones o accionar el sistema de inyección, aumentando así su autonomía, tan necesaria en la aplicación final.

Inicialmente, debido a su sencillez, se decidió escoger un sistema multibomba basado, únicamente, en microbombas solenoides en combinación con microválvulas solenoides, para llevar a cabo tanto el proceso de dilución por multiconmutación como el de gestión de fluidos en general. Sin embargo, el hecho de generar un flujo pulsante no hace a las microbombas solenoides buenas candidatas para ser usadas en secuencias estrictas de dilución, donde la estabilidad del caudal es determinante en la repetitividad de la dilución conseguida. Por este motivo se decidió utilizar una microbomba peristáltica que proporciona un caudal más continuo y uniforme en el canal donde se llevan a cabo las diluciones por multiconmutación.

Una vez seleccionado el sistema de gestión de fluidos miniaturizado a utilizar (Figura 4.17), se procedió a verificar si la implementación del subsistema de autocalibración era realmente efectiva. La premisa de este subsistema fue la de usar únicamente una disolución estándar madre que contuviera todos los analitos a

determinar (potasio, cloruro y nitrato). Teniendo presente que el cloruro es un interferente de la respuesta del electrodo selectivo de nitrato, al calibrar el sistema con disoluciones estándar con concentraciones de todos los analitos en el mismo orden de magnitud podrían introducirse pequeños errores en las medidas. A pesar de que si se tienen en cuenta los valores de $K_{i,j}^{pot}$ obtenidos, una relación de analito-interferente 1:1 no debería provocar una alteración significativa de la señal, se decidió verificarlo experimentalmente. Para ello, se realizaron dos calibrados con el electrodo selectivo de nitrato, usando disoluciones estándar de nitrato preparadas manualmente, por dilución sucesiva, sin cloruro y con cloruro, teniendo estas últimas la misma concentración de NO_3^- y Cl^- . El montaje experimental usado para esta experiencia fue el mismo que el usado durante el proceso de optimización de las variables hidrodinámicas (§4.2.3.3.). La figura 4.26 muestra como, efectivamente, no hubo diferencias significativas en términos de alturas de pico o de respuesta del ESI entre ambos calibrados. El Na^+ sería también un ligero interferente del electrodo selectivo de K^+ , pero el cálculo del coeficiente de selectividad dejó claro que para una relación molar (1:1), no existe tal interferencia. Por todo esto, quedó verificado que se pueden usar disoluciones estándar mixtas para realizar el proceso de autocalibrado.

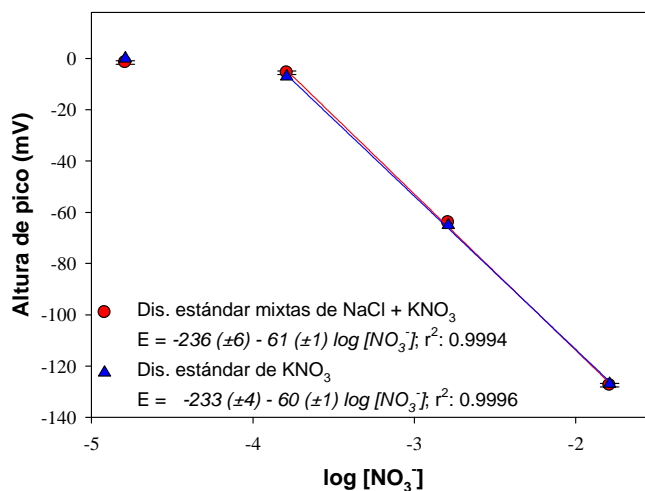


Figura 4.26. Curvas de calibrado por triplicado ($n = 3$, 95 % confianza) del sensor de nitrato usando disoluciones estándar con o sin cloruro.

A partir de los resultados obtenidos, la disolución madre concentrada fue preparada conteniendo $630 \text{ mg L}^{-1} K^+$, $657 \text{ mg L}^{-1} Na^+$, $1000 \text{ mg L}^{-1} Cl^-$ y $1000 \text{ mg L}^{-1} NO_3^-$. Se fijó esta composición teniendo en cuenta que el valor de concentración más alto permitido por la ESA es de $1000 \text{ mg L}^{-1} Cl^-$ y que hay que respetar una relación analito-interferente 1:1 en cada disolución estándar. Estos valores de concentraciones fueron los que determinaron los LSRL para cada ESI. El LIRL, sin embargo, dependió de la disolución estándar más diluida que fuera capaz de preparar el subsistema de multiconmutación con la precisión requerida y de las características de respuesta intrínsecas de cada ESI.

Diferentes parámetros instrumentales, como el tiempo de inyección (que a un caudal fijo determina el volumen de inyección) y el mínimo tiempo de actuación de la microválvula, deben ser tenidos en cuenta a la hora de configurar la secuencia de dilución del proceso de autocalibración por multiconmutación. La precisión de la dilución vendrá determinada entonces por la precisión de la microválvula en la conmutación (paso de “on” a “off” y viceversa) y por la estabilidad del caudal proporcionado por la microbomba (por este motivo se eligió una microbomba peristáltica en lugar de solenoide). En este sentido, la mayor velocidad de conmutación posible de la válvula, fijada en sus especificaciones y verificada en distintos trabajos, es de 100 ms.^{53,54}

En sistemas de multiconmutación, la inyección de la muestra se hace por tiempo y no por volumen. Esto quiere decir que el volumen inyectado de disolución estándar o muestra no viene definido por un bucle de tubo cilíndrico de longitud determinada ($VI = L \cdot \pi \cdot r^2$), sino por el tiempo que fluye la disolución a un caudal determinado ($VI = Q \cdot t$). Con la finalidad de facilitar las secuencias de dilución para poder trabajar con números múltiplos de 0.1 s (el tiempo de actuación de la válvula) y poder tener un rango lineal adecuado para cubrir todas las concentraciones requeridas por la ESA de los iones a analizar, se tomaron los valores previamente optimizados de volumen de inyección y de caudal y se adaptaron al sistema de multiconmutación. De esta manera, se usó un caudal de $350 \mu\text{L min}^{-1}$ (en lugar de $400 \mu\text{L min}^{-1}$) y un volumen de inyección de $117 \mu\text{L}$ (en lugar de $100 \mu\text{L}$). Estos últimos cambios vinieron determinados por haber escogido 20 s de tiempo de inyección. En la tabla 4.6 se pueden observar las diferentes disoluciones estándar utilizadas y el proceso de dilución para generarlas.

Tabla 4.6. Secuencias de dilución por multiconmutación para generar las disoluciones estándar a partir de la disolución madre de $630 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ and $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$.

| Disolución estándar (mg L^{-1}) | | | Tiempo de inyección (s) | Tiempo “on” (dis. madre) (s) | Tiempo “off” (agua) (s) | Ciclos | Factor dilución |
|--|---------------|-----------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|--------|-----------------|
| K^+ | Cl^- | NO_3^- | | | | | |
| 3.2 | 5 | 5 | 20 | 0.1 | 19.9 | 1 | 200 |
| 6.3 | 10 | 10 | 20 | 0.1 | 9.9 | 2 | 100 |
| 12.6 | 20 | 20 | 20 | 0.1 | 4.9 | 4 | 50 |
| 31.5 | 50 | 50 | 20 | 0.1 | 1.9 | 10 | 20 |
| 63 | 100 | 100 | 20 | 0.1 | 0.9 | 20 | 10 |
| 126 | 200 | 200 | 20 | 0.1 | 0.4 | 40 | 5 |
| 315 | 500 | 500 | 20 | 0.1 | 0.1 | 100 | 2 |
| 630 | 1000 | 1000 | 20 | 20 | 0 | 1 | 0 |

Como se puede observar, el rango de concentraciones de las disoluciones estándar preparadas fue desde $630 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ y $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ (para el caso en el que durante los 20 s del tiempo de inyección se inyecta solamente la disolución madre concentrada, sin haber dilución alguna), hasta $3.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, 5

mg L⁻¹ Cl⁻ y 5 mg L⁻¹ NO₃⁻ (para el caso en el que la disolución madre se inyecta únicamente 0.1 s y los 19.9 s restantes se inyecta agua). Como se puede observar, con los parámetros seleccionados se pudieron alcanzar diluciones de hasta 200 veces la concentración inicial. Sin embargo, como se demostrará más adelante en estudios de repetitividad (§4.2.5), no se pudo obtener una buena precisión en diluciones extremas. Probablemente, esto fuera debido, al menos en parte, a problemas de mezcla provocados por la naturaleza intrínseca del proceso de segmentación utilizado como método de dilución.

El sistema de gestión de fluidos implementado no solo consistió en el subsistema de dilución por multiconmutación. La figura 4.27 muestra, a modo de ejemplo, la secuencia de funcionamiento de cada uno de los actuadores fluidicos (microbombas o microválvulas) en diferentes etapas. Así, el **paso 1** corresponde al llenado de la disolución madre hasta V₁, el **paso 2** al llenado de H₂O hasta V₂, el **paso 3** al llenado de la muestra hasta V₂ y el **paso 4** al llenado de H₂O hasta V₃. Para llenar el microsistema con la disolución acondicionadora, portadora y auxiliar, para estabilizar la línea base, se realiza el **paso 5**. Para inyectar una disolución estándar 100 veces más diluida que la madre, se realiza la siguiente secuencia de dilución (**paso 6**): dos ciclos de 0.1 s de disolución madre y 9.9 s de agua en 20 s de VI). Para inyectar la disolución estándar más concentrada, se inyecta la madre durante los 20 s sin ninguna dilución (**paso 7**). En el **paso 8**, se inyecta la muestra.

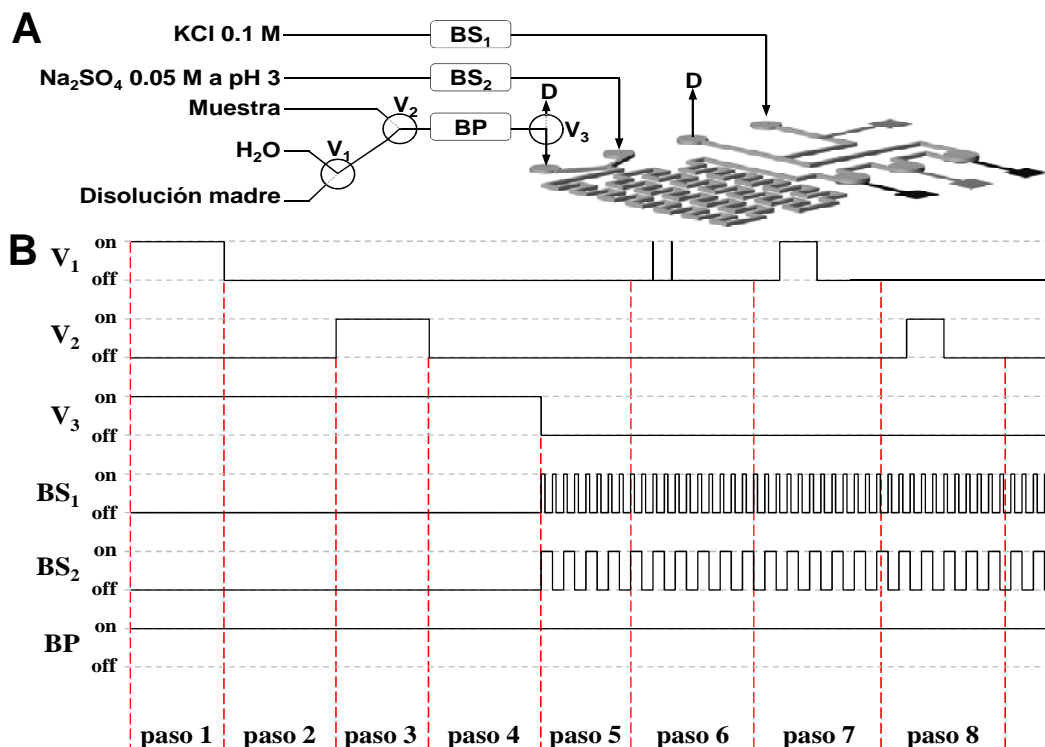


Figura 4.27. A) Esquema del montaje experimental (Figura 4.17), repetido para mejorar la comprensión de la explicación: (D) desecho. B) Secuencia esquemática de cada elemento fluidico: (on) 12 V son aplicados al elemento para accionarlo; (off) 0 V son aplicados al elemento para desactivarlo; (V_x) microválvula solenoide de 3 vías; (BS_x) microbomba solenoide; (BP) microbomba peristáltica. Tener presente que la duración de cada paso no es necesariamente la misma.

Finalmente, para verificar que el sistema automático de dilución por multiconmutación funcionaba correctamente y generaba las disoluciones con la concentración deseada, se realizó una comparación entre la inyección de una disolución estándar de $63 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ y $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$, preparada manualmente, y otra obtenida automáticamente. Los resultados (Figura 4.28) mostraron que no había diferencias significativas entre las señales obtenidas para ambas disoluciones, siendo estas diferencias inferiores al 2 %. Así, se corroboró el buen funcionamiento de todo el montaje experimental miniaturizado integrado alrededor del microsistema desarrollado.

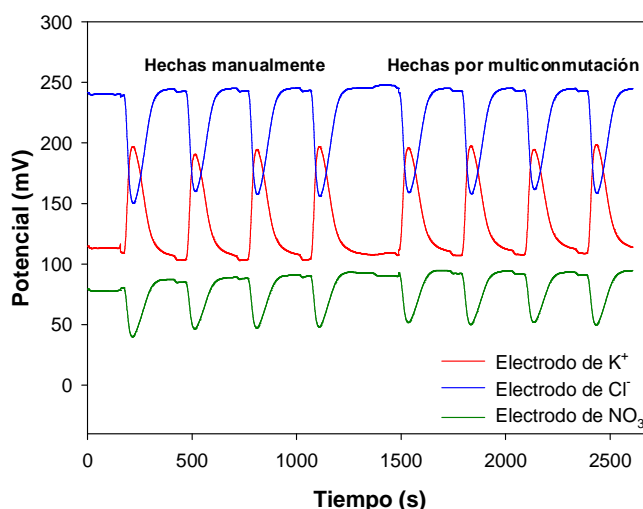


Figura 4.28. Comparación entre disoluciones estándar hechas manualmente y disoluciones estándar hechas automáticamente mediante una secuencia de dilución por multiconmutación.

4.2.5. Características analíticas del sistema

Se determinaron las características analíticas del microsistema propuesto mediante calibrados sucesivos usando disoluciones estándar obtenidas en línea, mediante la secuencia de dilución automática por multiconmutación, a partir de una disolución madre de $630 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ y $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$. La figura 4.29 muestra, para uno de los calibrados, el registro de la señal y su correspondiente curva de calibración para cada uno de los ESI. Las ecuaciones de Nernst obtenidas (a partir de 3 calibrados obtenidos en tres días consecutivos, por triplicado cada punto) fueron $E = 275 (\pm 2) + 56 (\pm 1) \log [\text{K}^+]$ con $r^2=0.9991$, $E = -227 (\pm 2) - 56 (\pm 1) \log [\text{Cl}^-]$ con $r^2=0.9990$ y $E = -251.0 (\pm 3) - 59 (\pm 1) \log \{[\text{NO}_3^-] + 0.026 (\pm 0.003) [\text{Cl}^-]\}$ con $r^2=0.9990$. Los rangos de trabajo fueron de 6.3 a 630 mg L^{-1} , de 10 a 1000 mg L^{-1} y de 10 a 1000 mg L^{-1} para los electrodos selectivos de potasio, cloruro y nitrato, respectivamente. Hay que tener presente que estos rangos de trabajo obtenidos estaban limitados por el proceso de dilución por multiconmutación utilizado y no por la respuesta de los electrodos en sí. Si los electrodos se calibraban con disoluciones estándar mixtas de K^+ , Cl^- y NO_3^-

preparadas manualmente, los rangos lineales de trabajo se incrementaban siendo de 1 a 5000 mg L⁻¹, de 6 a 2300 mg L⁻¹ y de 10 a 4000 mg L⁻¹ para los electrodos selectivos de potasio, cloruro y nitrato, respectivamente, pudiendo llegar a

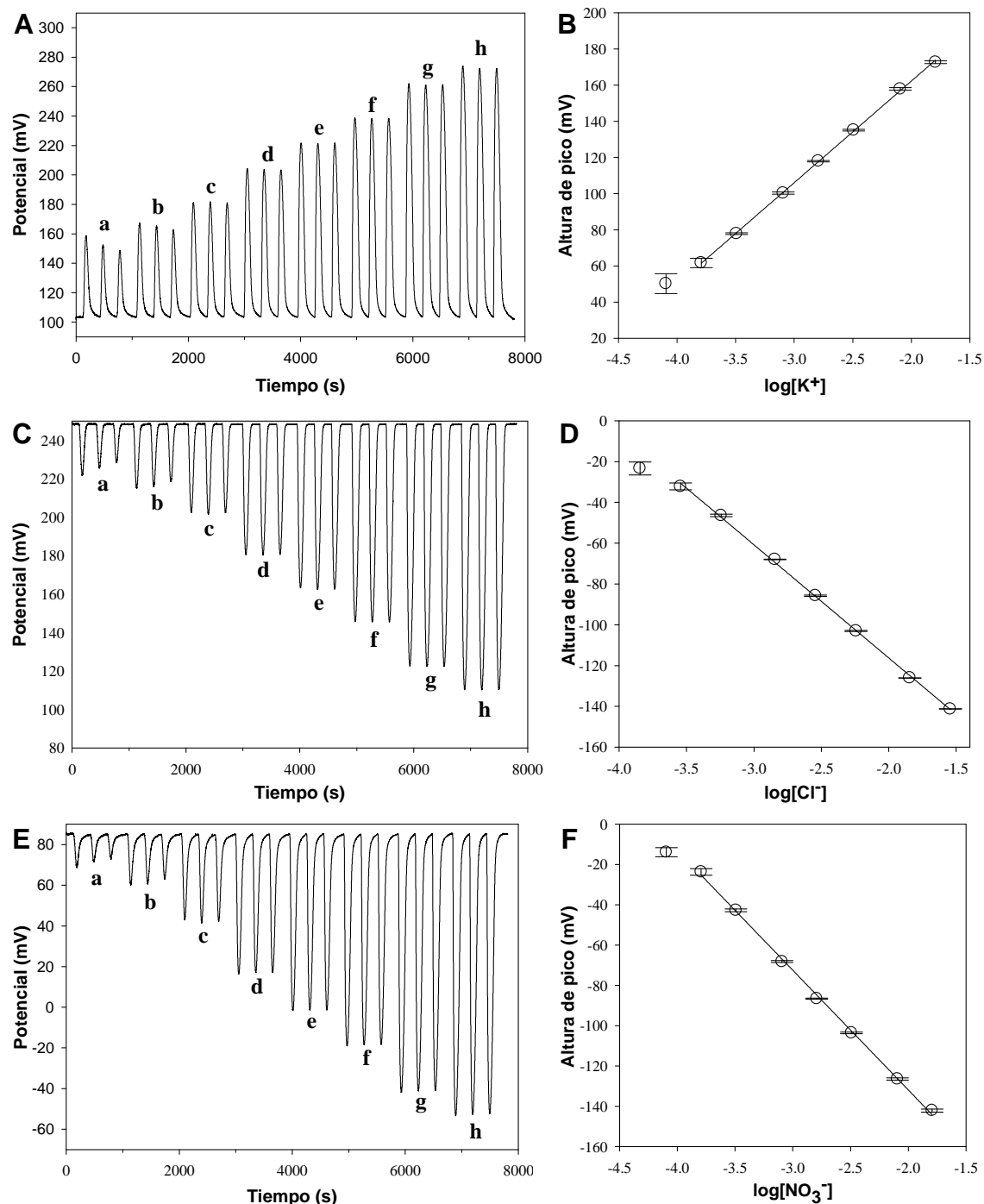


Figura 4.29. Registros de la señal y curvas de calibrado obtenidas por los ESI del microanalizador usando disoluciones estándar obtenidas mediante dilución por multiconmutación de la disolución madre mixta. (A y B) electrodo de potasio, disoluciones de K⁺ de 3.15 mg L⁻¹ (a), 6.3 mg L⁻¹ (b), 12.6 mg L⁻¹ (c), 31.5 mg L⁻¹ (d), 63 mg L⁻¹ (e), 126 mg L⁻¹ (f), 315 mg L⁻¹ (g) and 630 mg L⁻¹ (h). (C y D) electrodo de cloruro, disoluciones de Cl⁻ de 5 mg L⁻¹ (a), 10 mg L⁻¹ (b), 20 mg L⁻¹ (c), 50 mg L⁻¹ (d), 100 mg L⁻¹ (e), 200 mg L⁻¹ (f), 500 mg L⁻¹ (g) and 1000 mg L⁻¹ (h). (E y F) electrodo de nitrato, disoluciones de NO₃⁻ de 5 mg L⁻¹ (a), 10 mg L⁻¹ (b), 20 mg L⁻¹ (c), 50 mg L⁻¹ (d), 100 mg L⁻¹ (e), 200 mg L⁻¹ (f), 500 mg L⁻¹ (g) and 1000 mg L⁻¹ (h).

concentraciones más altas. En cuanto a los límites de detección ($n = 3$, 95 % confianza), de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC,³⁶ fueron $0.5 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ para potasio, $2.2 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ para cloruro y $3.0 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$ para nitrato. Todos los LIRL, y por supuesto los LD, se encontraron por debajo de las concentraciones máximas permitidas por los estándares de calidad de la ESA en aguas recicladas que, en el caso más restrictivo (agua de consumo), son de 12, 200 y 25 mg L^{-1} de ión potasio, cloruro y nitrato, respectivamente (Tabla 4.1).

La repetitividad del sistema fue estudiada (Figura 4.30), mediante sucesivas inyecciones ($n = 10$) de diferentes disoluciones estándar obtenidas por dilución mediante multiconmutación de la disolución madre, con el objetivo de encontrar el máximo de dilución que el microsistema podía alcanzar obteniendo valores de alturas de pico con coeficientes de variación inferiores al 5 %. Para ello se prepararon automáticamente y fueron analizadas una disolución estándar 50 veces más diluida que la inicial ($12.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ y $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$), una 100 veces más diluida que la inicial ($6.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ y $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$) y otra 200 veces más diluida que la inicial ($3.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ y $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$).

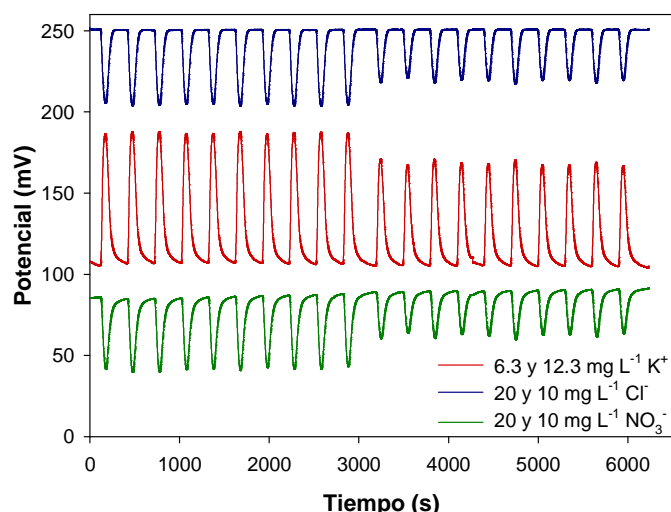


Figura 4.30. Registro de la señal de 10 inyecciones consecutivas de dos disoluciones estándar obtenidas por dilución automática (factor de dilución 50 y 100) de la disolución madre, preparadas con el objetivo de calcular la repetitividad del microsistema.

Los CV % de las alturas de pico fueron 6.0 % (3.2 mg L^{-1}), 2.5 % (6.3 mg L^{-1}) y 1.2 % (12.6 mg L^{-1}) para el electrodo selectivo de potasio, 13.8 % (5 mg L^{-1}), 3.8 % (10 mg L^{-1}) y 1.5 % (20 mg L^{-1}) para el electrodo selectivo de cloruro y 3.4 % (5 mg L^{-1}), 2.5 % (10 mg L^{-1}) y 1.4 % (20 mg L^{-1}) para el electrodo selectivo de nitrato. Dado que la repetitividad de las disoluciones estándar obtenidas diluyendo 200 veces la concentración inicial no fue muy buena, el LIRL para cada ESI se estableció a partir de la disolución estándar diluida 100 veces con respecto a la madre inicial, esto es a partir de $6.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ y $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$.

La reproducibilidad del microsistema fue, también, testada a partir de cinco calibrados realizados a lo largo de los primeros 10 días de vida del dispositivo analítico (Figura 4.31). Se obtuvieron sensibilidades promedio de 58, -56 y -61 mV déc.^{-1} con valores de CV de 4 %, 2 % y 3 % para el electrodo selectivo de potasio, cloruro y nitrato, respectivamente, demostrándose la reproducibilidad del sistema analítico completo.

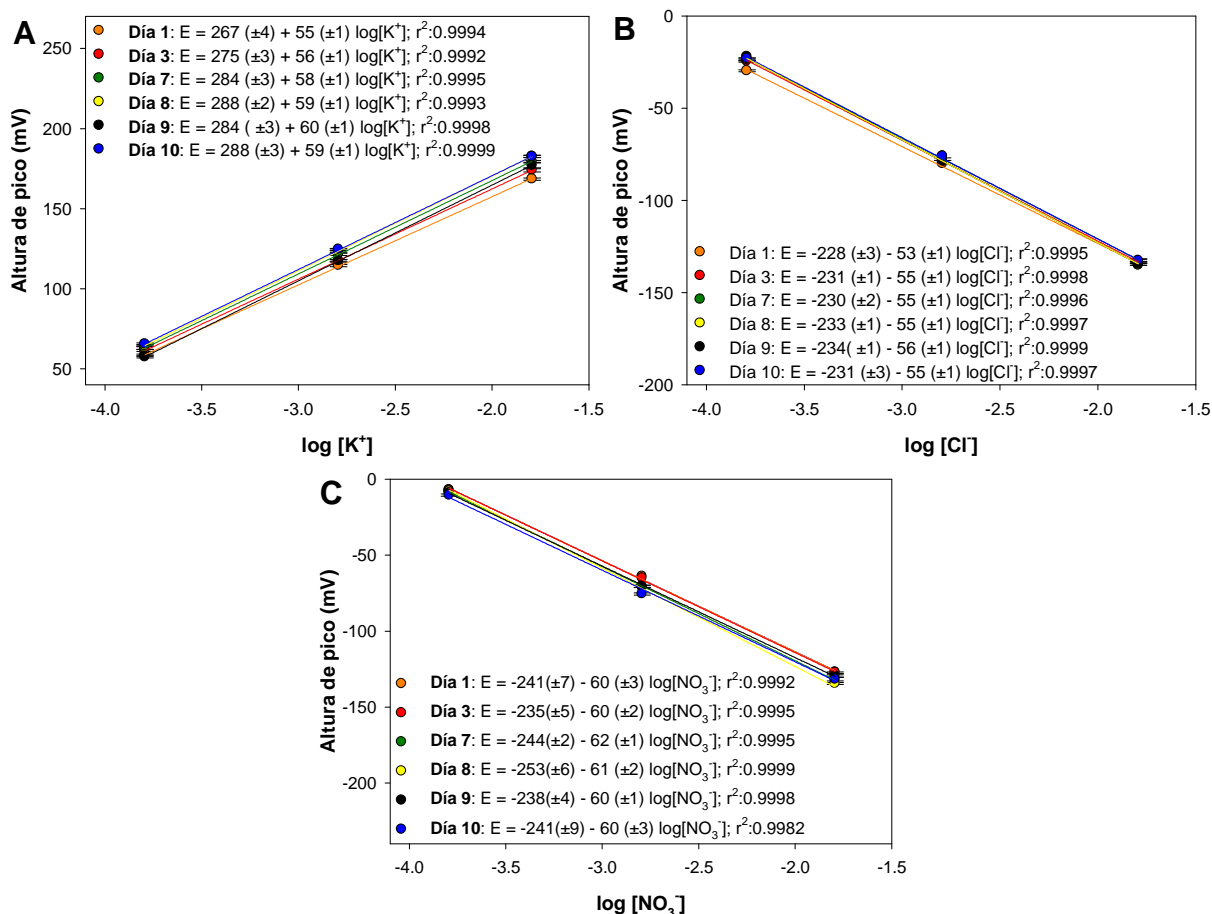


Figura 4.31. Curvas de calibración obtenidas a lo largo de 10 días para cada uno de los ESIs, (A) potasio, (B) cloruro, (C) nitrato, con el fin de calcular la reproducibilidad del microsistema.

Con la configuración del microsistema propuesta y una vez optimizados los parámetros químicos e hidrodinámicos, se consiguió una frecuencia de análisis de 12 muestras h^{-1} , con un consumo total de 1.8 ml de reactivos y muestra por análisis. El tiempo de vida útil del microanalizador fue, al menos, de 9 meses. Estos resultados mostraron la potencialidad y la robustez del microanalizador para ser usado en la aplicación para la que fue diseñado. Si fuera necesario, el consumo de muestra y reactivos se podría reducir hasta un 50 % suprimiendo el canal de KCl que fluye sobre el electrodo de referencia y reduciendo a la mitad los tamaños de las cámaras de detección de los ESIs. Pruebas previas realizadas introduciendo estas modificaciones han confirmado dichas previsiones y con ello el margen de mejora existente en relación a la reducción del consumo de reactivos y muestra.

4.2.6. Análisis de muestras sintéticas

Debido a dificultades logísticas, relacionadas con el procesado y envío de las muestras (solo disponibles al finalizar la campaña anual), en esta parte del trabajo no se pudieron analizar muestras reales de agua reciclada, procedente de la estación Concordia situada en la Antártida. En su defecto, se prepararon unas muestras sintéticas con una matriz lo más parecida posible a la de las muestras reales. Así, se prepararon muestras de concentraciones variables de K^+ , Cl^- y NO_3^- con la finalidad de explorar los límites del microsistema (especialmente cuando la concentración de Cl^- era mucho mayor que la de NO_3^-) mientras que se mantuvieron constantes los valores del resto de la matriz, que consistió en $0.7 \text{ mg L}^{-1} NH_4^+$, $0.8 \text{ mg L}^{-1} Na^+$ y $7 \text{ mg L}^{-1} SO_4^{2-}$. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Valores promedio de concentración en mg L^{-1} ($n = 3$, 95 %) del análisis de muestras de agua sintéticas usando el microsistema propuesto.

| Muestra | Potasio | | | Cloruro | | | Nitrato | | |
|---------|---------|------------------|--------------------|---------|-------------------|-------|---------|-------------------|-------|
| | Añadido | Encontrado | % Rec ¹ | Añadido | Encontrado | % Rec | Añadido | Encontrado | % Rec |
| 1 | 32 | 32.0 ± 1.0 | 100.1 | 14.3 | 14.5 ± 0.2 | 101.3 | 25 | 25.8 ± 0.9 | 103.1 |
| 2 | 6.3 | 6.5 ± 0.4 | 102.8 | 0* | - | - | 10 | 10.3 ± 0.5 | 103.4 |
| 3 | 32 | 32.3 ± 2.6 | 100.9 | 264 | 262.6 ± 2.9 | 99.4 | 25 | 24.4 ± 1.3 | 97.5 |
| 4 | 63 | 62.5 ± 1.1 | 99.2 | 28.6 | 28.5 ± 1.2 | 99.7 | 50 | 49.8 ± 2.3 | 99.6 |
| 5 | 10.2 | 10.3 ± 0.2 | 100.8 | 18.2 | 18.3 ± 0.5 | 100.7 | 13.3 | 13.5 ± 1.2 | 101.3 |
| 6 | 4* | - | - | 18.2 | 17.9 ± 0.4 | 98.1 | 2.9* | - | - |
| 7 | 7 | 6.9 ± 0.2 | 98.9 | 18.2 | 18.1 ± 0.8 | 99.5 | 7.8* | - | - |
| 8 | 9.6 | 9.5 ± 0.7 | 98.7 | 188.2 | 185.7 ± 3.1 | 98.7 | 11.8 | 11.5 ± 0.9 | 97.1 |
| 9 | 15.8 | 15.6 ± 0.5 | 98.8 | 100 | 97.5 ± 5.2 | 97.5 | 25 | 24.2 ± 1.2 | 96.9 |
| 10 | 12.6 | 12.1 ± 0.7 | 96.0 | 200 | 196.2 ± 6.6 | 98.1 | 20 | 19.6 ± 1.5 | 97.8 |
| 11 | 630 | 640.5 ± 11.4 | 101.7 | 1000 | 1012.0 ± 17.4 | 101.2 | 1000 | 1010.2 ± 18.4 | 101.0 |

¹ % recuperación. *Valores por debajo del rango lineal del electrodo bajo las optimizaciones fijadas

Como se puede observar, los resultados mostraron una buena correlación entre las concentraciones preparadas y las medidas para cada analito, presentando recuperaciones entre el 96.0 % y el 103.4 %. Esto corroboró la superación del efecto interferente del cloruro sobre el electrodo selectivo de nitrato.

A pesar de haber cuatro muestras con concentraciones por debajo del rango lineal de trabajo del correspondiente ESI (una para potasio, otra para cloruro y dos para nitrato), estas concentraciones estaban muy por debajo de los valores de concentración máxima permitidos por la ESA para cada uno de los analitos (recordemos $12 \text{ mg L}^{-1} K^+$, $200 \text{ mg L}^{-1} Cl^-$ y $25 \text{ mg L}^{-1} NO_3^-$), por lo que la potencialidad del microanalizador desarrollado quedó confirmada.

De esta manera queda confirmado que el microsistema analítico desarrollado permite la determinación simultánea de iones potasio, cloruro y nitrato en aguas recicladas, incluso cuando la concentración de cloruro es mucho más alta que la de nitrato.

4.2.7. Otras aplicaciones del microsistema

A modo de inciso y con la finalidad de mostrar la potencialidad y versatilidad del microsistema desarrollado, comentar brevemente que este fue aplicado, satisfactoriamente, en colaboración con Eva Arasa del GSB, al análisis de iones potasio, cloruro y nitrato en extractos acuosos de suelos. En concreto, su función fue verificar el buen funcionamiento de unas sondas de nutrición de suelos que se estaban desarrollando en el grupo de investigación con el objetivo de gestionar más eficientemente el proceso de fertilización en campos de cultivo. Puesto que el contenido de este trabajo no forma parte de la presente tesis, no se profundizará más en el tema.

4.2.8. Conclusiones

En esta parte de la tesis se ha diseñado, construido, caracterizado y aplicado un microanalizador potenciométrico construido con la tecnología de polímeros para la determinación simultánea de iones potasio, cloruro y nitrato. Este microsistema analítico mejora las prestaciones y las características del biparamétrico, previamente presentado, integrando la determinación adicional de ión cloruro y consiguiendo, gracias a ello, corregir matemáticamente su interferencia sobre el electrodo selectivo de nitrato. Además, se ha integrado un sistema miniaturizado y automático de gestión de fluidos, controlado por ordenador, que incorpora microbombas y microválvulas. También, ha sido demostrada la compatibilidad de la pasta de Ag/AgCl, desarrollada *ad hoc* para el sustrato polimérico usado (COC), verificándose su utilidad para la fabricación de electrodos de referencia de Ag/AgCl y electrodos indicadores de ión cloruro. Todas estas características y la optimización del diseño del microsistema han permitido la consecución de un microanalizador más pequeño y ligero con un sistema de gestión de fluido compacto, miniaturizado y completamente automatizado que permite reducir el consumo de muestra y reactivos y trabajar de forma autónoma, sin participación de los tripulantes, cumpliendo así los requisitos establecidos por la ESA para su uso en misiones espaciales tripuladas.

Así mismo, la configuración de la plataforma microfluídica desarrollada y el proceso de integración de los sensores potenciométricos es de aplicación general y permite la integración de membranas sensoras selectivas a un amplio abanico de parámetros.

4.3. Microsistema potenciométrico basado en la integración de una etapa de difusión gaseosa para la monitorización de ión amonio

El ión amonio es considerado por la ESA como uno de los parámetros indicadores clave para estimar el correcto funcionamiento del sistema de reciclado de agua. La importancia de este compuesto radica en que aparece como producto de la hidrólisis de la urea excretada por la orina de los tripulantes^{55,56} y a su vez es el precursor del proceso de nitrificación, convirtiéndose finalmente en nitrato mediante la acción de bacterias nitrificantes.¹⁰

Entre los numerosos sistemas reportados en la bibliografía para determinar amonio, aquellos que explotan la separación de este en forma de amoniaco, mediante su difusión a través de una membrana hidrófoba, son los que presentan una mayor selectividad. Entre todos estos sistemas, tanto si la detección es potenciométrica como si es óptica, la respuesta está exenta de los posibles compuestos interferentes que pudieran estar presentes en la matriz de la muestra.^{25,57-62} En estos trabajos se han usado membranas hidrófobas de materiales como politetrafluoroetileno (PTFE)^{57,58,62} o fluoruro de polivinilideno (PVDF).^{25,57,59-61} Sin embargo, las membranas de este último material son las que han demostrado una mayor resistencia mecánica y una mayor transferencia de analito.²⁵

Ya existen algunos sistemas de flujo en continuo para la determinación de amonio usando membranas de difusión de gas y detección potenciométrica.^{25,58,63-65} Sin embargo, estos montajes experimentales no cumplen con los requerimientos de la ESA en lo relativo a potencial de miniaturización y automatización. Cabe recordar que para la aplicación propuesta es necesario un elevado nivel de integración y robustez, un tamaño y peso de la instrumentación reducido y la posibilidad de monitorizar on-line la concentración de amonio en condiciones desatendidas. Con el objetivo de desarrollar un dispositivo que cumpliera estos requisitos, se decidió utilizar la tecnología de polímeros, usando COC como sustrato, ya que su proceso de fabricación permite, de un modo simple, la integración monolítica de membranas poliméricas de difusión gaseosa. En contraposición, la tecnología LTCC no permite dicha integración debido a la incompatibilidad de la naturaleza polimérica de la membrana de difusión gaseosa con las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de sinterizado final.²⁰

Por todo ello, el último microanalizador que se presenta dentro de este capítulo, dedicado al desarrollo de microsistemas para la monitorización de indicadores de calidad en procesos de reciclado de agua en misiones espaciales tripuladas, es un microanalizador potenciométrico robusto y altamente selectivo fabricado en COC para la determinación de ión amonio. El microsistema analítico integrará la

microfluídica, un módulo de difusión gaseosa y el sistema de detección en un único sustrato monolítico de tamaño comparable a una tarjeta de crédito. El módulo de difusión gaseosa estará compuesto por una membrana hidrófoba de PVDF. El sistema de detección potenciométrico estará basado en un electrodo selectivo de ión amonio de membrana polimérica y un electrodo de referencia de Ag/AgCl serigrafado. El prototipo será aplicado al análisis de muestras reales procedentes de la planta de tratamiento de agua de la estación de pruebas Concordia, ubicada en la Antártida. Además, su funcionamiento será testado en condiciones de microgravedad, obteniéndose en ambos casos resultados altamente prometedores.

4.3.1. Materiales y reactivos

El dispositivo fue fabricado usando placas y láminas de COC compradas a Topas Advanced Polymers (Florence, KY, EEUU) en diferentes grados y grosores: placas Topas 5013 de 1 mm de grosor y láminas Topas 8007 de 25 y 50 μm de grosor.

Se utilizó una membrana hidrófoba de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro (Millipore, EEUU) para separar el analito de la matriz de la muestra por difusión gaseosa.

El soporte conductor sólido del electrodo selectivo de ión amonio de membrana polimérica se preparó con la misma resina epoxi-grafito utilizada anteriormente (§4.1.1 y 4.2.1.), constituida por una mezcla al 50 % de grafito en polvo de 50 μm de tamaño de partícula (Merck, Alemania), 36 % de epoxi Araldite-M y 14 % de endurecedor HR (ambos de Ciba Geigy, España). Para este mismo uso se testó una nueva tinta conductora de grafito: Electrodag PF-407A (Acheson, Francia). Para fabricar el electrodo de referencia se usó la pasta de Ag/AgCl C2030812D3 (Gwent, Pontypool, Reino Unido), utilizada previamente (§4.2.1.).

Para la preparación de la membrana sensora de amonio se utilizó nonactina como elemento de reconocimiento, adipato de bis(1-butilpentilo) (BBPA) como plastificante, cloruro de polivinilo (PVC) como matriz polimérica y tetrahidrofurano (THF) como disolvente volátil. Todos los componentes para preparar la membrana sensora fueron adquiridos en Fluka (Barcelona, España).

Todos los reactivos usados para la optimización y la caracterización del microsistema fueron de calidad analítica o superior. El Tris-(hidroximetil) aminometano (Tris) fue adquirido en J.T. Baker (Holanda). El cloruro de amonio (NH_4Cl), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el rojo de fenol fueron comprados a Panreac (Barcelona, España). El hidróxido de sodio (NaOH) fue proporcionado por Fisher Chemical (Reino Unido). El cloruro de potasio (KCl) y el ácido clorhídrico al 36 % (H_2SO_4) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Barcelona, España).

La membrana polimérica selectiva de amonio fue preparada siguiendo una composición previamente optimizada,¹⁹ mediante pesada y mezcla de 1 % del elemento de reconocimiento, 65.5 % de plastificante BBPA, 33.5 % de PVC y 3 mL de THF.

Todas las disoluciones fueron preparadas usando agua doblemente destilada o Milli-Q. Las disoluciones estándar de NH_4^+ usadas para calibrar el microanalizador fueron preparadas por diluciones sucesivas de una disolución madre de 5000 mg L^{-1} NH_4^+ . Como disolución auxiliar para mantener el potencial del electrodo de referencia constante, se usó KCl 0.1 M. Como disolución básica se usó NaOH 0.1 M con EDTA 0.001 M. El EDTA se introdujo para evitar la precipitación, en el interior de los canales microfluídicos, de los hidróxidos formados a partir de los metales que pudiera contener la muestra, evitando así posibles obturaciones. Esta disolución básica, mezclada con la muestra/disolución estándar, constituyó la disolución donadora (de amoníaco). Como disolución acondicionadora aceptora, para mantener la fuerza iónica constante y reconvertir el amoníaco en amonio, se usó un tampón de Tris 0.01 M ajustado a pH 7.4 con HCl.

También, se preparó y utilizó una disolución de rojo de fenol 0.0023 M para llevar a cabo una serie de pruebas que requerían, durante el proceso de optimización, de la monitorización visual del desplazamiento de los líquidos a través de los microcanales del dispositivo analítico.

4.3.2. Montaje experimental

El montaje del sistema de flujo utilizado se puede observar en la figura 4.32. Este consistió en una bomba peristáltica externa de 4 canales Gilson Minipuls® 3 (Wisconsin, EEUU) equipada con tubos de Tygon® (Ismatec, Wertheim, Alemania) de 1.14 mm de diámetro interno y una válvula de inyección rotatoria de 6 vías (Hamilton MVP, Reno, US). Mediante tubos de Teflón de 0.8 mm de diámetro interno (Scharlab, S.L., Cambridge, Inglaterra) se conectó el microsistema a los diferentes elementos externos. La adquisición de la señal y su procesado se llevaron a cabo mediante un potenciómetro personalizado (TMI, Barcelona, España) y su propio software. Gracias a la interfaz gráfica de este, se pudo ver, en tiempo real, el registro por la pantalla de un PC.

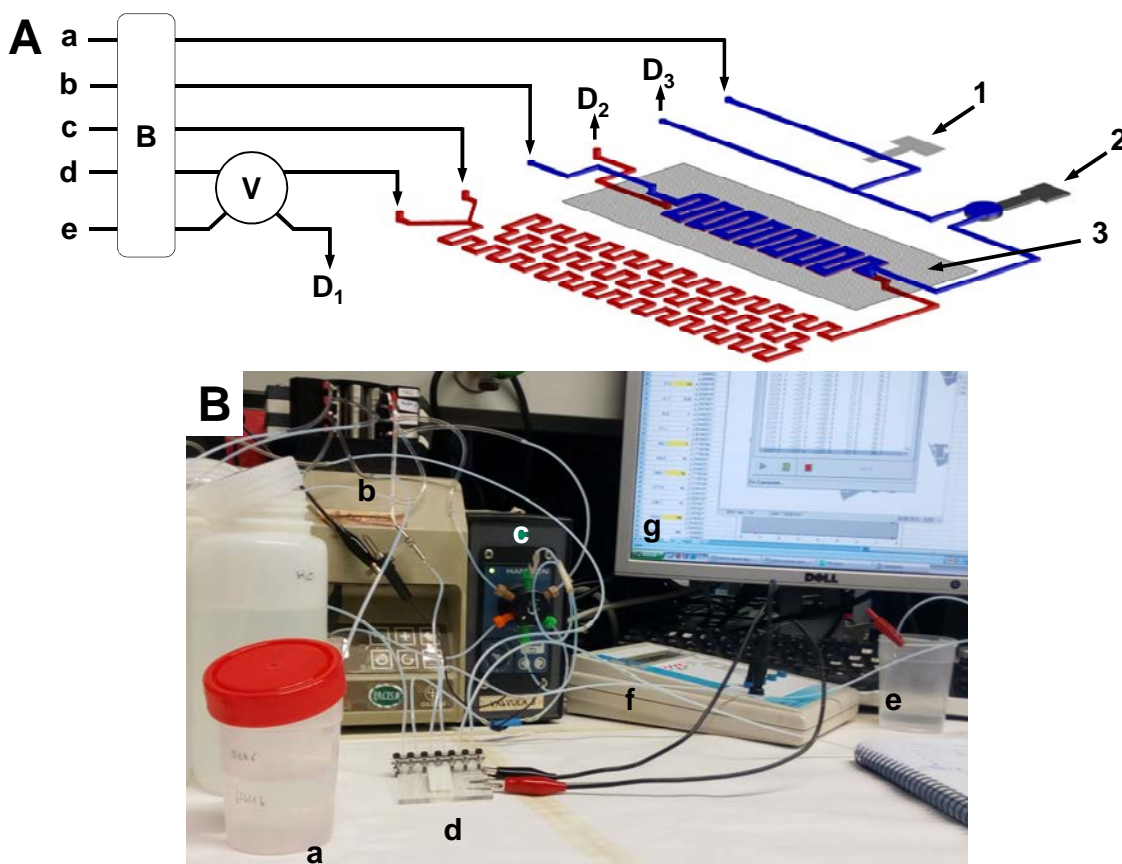


Figura 4.32. A) Diagrama esquemático de la plataforma microfluídica, del sistema de detección y del montaje experimental: (a) disolución auxiliar de KCl 0.1 M; (b) disolución acondicionadora aceptora de Tris 0.01 M a pH 7.4; (c) disolución de NaOH 0.1 M + EDTA 10^{-3} M; (d) H_2O como disolución portadora; (e) muestra/disolución estándar; (P) bomba peristáltica; (V) válvula de inyección rotatoria de seis vías; (D) desecho; (1) electrodo de referencia; (2) electrodo indicador; (3) Membrana de PVDF. Color rojo: microcanales bajo la membrana de PVDF. Color azul: microcanales por encima de la membrana de PVDF. B) Fotografía real del montaje experimental: (a) reactivos; (b) bomba peristáltica; (c) válvula de inyección rotatoria de seis vías; (d) microanalizador desarrollado; (e) desecho; (f) potenciómetro; (g) ordenador.

4.3.3. Diseño y optimización de la plataforma microfluídica

El microanalizador fue fabricado mediante la tecnología de polímeros, usando como sustrato COC. El diseño del microanalizador (Figura 4.33.A) estaba formado por cinco capas con motivos mecanizados: 4 placas de 1 mm de grosor (Topas 5013) (“a”, “c”, “g” e “i”) y otra de 50 μm de grosor (Topas 8007) “e” y 4 láminas de 25 μm (Topas 8007) previamente laminadas sobre cada capa de 1 mm, de manera que una vez superpuestas y laminadas, constituyeron la estructura en tres dimensiones deseada. Las dimensiones del microanalizador fueron 50.8 x 66.6 x 4.5 mm y su peso total fue de 14 g. El prototipo presentaba 4 entradas y 2 salidas de líquidos (Figura 4.32.A). Como se puede ver, a través de las dos primeras entradas se introducen en el microanalizador la disolución portadora (d), donde la muestra/disolución estándar (e) es inyectada, y la disolución básica de NaOH (c).

Aquí, ambas convergen en un punto de confluencia en forma de Y, dando lugar a la disolución donadora. Posteriormente, ambas disoluciones se mezclan a lo largo de un micromezclador en forma de serpentina, formándose, en el medio básico, amoníaco gas a partir del ión amonio presente en la muestra/disolución estándar. A continuación, la disolución donadora alcanza el módulo de difusión donde un canal en forma de serpentina permite al amoníaco difundir a través de la membrana de PVDF hacia la disolución aceptora. Finalmente, el resto de la disolución donadora se lleva al desecho (D_2). Por su parte, la disolución aceptora (b) de Tris 0.01 M a pH 7.4 recoge el amoníaco gas y lo convierte de nuevo en amonio. Esta disolución alcanza el detector, donde el analito es determinado, y finalmente es conducida al desecho (D_3). Con la finalidad de mantener en un valor constante el potencial del electrodo de referencia,¹⁹ se impulsa continuamente una disolución auxiliar de KCl 0.1 M a 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ a través de la cuarta entrada de líquidos del microsistema (a),

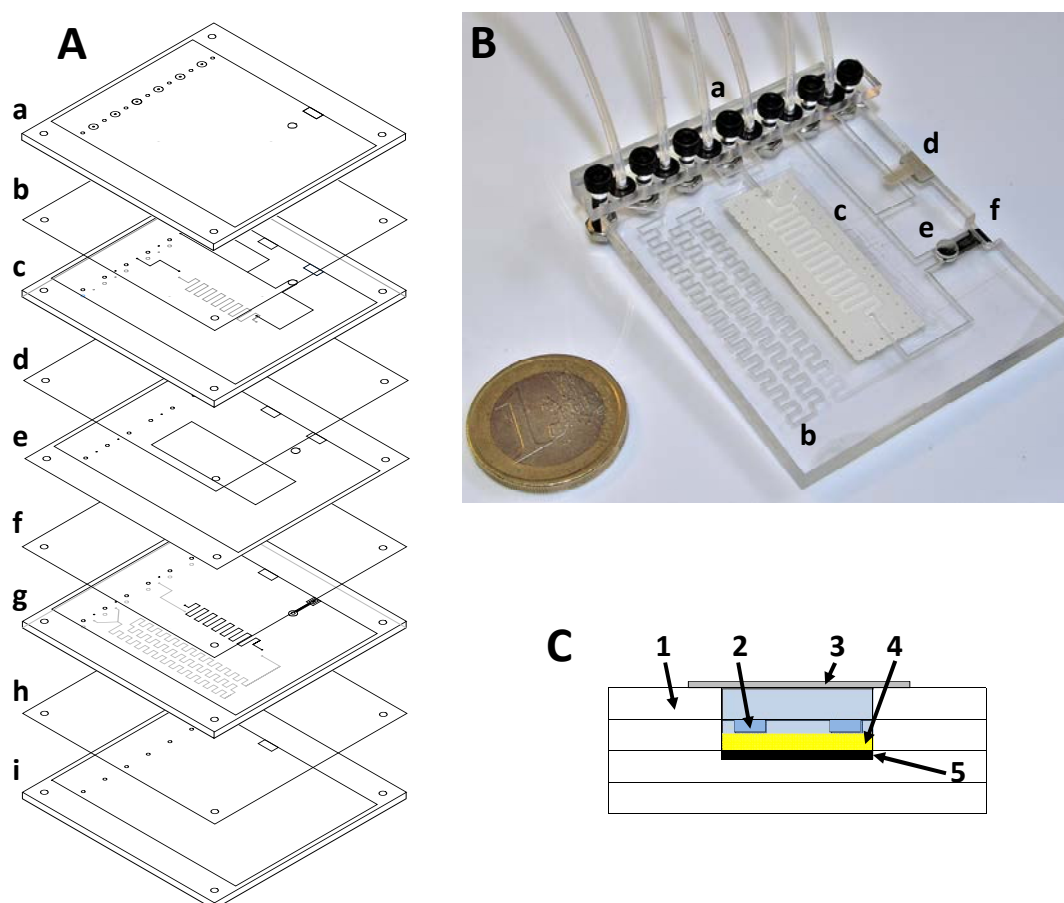


Figura 4.33. A) Diseño por capas del microsistema. Las capas “c” y “g” tienen motivos mecanizados en ambos lados por bajo-relieve, en la parte superior en color negro y en la parte inferior en color gris. B) Imagen del microsistema final: (a) conexiones fluídicas; (b) plataforma microfluídica; (c) membrana de PVDF; (d) electrodo de referencia; (e) cámara de detección; (f) electrodo indicador. C) Vista frontal del diagrama esquemático de la cámara de detección: (1) capas poliméricas; (2) canales de microfluídica; (3) film sellante; (4) membrana polimérica selectiva de ión amonio; (5) resina epoxi-grafito actuando como transductor.

fluyendo a lo largo del canal donde está serigrafiado el electrodo de referencia. Las dimensiones de los canales fueron de 0.4 mm de ancho por 0.3 mm de alto y el diámetro de la cámara de detección fue de 3.5 mm. Las dimensiones de los canales en forma de serpentin del módulo de difusión fueron de 1 mm de ancho por 0.1 mm de alto, con la finalidad de maximizar el área de contacto entre el gas generado y la membrana de difusión de PVDF. El volumen muerto de la cámara de detección y del microsistema total fue de 15 y 110 μL , respectivamente.

La resina de epoxi-grafito fue depositada, en la correspondiente cavidad mecanizada por bajo-relieve (Figura 4.33.C), y curada a 40 °C durante 24 h. Finalmente, su superficie fue pulida antes de la laminación final del dispositivo. Con posterioridad a esta, la membrana polimérica, selectiva a amonio, fue depositada gota a gota en el interior de la cavidad definida sobre el soporte conductor de epoxi-grafito y por debajo de los microcanales (Figura 4.33.C), siguiendo un procedimiento optimizado previamente (§4.2.3.2.).

Finalmente, los conectores fluidicos fueron fijados sobre las entradas/salidas del microanalizador mediante un soporte y tornillos (Figura 4.33.B).

Tomando la misma configuración circular de entrada de líquido en la cámara de detección y la misma pasta de Ag/AgCl optimizada en la sección anterior (§4.2.) actuando como electrodo de referencia, en esta parte del trabajo se procedió a optimizar el micromezclador, el módulo de difusión, el soporte conductor del ESI y las variables hidrodinámicas del sistema.

4.3.3.1. Diseño del micromezclador

Si en cualquier microsistema analítico, una mezcla adecuada de los reactivos es vital para conseguir una buena repetitividad y reproducibilidad en las medidas obtenidas, en este caso en concreto aún lo es más, para conseguir la conversión total del amonio presente en la muestra a amoníaco. Dado que el fenómeno de difusión en si no permite la transferencia del 100 % del amonio, si la mezcla no es buena y no se convierte el máximo de amonio posible, se estaría repercutiendo negativamente en las alturas de pico obtenidas y, por consiguiente, en el LD.

Para verificar la efectividad del micromezclador utilizado, diseñado atendiendo a la experiencia del GSB en este tipo de elementos microfluidicos, se realizó un experimento usando un indicador ácido-base (rojo de fenol) que a pH por debajo de 6.8 presenta un color amarillo, mientras que a pH superiores a 8.4 presenta un color violeta.⁶⁶ Utilizando el micromezclador que se muestra en la figura 4.34.A, se introdujo por una de las entradas una disolución de rojo de fenol 0.0023 M a pH 6 y por la otra una disolución de NaOH 0.0023 M. Mediante el seguimiento de la evaluación del color se pudo ver la dinámica resultante de la mezcla en el interior

del micromezclador. Si al final del proceso de mezcla, el color observado era un violeta homogéneo y constante, el mezclador tenía la longitud adecuada y realizaba correctamente su función. Cada disolución se impulsó a $400 \mu\text{L min}^{-1}$ utilizando una bomba peristáltica convencional.

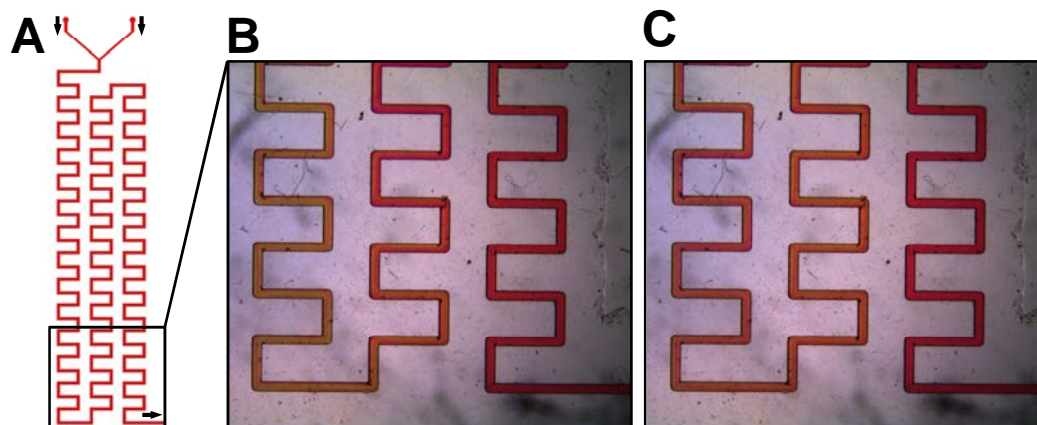


Figura 4.34. Detalle de la mezcla a lo largo del micromezclador en forma de serpentín. **A)** Diseño del micromezclador con la porción de imagen monitorizada. Flechas negras indican dirección de los líquidos. **B)** Momento (t_1) de la mezcla entre NaOH 0.0023 M y rojo de fenol 0.0023 M. **C)** Momento (t_2) de la mezcla.

Como se puede observar en dos momentos distintos del proceso de mezcla (Figura 4.34. B y C), a lo largo de la primera fila en forma de serpentín se observó alternativamente coloración más amarillenta y coloración más rosácea. Este hecho respondía al patrón pulsante de entrada de ambas disoluciones y a que la mezcla no se había realizado correctamente aún. Sin embargo, a medida que la mezcla iba avanzando a lo largo del micromezclador, se pudo apreciar como estas diferencias de coloración se iban atenuando hasta llegar al final del micromezclador, donde se pudo observar siempre una coloración violeta homogénea e invariable en el tiempo. Esto demostró la efectividad del micromezclador utilizado y, por este motivo, se escogió como mezclador óptimo para experimentos posteriores.

4.3.3.2. Configuración del módulo de difusión de gas

Otro de los elementos clave del microanalizador presentado, en esta sección, es el módulo de difusión gaseosa, que mediante una membrana permeable a gases permitirá separar el analito en forma de amoníaco gas de la matriz compleja de la muestra, eliminando así la mayor parte de las interferencias del ESI. Con la finalidad de alcanzar las mejores características analíticas del microanalizador, diferentes elementos del módulo de difusión fueron optimizados por completo.

En primer lugar se procedió a seleccionar la membrana de difusión propiamente dicha. Como se ha comentado anteriormente, existen distintos trabajos reportados en los que se usan membranas tanto de PTFE como de PVDF. Sin embargo, estas

últimas son las que demostraban una mayor resistencia mecánica y una mayor transferencia de analito.²⁵ Existe una amplia gama de membranas hidrófobas de PVDF, con distinto tamaño de poro, en el mercado. A mayor entramado polimérico, menor tamaño de poro y, por tanto, menor difusividad, pero a su vez, menor posibilidad de paso de líquidos al aplicar cierta presión perpendicularmente a la membrana. Teniendo esto en cuenta, se evaluaron tres membranas hidrófobas de PVDF de 125 μm de grosor de la casa comercial Merck Millipore, con tamaño de poro de 0.22, 0.45 y 1 μm (Figura 4.35), para determinar cuál de ellas proporcionaba mejores resultados en términos de difusividad y tiempo de vida útil de la membrana.

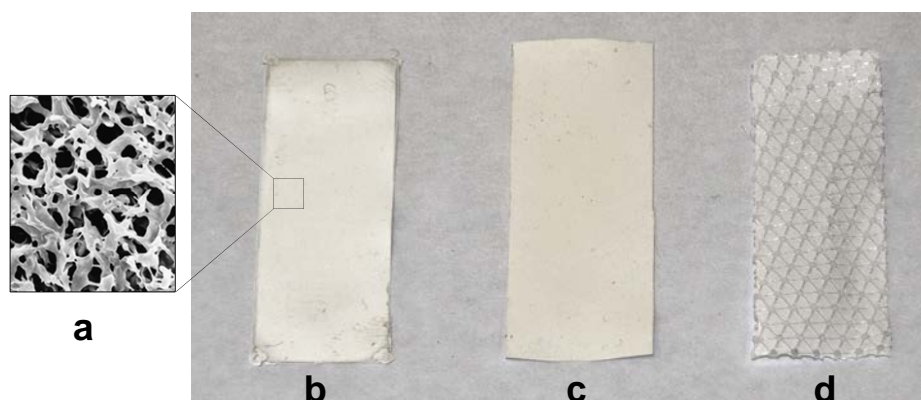


Figura 4.35. Diferentes membranas de PVDF testadas con: (b) 0.22 μm , (c) 0.45 μm y (d) 1 μm de tamaño de poro. En (a) podemos ver el detalle del entramado polimérico que define el tamaño de poro.

Para caracterizar las membranas en términos de durabilidad o tiempo de vida, se diseñó y fabricó un módulo de difusión intercambiable, en el que mediante tornillos se encapsulaba la membrana, con la finalidad de poder sustituirla fácilmente, simplificando la realización de las distintas pruebas sin tener que construir un módulo de difusión diferente cada vez (Figura 4.36). El módulo consistió en dos capas de PMMA con un canal en forma de serpentin mecanizado en cada una de ellas, de 100 μm de profundidad, 1 mm de ancho y una longitud arbitraria de 11 cm, de manera que cuando se solapaban con una membrana de difusión gaseosa entre ellas, los canales quedaban también solapados, dando lugar a un canal que actuaría de donador del analito gaseoso y otro que actuaría como canal aceptor del analito.

Antes de caracterizar cada membrana, se cortaron con el tamaño deseado (se comercializan en círculos de 47 mm de diámetro) y se lavaron con agua para eliminar cualquier partícula que pudiera alterar la superficie. Realizando el lavado con agua, se observó de manera casual que ambos lados de una misma membrana

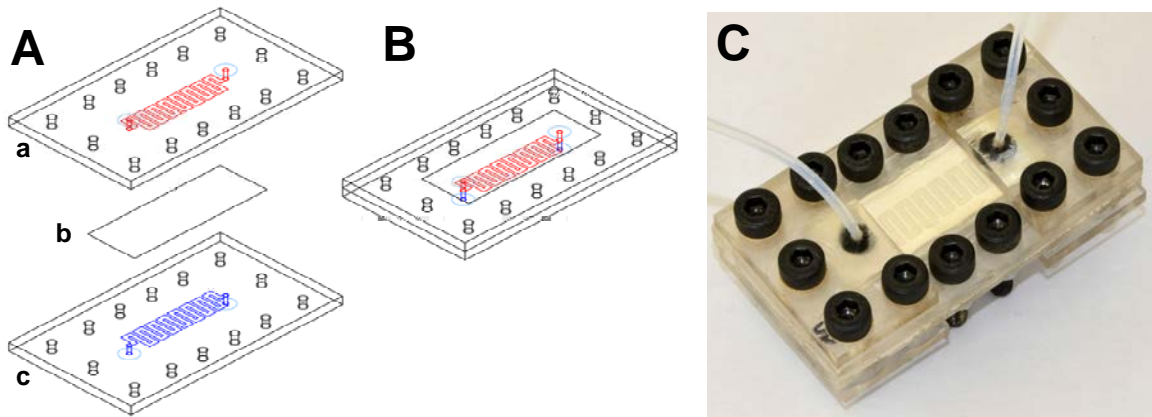


Figura 4.36. A) Esquema del módulo de difusión intercambiable diseñado y construido: (a) tapa superior con sus correspondientes canales mecanizados; (b) membrana de PVDF; (c) capa inferior. B) esquema del módulo ensamblado con las 2 capas superpuestas con la membrana en medio. C) imagen real del módulo construido para realizar la caracterización de las distintas membranas testadas.

no mostraban el mismo comportamiento hidrófobo, a nivel de tensión superficial. Como se puede observar (Figura 4.37), en un lado se formaban gotas discretas mientras que en el otro se observaba la tendencia a formar una película, a pesar de que las especificaciones técnicas del fabricante no indicaban nada al respecto.

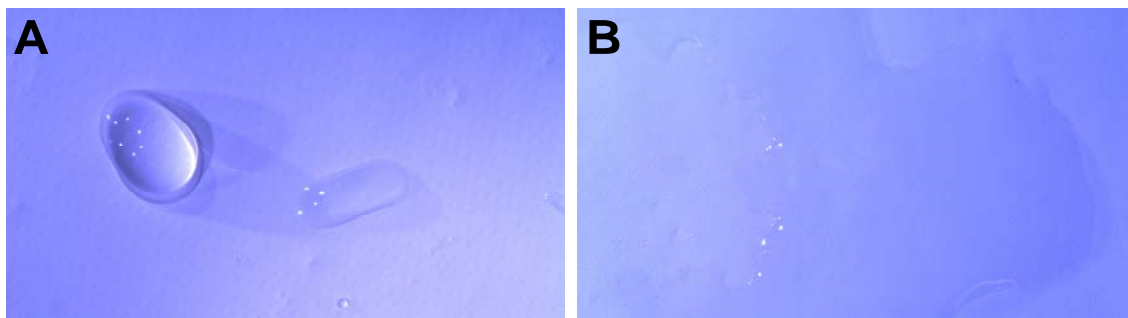


Figura 4.37. Imagen de ambos lados de una membrana de PVDF de 0.45 A) lado más hidrófobo; B) lado menos hidrófobo.

Este fenómeno se observó en todas las membranas testadas y podría ser debido al proceso de fabricación de estas. Con la finalidad de constatar experimentalmente este hecho, se realizaron medidas de ángulo de contacto con agua sobre cada lado de las distintas membranas testadas. La técnica utilizada fue la de medición directa, mediante un goniómetro, del ángulo tangente en el punto de contacto trifásico de un perfil de gota sésil.⁶⁷ En la figura 4.38 se muestra, a modo de ejemplo, las imágenes de los ángulos de contacto del agua sobre ambos lados de una membrana hidrófoba de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro.

Los resultados fueron similares para las membranas con los otros dos tamaños de poro. De esta manera se constató que hay un lado más hidrófobo que otro en todas las membranas de PVDF (0.22, 0.45 y 1 μm de tamaño de poro) usadas, hecho que podría dar lugar a que puntualmente una de las caras dejara pasar líquido, dejando así de ser útil la membrana y reduciendo su tiempo de vida.

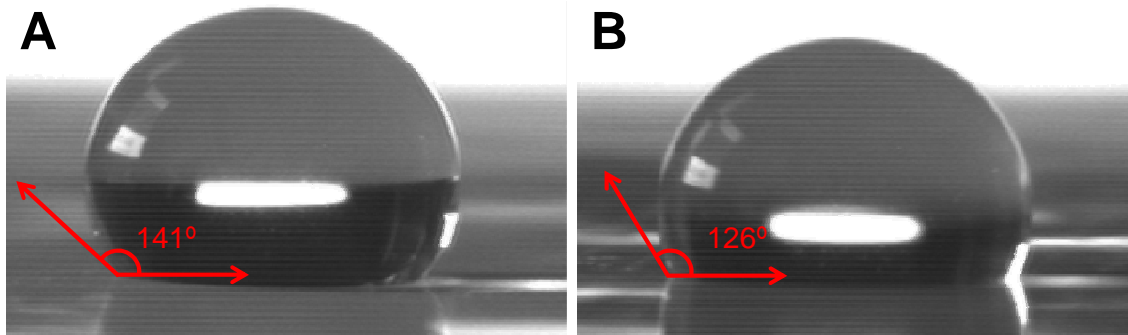


Figura 4.38. Imagen mostrando los ángulos de contacto de agua sobre los diferentes lados de una membrana de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro; **A)** El lado más hidrófobo (141°); **B)** El lado menos hidrófobo (126°).

Con esta información adicional, se procedió a verificar el tiempo de vida de cada membrana mediante el montaje experimental mostrado en la Figura 4.39.A.

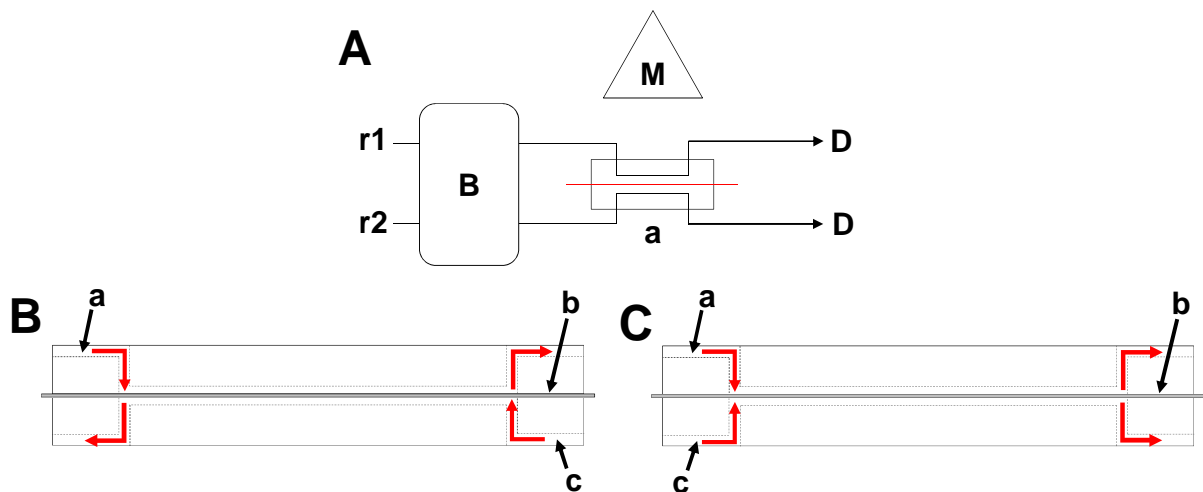


Figura 4.39. **A)** montaje experimental de las pruebas de durabilidad de las membranas: (r1) reactivo 1 (rojo de fenol o NaOH según el tipo de experiencia); (r2) reactivo 2 (rojo de fenol o NaOH); (a) módulo de difusión (en rojo membrana de PVDF); (B) bomba peristáltica; (D) desecho; (M) microscopio USB. **B y C)** Esquema de las distintas configuraciones testadas de entrada de flujo en el interior del módulo de membrana. **B)** a contracorriente o distinto sentido de flujo; **C)** mismo sentido de flujo. (a) entrada al canal del lado más hidrófobo de la membrana; (b) membrana de PVDF; (c) entrada al canal del lado menos hidrófobo de la membrana.

Con este ensayo, se pretendió verificar cuánto tiempo tardaba en permear líquido de un lado al otro de la membrana, utilizando el cambio de color en colorantes ácido-base como indicador del inicio de dicho proceso. Así, por uno de los canales sobre la membrana, se impulsó una disolución de rojo de fenol a pH 6 (recordemos que por debajo de pH 6.8 presenta coloración amarilla y por encima de pH 8.4 presenta coloración violeta) y por el canal del otro lado de la membrana se impulsó una disolución de NaOH 0.1 M. De esta manera, si a lo largo del tiempo se observaba coloración violeta en alguno de los canales, este hecho sería indicativo de la aparición de algún poro en la membrana que pondría en contacto ambos líquidos,

señalando el final del tiempo de vida de la membrana. El caudal utilizado para cada canal fue de $800 \mu\text{L min}^{-1}$ y mediante un microscopio USB (PCE Instrumentation, España) conectado a un PC se monitorizó el experimento continuamente. Se llevaron a cabo varios ensayos usando diferentes configuraciones de entrada de flujo en el interior del módulo de membrana: con distinto sentido de flujo (Figura 4.39.B) y con mismo sentido de flujo (Figura 4.39.C). Puesto que ambos lados de la membrana no se comportan igual, se colocó el lado más hidrófobo encarado al canal superior, identificado por ser el lado de las cabezas de los tornillos (Figura 4.36.C). También se testaron las membranas en dos condiciones: introduciendo los reactivos directamente en los canales o tras un preacondicionamiento de 5 minutos dejando circular agua por los canales.

A modo de ejemplo de los resultados obtenidos, en la figura 4.40 se puede observar las imágenes correspondientes al ensayo que se realizó usando una membrana de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, con una configuración de entrada de los canales con distinto sentido de flujo (Figura 4.40.A), con el lado de la membrana más hidrófobo hacia el canal del indicador ácido-base y pasando agua durante 5 min previamente al llenado de los canales con los reactivos.

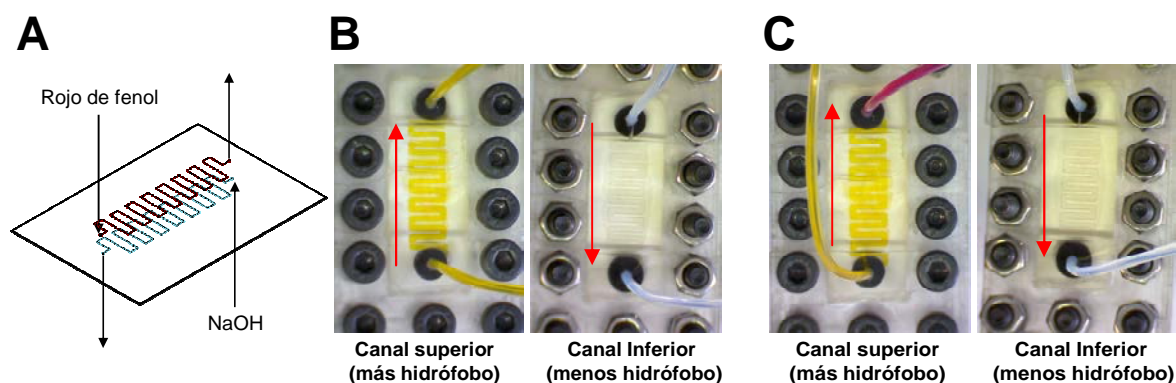


Figura 4.40. Imágenes correspondientes al estudio de durabilidad de una membrana de 0.45 micras. **A)** Dirección de las disoluciones en el interior del módulo de difusión en este experimento. **B)** imágenes del inicio de la prueba, no hay paso de reactivos de un lado al otro de la membrana. **C)** imágenes del final de la prueba donde se observa que a la salida del canal de la disolución de rojo de fenol (y entrada por el otro lado de la membrana de la de NaOH) la disolución de NaOH permea, haciendo virar el color del indicador.

Como se puede apreciar (Figura 4.40.C), al cabo de 4 horas y 30 minutos de haberse iniciado el experimento, la disolución de NaOH 0.1 M comenzó a permear del canal situado en el lado menos hidrófobo de la membrana al más hidrófobo. Se puede ver que el viraje de color apareció justo en el punto de entrada de la disolución de NaOH al módulo de difusión, coincidiendo con el punto de salida del colorante por el otro lado (Figura 4.40.A). Cabría esperar que este hecho se debiese a una perforación de lado a lado de la membrana y debido a los sentidos de flujo de cada disolución (flechas de color rojo), hacían que no se viese cambio de color en el canal

de la disolución de NaOH. Sin embargo al probar una configuración de entrada de líquidos con el mismo sentido de flujo (Figura 4.41.A y C) se pudo constatar que lo que ocurre no es la formación de un agujero de lado a lado de la membrana, sino que siempre la disolución que se encuentra en el canal del lado menos hidrófobo acaba pasando al otro lado, dando igual cual sea la disolución que haya en cada canal (Figura 4.41.E). De esta manera, tanto si la disolución del colorante es la que entra por el lado más hidrófobo (Figura 4.41.A y B), como si lo hace la de NaOH (Figura 4.41.C y D), la disolución que acaba virando de color es la que se encuentra en el lado más hidrófobo. Este hecho ocurrió con todas las membranas testadas.

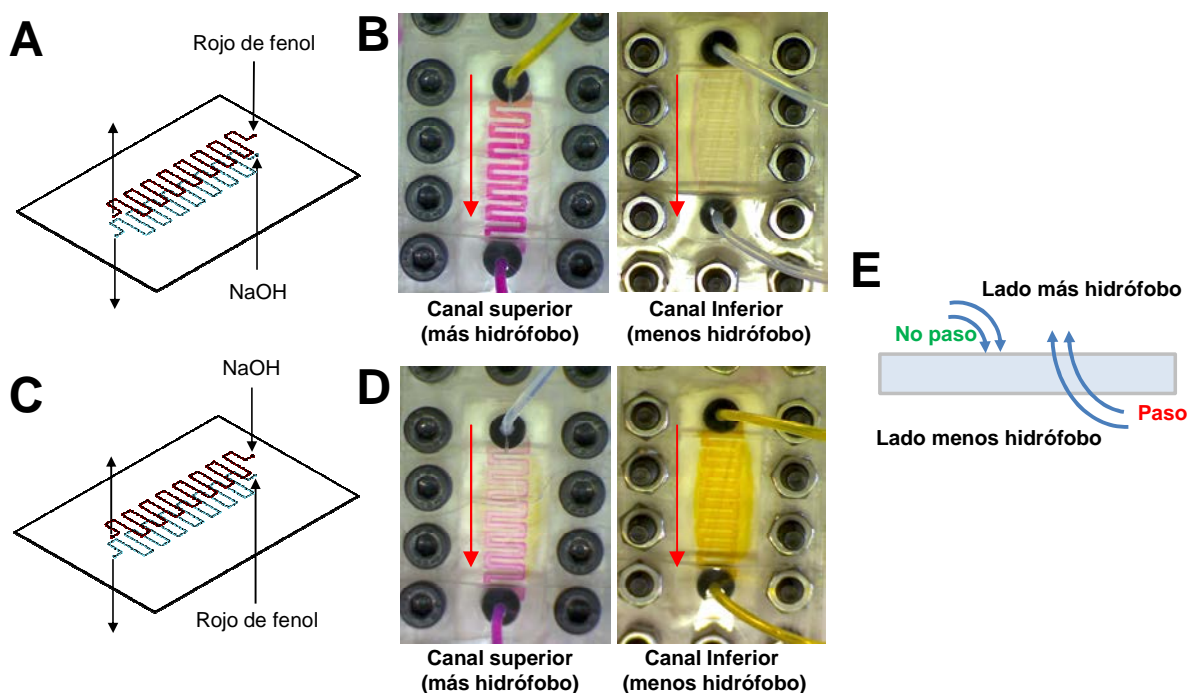


Figura 4.41. Imagen probando el mismo sentido de entrada de flujo de los reactivos al módulo de difusión cambiando los reactivos de canal, una vez que la membrana ha dejado pasar líquido de un lado a otro. **A y C)** distintas configuraciones de entrada de líquidos al módulo de difusión testadas. **B y D)** imágenes correspondientes a ambos lados del módulo de difusión con las configuraciones experimentales escogidas. **E)** diagrama del fenómeno observado: los líquidos permean del lado menos hidrófobo al otro lado, pero no ocurre el mismo fenómeno en el sentido contrario.

La posible explicación a este hecho puede radicar en la diferencia de hidrofobicidad de cada lado de la membrana, cosa que podría provocar que con el paso de los líquidos, estos pudieran penetrar por los poros de la membrana del lado menos hidrófobo pudiendo desplazarse al lado más hidrófobo, pero por el contrario, el camino en sentido opuesto no podría realizarse (o no tan fácilmente) debido a la mayor repulsión que ejerce ese lado de la membrana a los líquidos, fruto de su mayor carácter hidrófobo (Figura 4.41.E).

En la figura 4.42 se muestran los resultados de tiempo de vida de cada membrana en función del tamaño de poro y de si directamente se introducían los reactivos (A)

o si se realizaba el preacondicionamiento con agua durante 5 minutos antes de introducir los reactivos (B). Estos resultados corresponden a la serie de experimentos realizados utilizando una configuración de entrada de los reactivos al módulo de difusión con distinto sentido (Figura 4.39.B).

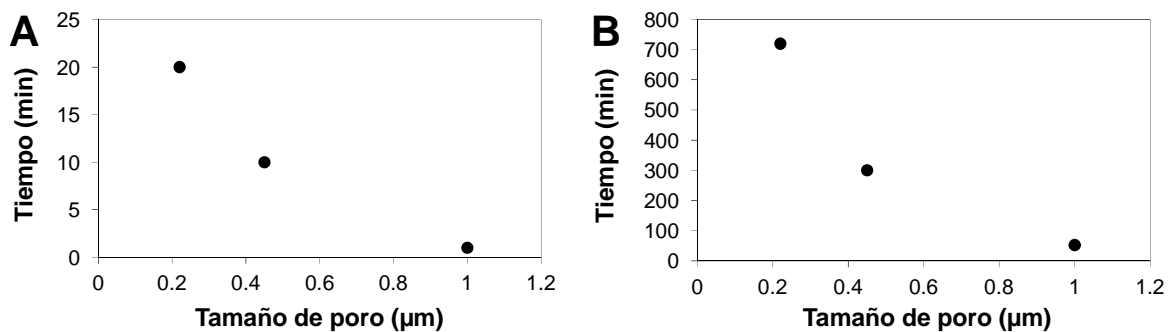


Figura 4.42. Resultados de tiempo de vida de cada membrana en función del tamaño de poro: **A)** pasando los reactivos directamente; **B)** pasando los reactivos después de pasar agua durante 5 min.

Como se puede observar a menor tamaño de poro mayor tiempo de vida de la membrana. También se puede constatar la necesidad de preacondicionar la membrana con agua, ya que si no se hace, el tiempo de vida de estas se reduce drásticamente. Esto puede ser debido a que cuando se preacondiciona con agua durante 5 minutos, los poros de la membrana accesibles por el líquido son ocupados por esta, cosa que, junto al carácter hidrófobo de la membrana, hace que los reactivos tarden más tiempo en ocupar estos poros para finalmente acabar atravesando la membrana desde el lado menos hidrófobo al de mayor hidrofobicidad.

Por su parte, se encontraron idénticos resultados a los observados recientemente utilizando una configuración de entrada de líquidos en el mismo sentido.

Cabe destacar que en las 48 horas que duró el experimento más largo realizado, no se observó ninguna perforación de lado a lado de la membrana, tan solo el fenómeno descrito con anterioridad.

De las diferentes pruebas realizadas se extrae que la cara menos hidrófoba en las membranas tarde o temprano deja pasar disolución. Por este motivo, en la fabricación del microsistema (Figura 4.33.B), la membrana se colocó con su lado más hidrófobo encarado hacia el canal de la disolución donadora que contiene el analito, NaOH y EDTA. De este modo, se evitó la posibilidad de que el ESI pudiese verse afectado negativamente por variaciones bruscas de pH debido al paso de NaOH a través de la membrana.

Con el fin de indagar en este aspecto observado y descartar que se formara un agujero en la membrana, se realizaron medidas de perfilometría para observar que ocurría en el punto que se volvía permeable a líquidos unidireccionalmente.

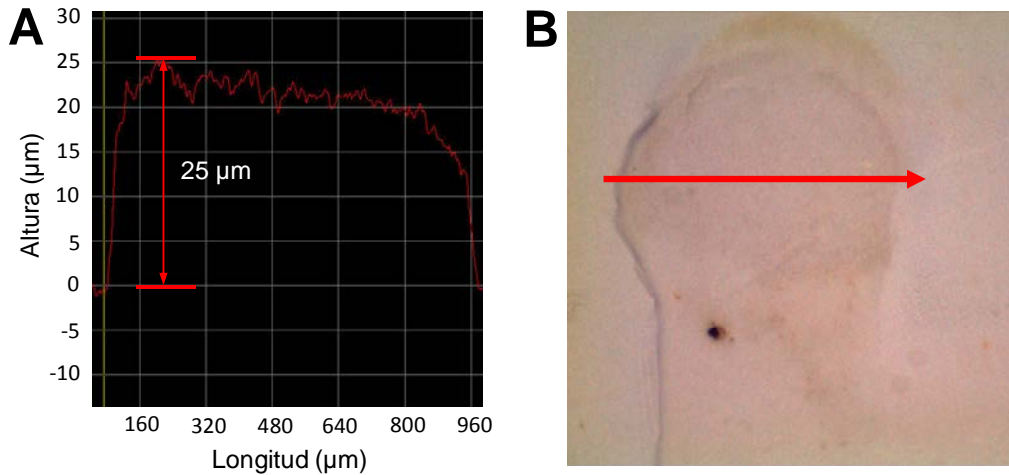


Figura 4.43. Medida de perfilometría de una membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro en el punto donde se observa el paso de líquido de un lado al otro. A) Gráfico perfilométrico obtenido que muestra un aplastamiento de la membrana de unos $25\ \mu\text{m}$. B) Imagen de la membrana con la zona de la medida resaltada en color rojo.

Como se puede observar (Figura 4.43), el hecho de presionar con tornillos las dos piezas del módulo de difusión para evitar que hubiera fugas, provocó la aparición de un estampado negativo de los canales y las entradas de $25\ \mu\text{m}$ por cada lado de la membrana. Puesto que el grosor de la membrana era de $125\ \mu\text{m}$, significaba que en los bordes de los canales se producía una importante reducción del grosor de esta. La presión ejercida podría incluso llegar a seccionar la membrana o crear microroturas, aunque este extremo no se ha observado en las pruebas hasta ahora realizadas. En cualquier caso, para evitar que este problema llegase a planearse, se realizaron distintas acciones. Por un lado se incorporó una capa adicional de COC de $50\ \mu\text{m}$ (espesor equivalente al aplastamiento de la membrana) en el proceso de fabricación del microsistema final, con un hueco mecanizado para acoger la membrana (Figura 4.33.A.e). La existencia de esta capa limitó el aplastamiento de las membranas, reduciendo el riesgo de troquelado de estas por parte de los bordes de los canales. Otros puntos débiles de la membrana eran los ubicados en las entradas y salidas de los canales en el módulo de difusión. La impulsión pulsante de los líquidos o diferencias de caudal de las dos disoluciones a cada lado de la membrana podían comprometer la integridad de esta. Para evitar este problema se decidió desplazar los puertos de entrada y salida a cada lado de la membrana para que no coincidieran en un mismo punto (Figura 4.44.B). Esta configuración, al requerir que cada entrada se encontrara con la membrana apoyada sobre una pared de COC al otro lado, y no sobre un canal o una salida de líquido, obligó a usar una configuración contracorriente de líquidos en el interior del módulo. Este cambio permitió alargar el tiempo de vida de las membranas más de un 50 %, usando, incluso, caudales de las disoluciones aceptora y donadora distintos.

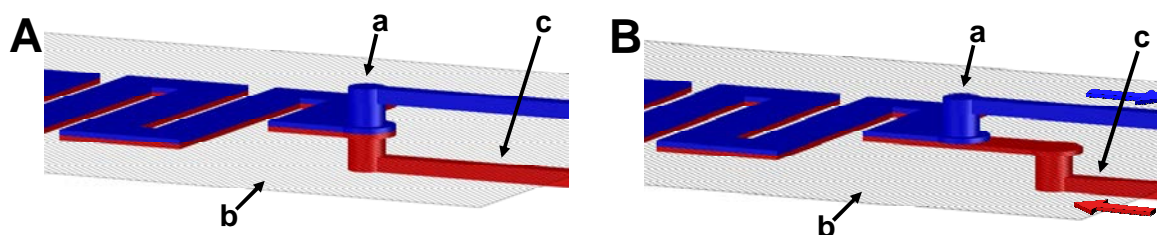


Figura 4.44. A) Esquema tridimensional del módulo de difusión gaseosa (pruebas iniciales) con la entrada de los puertos por cada lado de la membrana coincidentes en un mismo punto. B) El mismo tipo de esquema con los puertos de entrada no coincidentes (diseño final del microsistema). En ambas imágenes: (a) canales microfluídicos sobre la membrana donde el gas será recogido y convertido de nuevo a ión amonio; (b) membrana de PVDF; (c) canales microfluídicos bajo la membrana donde el amoníaco gas será generado. Las flechas indican la dirección del flujo.

Una vez incluidas todas estas modificaciones en un nuevo módulo de difusión reversible (Figura 4.45), se procedió a evaluar la difusividad de las membranas realizando ya medidas potenciométricas del ión amonio.

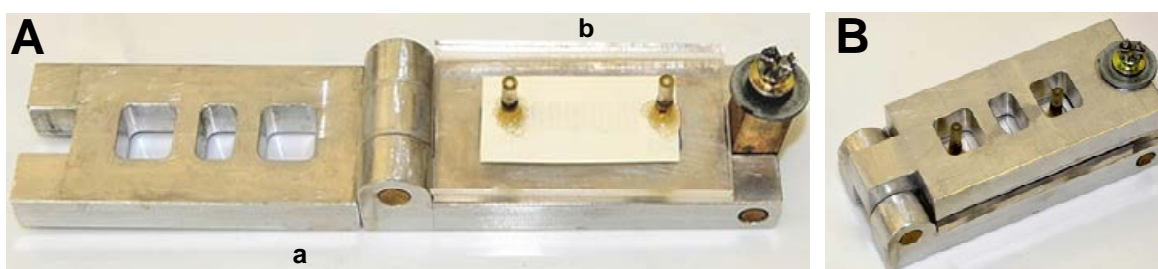


Figura 4.45. Imágenes del nuevo módulo de difusión fabricado en aluminio. A) Módulo soporte incluyendo: (a) estructura de aluminio que permite un sellado homogéneo; (b) bloques del módulo de difusión con los canales grabados y la membrana en medio. B) imagen del soporte presionando ambas partes del módulo, sellándolo homogéneamente.

Para poder llevar a cabo las medidas potenciométricas, se diseñó y construyó un microsistema modular, para permitir una fácil sustitución de los elementos testados en caso de necesidad. Este constó de un módulo de mezcla (Figura 4.46.C) para homogeneizar la disolución de NaOH con la que contenía el analito, con el fin de generar el amoníaco gas, y un módulo de detección (Figura 4.46.A y B), que integraba un electrodo selectivo de amonio de membrana polimérica y un electrodo de referencia de Ag/AgCl serigrafiado.

La figura 4.46.D muestra el montaje experimental utilizado. Se realizaron calibrados usando dos disoluciones estándar de 1 y 10 mg L⁻¹ NH₄⁺ sin módulo de difusión y usando membranas con los tamaños de poro estudiados hasta ahora. Para las medidas sin módulo de difusión el montaje experimental fue modificado ya que no se requiere de disolución de NaOH, puesto que no se requiere de la generación de amoníaco.

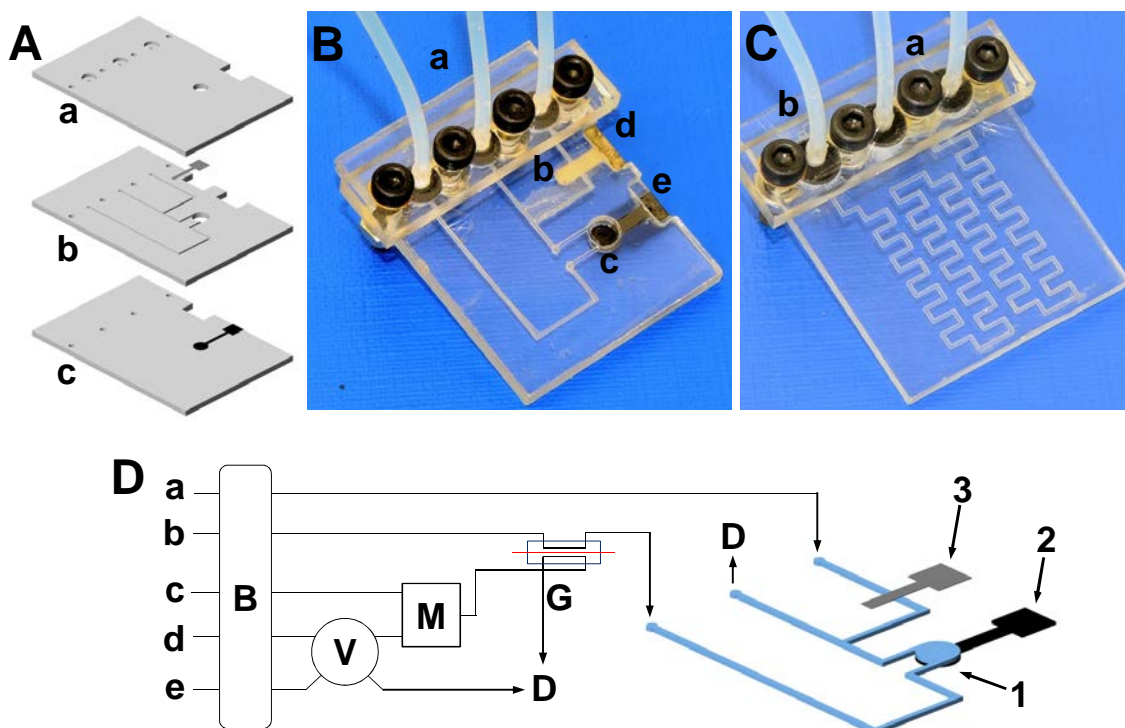


Figura 4.46. **A)** diseño del módulo de detección de amonio formado por 3 capas de COC de 1mm de espesor: (a) capa superior que contiene las entradas y el electrodo de referencia serigrafado; (b) capa intermedia que contiene la fluidica; (c) capa inferior que contiene depositado el soporte conductor de epoxi-grafito sobre el que se deposita la membrana de PVC. **B)** Imagen real del módulo de detección: (a) conectores fluidicos; (b) electrodo de referencia de Ag/AgCl; (c) cámara de detección con el electrodo selectivo de ion amonio; (d) y (e) conectores electricos de los respectivos electrodos. **C)** Imagen real del módulo de mezcla, diseñado previamente: (a) entradas que se mezclan; (b) canal de salida resultante de la mezcla. **D)** montaje experimental para realizar las pruebas de difusividad de la membrana en FIA. (a) KCl 0.1M; (b) Tris 0.01 M a pH 7.4; (c) NaOH 0.1 M + EDTA 10^{-3} M; (d) H₂O; (e) disoluciones estándar de NH₄⁺; (B) bomba peristáltica; (V) válvula rotatoria de seis vías; (M) módulo de mezcla; (G) módulo de difusión con puertos de entrada de líquidos no coincidentes y diferente sentido de flujo de las disoluciones; (D) desecho; (1) cámara de detección; (2) ESI; (3) electrodo de referencia.

Los resultados obtenidos (Figura 4.47) mostraron que entre no usar membrana y usar una de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, la señal generada por una concentración dada de analito descendía un 29 %. Respecto a esta, si se usaba una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, la difusividad bajaba un 9 %. No se pudieron realizar medidas con la membrana de $1 \mu\text{m}$ de tamaño de poro debido a problemas de estanqueidad relacionados con el entramado polimérico de soporte que presentaba (Figura 4.35).

Con el fin de llegar a un compromiso entre selectividad, tiempo de vida de las membranas y alturas de pico, y por tanto LD, se decidió escoger la membrana de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para la fabricación del microsistema final.

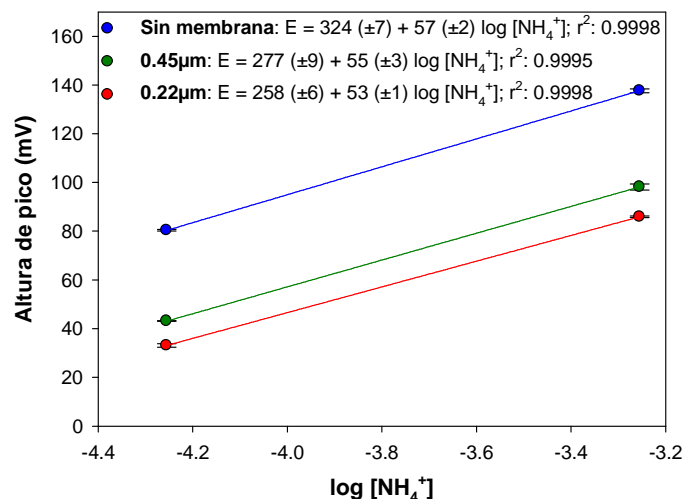


Figura 4.47. Curvas de calibración obtenidas sin módulo de difusión y usando módulo de difusión con membranas de 0.22 y 0.45 μm de tamaño de poro.

Por último, se optimizó la morfología de los canales del módulo de difusión. Se probaron diferentes profundidades de canal (100 y 200 μm) y diferentes formas (serpentín^{57,61} y lineal⁶⁸) (Figura 4.48), manteniendo siempre una misma anchura de canal de 1 mm. Los mejores resultados se obtuvieron con la configuración en forma de serpentín y 100 μm de profundidad de canal. Este hecho se debe a que, cuanto mayor es la relación entre la superficie de contacto membrana/ disolución donadora, y el volumen de esta última, mayor es la cantidad de analito que se consigue difundir. Por lo tanto, a menor altura del microcanal en serpentín, más difusión de amoníaco y menos pérdida de este hacia el desecho.

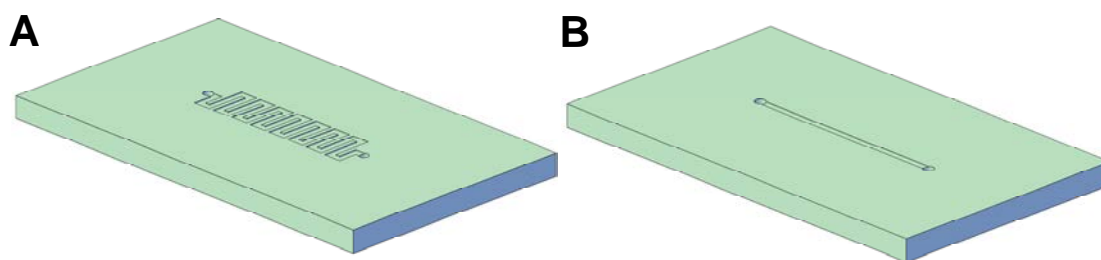


Figura 4.48. Figura con las distintas configuraciones de canal usadas. **A)** Configuración en forma de serpentín probada con 100 y 200 μm de profundidad; **B)** Configuración en forma lineal probada con 100 μm de profundidad.

4.3.3.3. Integración del electrodo indicador

Con la finalidad de simplificar el proceso de fabricación del ESI (hasta ahora se hacía un bajo-relieve con la forma del electrodo, se rellenaba con la mezcla de epoxi-grafito, se curaba a 40 °C durante 24 h y se lijaba y pulía su superficie para nivelarla con la placa de COC), se testó una tinta de grafito que podía ser depositada directamente sobre el sustrato polimérico por impresión por inyección (*inkjet printing*) o por serigrafía. Los electrodos fabricados fueron sometidos a

pruebas estándar de adhesión entre sustrato y tinta conductora (§4.2.3.1),⁵¹ a pruebas de laminación y a pruebas de deposición de cóctel sensor. Los resultados globales no fueron satisfactorios, ya que a pesar de mostrar una adherencia sobre el sustrato polimérico de COC aceptable y laminarse correctamente, la compatibilidad con el proceso de deposición de la membrana polimérica no fue la más adecuada. Así, no se obtuvieron variaciones de potencial reseñables al realizar un calibrado de los electrodos construidos. Esto podía ser debido a que el THF del cóctel sensor atacaba la superficie del transductor, provocando grietas y discontinuidades que repercutían en la respuesta analítica del sensor. Por este motivo se escogió la pasta de epoxi-grafio usada en el desarrollo de los microsistemas anteriores (§4.1 y 4.2.) para fabricar el soporte conductor del electrodo selectivo de amonio.

4.3.3.4. Evaluación de variables químicas e hidrodinámicas

Finalmente, con el proceso de fabricación del microanalizador optimizado, se procedió a evaluar, mediante un proceso de optimización univariante, los parámetros químicos e hidrodinámicos para obtener unas características de respuesta apropiadas a las aplicaciones previstas. De acuerdo con los trabajos reportados,^{25,63} inicialmente se escogió, como disolución acondicionadora aceptora, una disolución de Tris ajustada a pH 7.4 con HCl.

En primer lugar, se optimizó la concentración de dicha disolución acondicionadora aceptora. Para ello, utilizando el montaje experimental final (Figura 4.32), se realizaron inyecciones, por triplicado, de dos disoluciones estándar de NH_4Cl con una diferencia entre ellas de una década de concentración (de 10 y 100 mg L^{-1} NH_4^+). Como caudal de cada uno de los canales (disolución portadora/disolución estándar/muestra, disolución de NaOH y disolución acondicionadora) se fijó arbitrariamente uno de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$ (manteniéndose siempre a 100 $\mu\text{l min}^{-1}$ el caudal de la disolución auxiliar de KCl 0.1 M) y como volumen de inyección se usó uno de 225 μL . Como concentración de NaOH se seleccionó una de 0.01 M. En estas condiciones, se evaluaron concentraciones de disolución aceptora entre 0.01 y 0.1 M, siempre a pH 7.4. Los resultados (Figura 4.49) mostraron que todas las concentraciones proporcionaban sensibilidades similares. Sin embargo, a menor concentración, mayores alturas de pico y, por tanto, menores LD. Por este motivo se decidió escoger una concentración de 0.01 M de Tris.

A continuación, se optimizó la concentración de la disolución de NaOH. Como se dijo anteriormente (§4.3.1), se introdujo una concentración constante de EDTA (10^{-3} M) con el fin de complejar cualquier metal presente en la muestra, evitando, así, su precipitación en forma de hidróxidos. Estos precipitados podrían ocasionar la obstrucción de los canales o la rotura de la membrana de difusión. Con el mismo

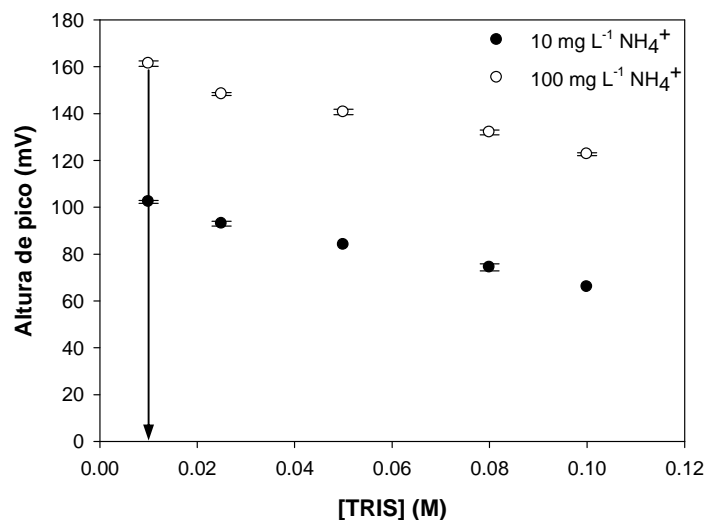


Figura 4.49. Resultados de la optimización de la concentración de la disolución acondicionadora de Tris.

procedimiento que en el caso anterior, se testaron concentraciones de NaOH entre 10^{-4} y 10^{-1} M, fijando como valor optimizado una concentración de Tris en la disolución acondicionadora de 0.01 M. Los resultados obtenidos mostraron (Figura 4.50) que a bajas concentraciones de NaOH, no todo el amonio presente en la muestra se transformaba en amoníaco, traduciéndose este hecho en alturas de pico más bajas de la cuenta. Así, en el caso de la concentración de NaOH más baja testada (10^{-4} M), las alturas de pico para una disolución estándar de 10 y de 100 mg L⁻¹ NH₄⁺ eran prácticamente las mismas. A partir de una concentración de 0.01 M, se constató que las alturas de pico no variaban significativamente, manteniéndose una respuesta Nerstiana. Por este motivo, y para asegurar que habría suficiente medio básico para convertir todo el amonio a amoníaco, sobre todo en muestras con concentraciones mayores de 100 mg L⁻¹ NH₄⁺, se decidió escoger como óptima una concentración de disolución básica de 0.1 M de NaOH + 10^{-3} M de EDTA.

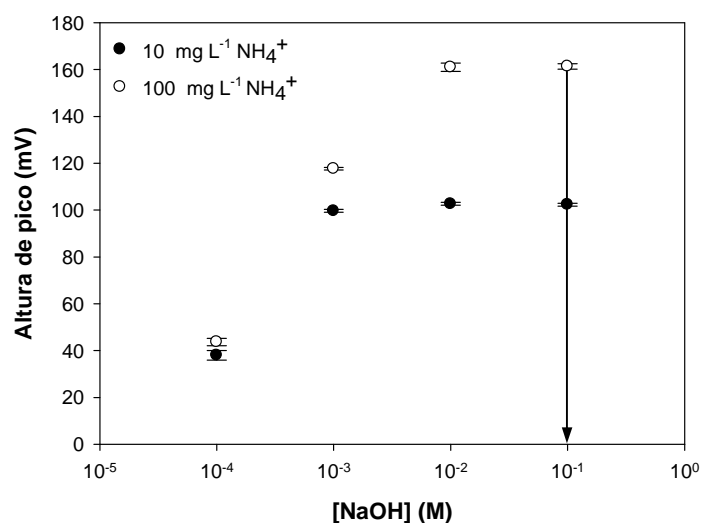


Figura 4.50. Resultados de la optimización de la concentración de NaOH en la disolución donadora.

Por su parte, el volumen de inyección de la muestra fue testado entre 25 y 580 μL , siendo fijados los valores óptimos de concentración de las disoluciones de TRIS y NaOH en 0.01 y 0.1 M respectivamente.

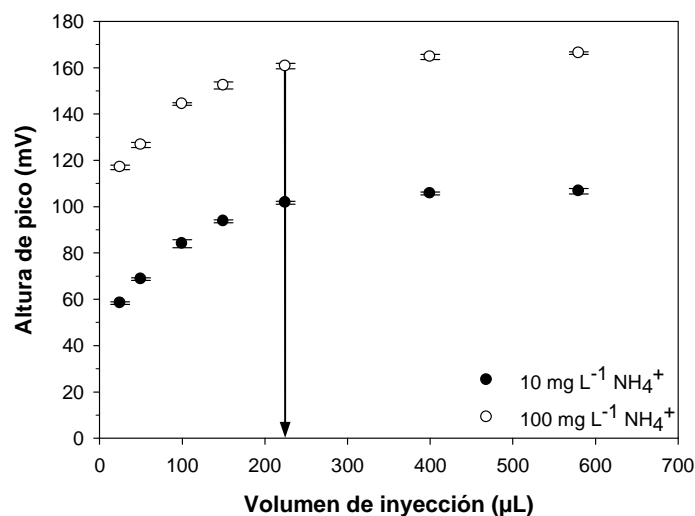


Figura 4.51. Resultados de la optimización del volumen de inyección.

Los resultados obtenidos (Figura 4.51) mostraron que para volúmenes de inyección por debajo de 225 μL , las alturas de pico bajaban drásticamente a medida que este disminuía. Sin embargo, a partir de 225 μL , las alturas de pico no aumentaban significativamente con el volumen inyectado, aumentando considerablemente, por el contrario, el tiempo de análisis. Por este motivo se escogió un volumen de inyección de muestra de 225 μL .

Para optimizar el caudal del canal de la disolución portadora, del de la disolución de NaOH y del de la disolución aceptora, se siguió el mismo procedimiento que en los casos anteriores, fijando el volumen de inyección en 225 μL y las concentraciones de disolución de NaOH y aceptora previamente optimizadas. El caudal de la disolución auxiliar de referencia de KCl, para mantener el potencial del electrodo de referencia constante, se mantuvo siempre a 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. Se testaron valores de caudal entre 30 y 800 $\mu\text{L min}^{-1}$. Atendiendo a los resultados obtenidos (Figura 4.52), caudales bajos proporcionaban mayores alturas de pico y, por tanto, mejores LD. Sin embargo, el tiempo de análisis se hacía excesivamente largo. Por el contrario, caudales altos acortaban el tiempo de análisis considerablemente pero provocaban una disminución de las alturas de pico y, también, podrían provocar un estrés extra sobre la membrana de difusión, ya que se vería obligada a soportar unas presiones mayores. Por todo esto el caudal escogido para cada canal fue de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$.

En cuanto a selectividad, el electrodo selectivo de amonio integrado en este microsistema analítico no presentaba ninguna de las interferencias típicas que suele tener (Na^+ y K^+ principalmente)⁶⁹ ya que la membrana de difusión gaseosa las

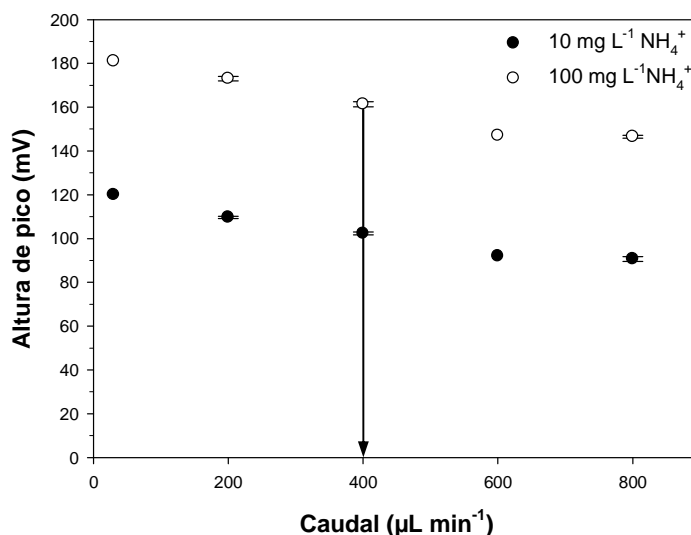


Figura 4.52. Resultados de la optimización del caudal.

retiene e impide que alcancen el sensor. En cambio, las aminas volátiles son compuestos que en medio básico podrían difundir a través de una membrana de PVDF y además son interferentes de los electrodos selectivos de amonio.⁶⁸ Sin embargo, no se espera la presencia de estos tipos de compuestos en las muestras a analizar, por lo que la respuesta del microanalizador se puede considerar libre de interferentes.

Para corroborar este hecho experimentalmente, se realizó un ensayo en el que se inyectaron tres disoluciones estándar de 10 mg L⁻¹ NH₄⁺: una conteniendo únicamente amonio, otra conteniendo además 10 mg L⁻¹ del compuesto interferente K⁺ y otra usando una disolución donadora sin NaOH.

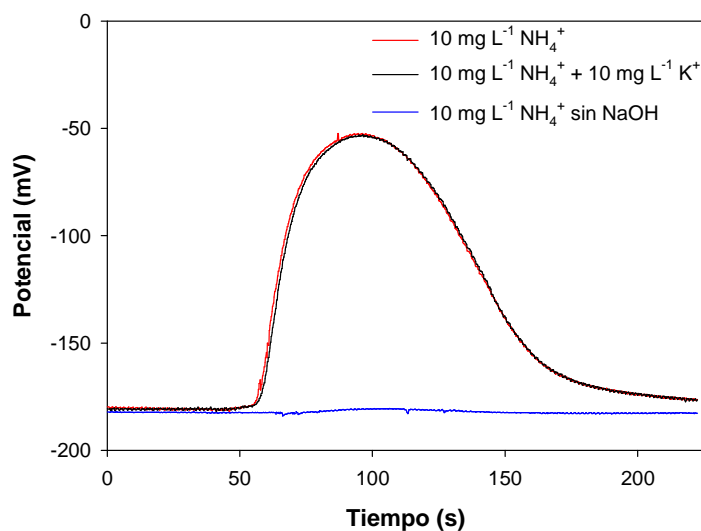


Figura 4.53. Resultados de la verificación de la selectividad del microsistema.

Como se puede apreciar (Figura 4.53), tanto la altura de pico de la disolución de amonio sola como la de amonio con potasio fueron idénticas, verificándose de esta

manera que el K^+ no traspasaba la membrana de difusión. Por su parte y como era de esperar, si no se convierte el amonio en amoníaco para que este difunda, no puede ser recogido por la disolución aceptora y no puede ser determinado por el ESI. Esto es lo que ocurrió cuando se inyectó una disolución estándar de $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ sin NaOH, la altura de pico fue inexistente.

4.3.4. Características analíticas del sistema

Las características analíticas del microsistema propuesto fueron determinadas mediante distintos calibrados realizados con diferentes disoluciones estándar de NH_4^+ . A modo de ejemplo, la figura 4.54 muestra el registro de la señal y la curva de calibración para uno de ellos. La ecuación de Nernst obtenida (usando 3 calibrados en días consecutivos con, triplicados por cada punto) fue $E = 320.3 (\pm 1.3) + 59.4 (\pm 0.4) \log [\text{NH}_4^+]$ con $r^2 = 0.9993$. El rango lineal obtenido fue de 0.15 hasta al menos 500 mg L^{-1} . El límite de detección, calculado según las recomendaciones de la IUPAC,³⁶ fue $0.07 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 9$, 95 % confianza).

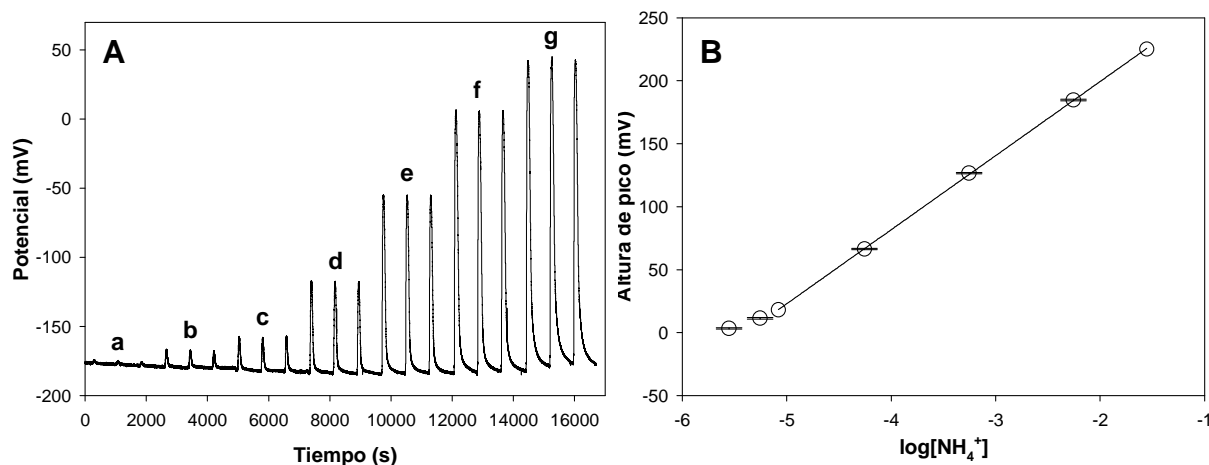


Figura 4.54. Registro de la señal (A) y curva correspondiente a un calibrado del microanalizador (B) usando disoluciones estándar de NH_4Cl . Disoluciones estándar de NH_4^+ de 0.05 mg L^{-1} (a), 0.1 mg L^{-1} (b), 0.15 mg L^{-1} (c), 1 mg L^{-1} (d), 10 mg L^{-1} (e), 100 mg L^{-1} (f) y 500 mg L^{-1} (g).

La repetitividad del microsistema se determinó mediante la realización de 10 inyecciones sucesivas de una disolución estándar de $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ (Figura 4.55). El coeficiente de variación de las alturas de pico registradas ($n = 10$, 95 % confianza) fue de 0.3 %.

La reproducibilidad fue también evaluada a partir de los datos de 5 calibrados realizados a lo largo de un mes (Figura 4.56). El promedio de las sensibilidades fue de $58.90 \text{ mV dec}^{-1}$ con un CV de 1.3 %. Estos resultados mostraron la robustez y la confiabilidad del sistema experimental desarrollado.

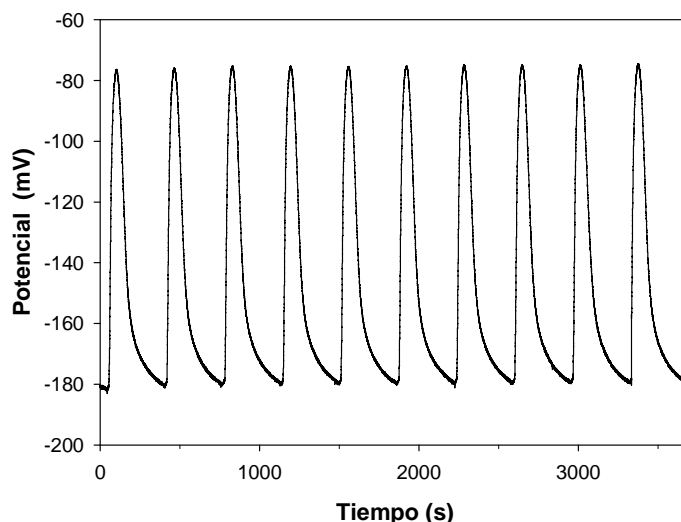


Figura 4.55. Registro de la señal potenciométrica del ESI para 10 inyecciones de una disolución de 10 mg L⁻¹ NH₄⁺ con la finalidad de calcular la repetitividad del microsistema.

Con los distintos parámetros optimizados, se obtuvo una frecuencia de análisis de 10 muestras a la hora. Sin embargo, este factor no debería ser una limitación para la aplicación final del microsistema, puesto que tan solo se requerirá el análisis de menos de una decena de muestras diariamente. El tiempo de vida del microsistema fue al menos de 6 meses.

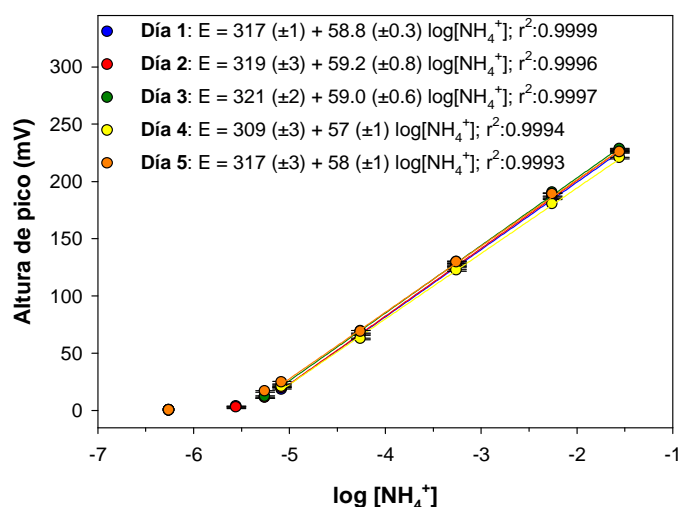


Figura 4.56. Curvas de calibración obtenidas por el ESI a lo largo de 1 mes con el fin de calcular la reproducibilidad del microsistema.

Además, se pueden llevar a cabo ligeras modificaciones de los parámetros químicos e hidrodinámicos del microanalizador con la finalidad de adaptar la respuesta del microsistema a diferentes composiciones de la muestra o a limitaciones técnicas que se puedan presentar, como disponibilidad de muestra y reactivos, frecuencia de análisis, etc., sin perder sus características operacionales.

4.3.5. Análisis de muestras reales

Posteriormente a la optimización y a la caracterización del microanalizador, este fue aplicado a la determinación de ión amonio en muestras reales, proporcionadas por la ESA, procedentes de la planta de tratamiento de agua ubicada en la estación experimental Concordia de la Antártida. Específicamente, estas muestras procedían de la salida del primer proceso de osmosis inversa del sistema de reciclado de agua (Figura 4.2). Los resultados obtenidos con el microsistema analítico desarrollado fueron validados por comparación con los resultados obtenidos espectrofotométricamente con el método estándar basado en el azul de indofenol.⁷⁰ Los resultados se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Valores de concentración en mg L⁻¹ NH₄⁺ (n = 3, 95 % confianza), obtenidos por el microsistema propuesto, del análisis de las muestras reales proporcionadas por la ESA procedentes de la base de pruebas Concordia, situada en la Antártida.

| Muestra | ESI | Azul de Indofenol | % error |
|---------|-------------|-------------------|---------|
| 1 | 4.5 ± 0.2 | 4.3 ± 0.2 | 5 |
| 2 | 5.6 ± 0.4 | 5.4 ± 0.2 | 4 |
| 3 | 6.6 ± 0.3 | 6.4 ± 0.5 | 4 |
| 4 | 9.7 ± 0.3 | 9.5 ± 0.2 | 2 |
| 5 | 0.36 ± 0.08 | 0.40 ± 0.05 | 10 |
| 6 | 0.21 ± 0.03 | 0.23 ± 0.03 | 8 |
| 7 | 0.3 ± 0.2 | 0.33 ± 0.04 | 10 |
| 8 | 2.7 ± 0.2 | 3.0 ± 0.4 | 10 |
| 9 | 0.28 ± 0.01 | 0.32 ± 0.04 | 13 |
| 10 | 18 ± 1 | 17 ± 2 | 5 |

Como se puede observar, los valores de concentración obtenidos con el microanalizador no diferían significativamente respecto a los obtenidos con el método de referencia según la prueba de t de Student apareada ($t_{\text{calc}} = 1.260$; $t_{\text{tab}} = 1.833$; $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$) y según la representación gráfica de los resultados obtenidos por cada uno de los métodos (Figura 4.57), obteniéndose una recta de regresión (n = 10, 95 % confianza) con una ordenada en el origen de $a = -0.1 \pm 0.1$, una pendiente de $b = 1.05 \pm 0.03$ y una coeficiente de correlación de 0.9992.

Estos resultados confirmaron que el microsistema analítico desarrollado es adecuado para la determinación de amonio en aguas recicladas, incluso a concentraciones de amonio menores de las permitidas por la normativa de la ESA en misiones espaciales.

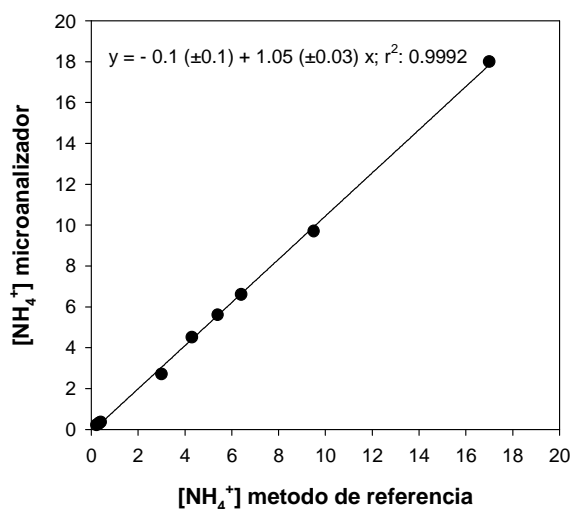


Figura 4.57. Recta de regresión entre los valores obtenidos por el método de referencia y los obtenidos por el microanalizador propuesto.

4.3.6. Test en condiciones de microgravedad

Finalmente, se evaluó el funcionamiento del microsistema analítico en condiciones de microgravedad para verificar, principalmente, la viabilidad del proceso de difusión gaseosa de amoníaco a través de la membrana en estas condiciones. En la actualidad, la ESA dispone de diversos sistemas en pruebas, en la ISS, en los que algunas de sus etapas integran membranas de separación. En estos sistemas ha habido numerosos problemas con la aparición de burbujas de aire y la imposibilidad de eliminarlas en condiciones de microgravedad, cosa que ha conllevado la obtención de resultados incorrectos en los experimentos llevados a cabo. Respondiendo a esta preocupación y con la finalidad de demostrar experimentalmente que en el proceso de difusión de amoníaco no se generan burbujas, se plantearon una serie de test en condiciones de microgravedad. El reto para poder llevar a cabo estos estudios fue el de encontrar una manera en la que estando en condiciones de gravedad terrestre se pudieran emular, aunque fuera por unos instantes, condiciones de microgravedad similares a las que se encuentran en el espacio exterior y que fuera accesible tanto económica como logísticamente. Existen diferentes opciones que permiten obtener condiciones de microgravedad, como torres de microgravedad, vuelos parabólicos, entre otros.⁷¹ Sin embargo, por cuestiones logísticas, se escogió, en primer lugar, la opción de lanzar el montaje experimental en un cohete de aeromodelismo. Posteriormente, y por problemas sobrevenidos, se procedió a utilizar el lanzamiento al vacío del montaje experimental atado con una cuerda semirrígida.

En ambos casos, lo que se pretendía ver era que durante el periodo de microgravedad, el proceso de difusión no generaba burbujas (Figura 4.58.A), las cuales, en caso de aparecer, se manifestarían en alteraciones en el registro de la

señal suministrada por el ESI, tal y como se puede observar en la siguiente simulación (Figura 4.58.B).

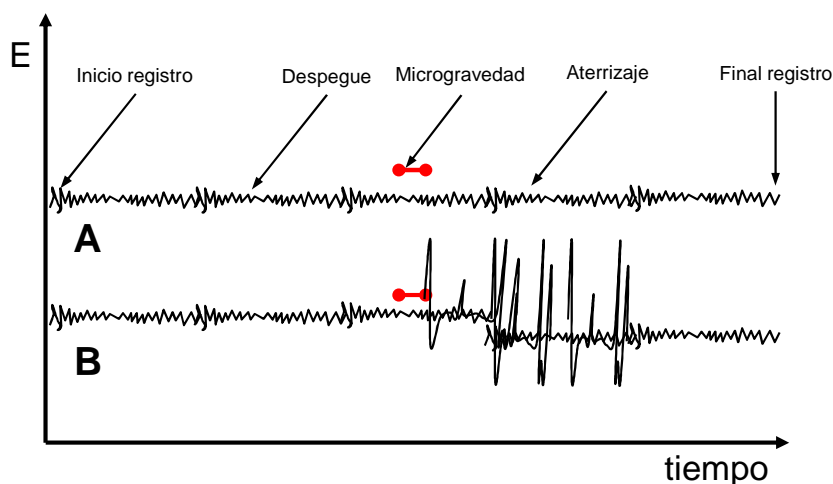


Figura 4.58. Simulación de los resultados esperados en el estudio de microgravedad. **(A)** Caso en el que no se generan burbujas en un sistema donde continuamente está midiendo amonio. **(B)** Caso en el que al alcanzar las condiciones de microgravedad se generan burbujas que alteran la señal hasta que son finalmente evacuadas.

Puesto que para llevar a cabo estas pruebas, el peso, el volumen y la energía consumidas son factores limitantes, se tuvo que rediseñar el microanalizador y el montaje experimental con el fin de adaptarlo a las condiciones experimentales requeridas.

4.3.6.1. Montaje experimental

El montaje experimental fue dividido en tres partes (Figura 4.59): el microsistema analítico, el sistema de propulsión y el sistema de adquisición y tratamiento de datos.

El sistema de propulsión fue modificado y rediseñado con la finalidad de sustituir las bombas peristálticas y válvulas convencionales por elementos propulsores menos voluminosos y que no requirieran consumo de energía. De esta manera, se eligieron bombas autónomas de perfusión de fármacos que se usan, sobretudo, en tratamientos oncológicos (Dosifuser, Leventon, España). Estas, además de ser el elemento de propulsión, actuarían también como sistemas de almacenamiento de las disoluciones que se iban a propulsar, por lo que la reducción de peso y volumen alcanzada con este cambio fue notoria. Su funcionamiento es muy sencillo. Consisten en un globo de un material elastomérico resistente a disoluciones agresivas (ácidos y bases) el cual se llena con la disolución que se quiere propulsar mediante una jeringa Luer-Lock. Una vez llenado, el propio material trata de recobrar su posición original dispensando su contenido a través de unos canales de

manera constante y reproducible. En función del tipo de elastómero usado, del tamaño del globo y del tamaño de los canales de salida de cada bomba, el caudal impulsado por esta y el tiempo de aplicación de este caudal serán diferentes. Existe una amplia gama de bombas con volúmenes y tiempos de duración muy diferentes. Para este caso, se escogieron dos bombas diferentes con la finalidad de emular los caudales aplicados en el microanalizador inicial. De esta manera se usó un Dosifuser de 65 mL de capacidad, con $400 \mu\text{L min}^{-1}$ de caudal, para el canal de la disolución aceptora de Tris y otro de 65 mL de capacidad, con caudal de $800 \mu\text{L min}^{-1}$, para la disolución de donadora de NaOH o de NaOH con $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$. Los desechos de las disoluciones fueron recogidos en dos bolsas de plástico de suero vacías selladas herméticamente, conectadas, mediante agujas hipodérmicas, con las salidas del microanalizador.

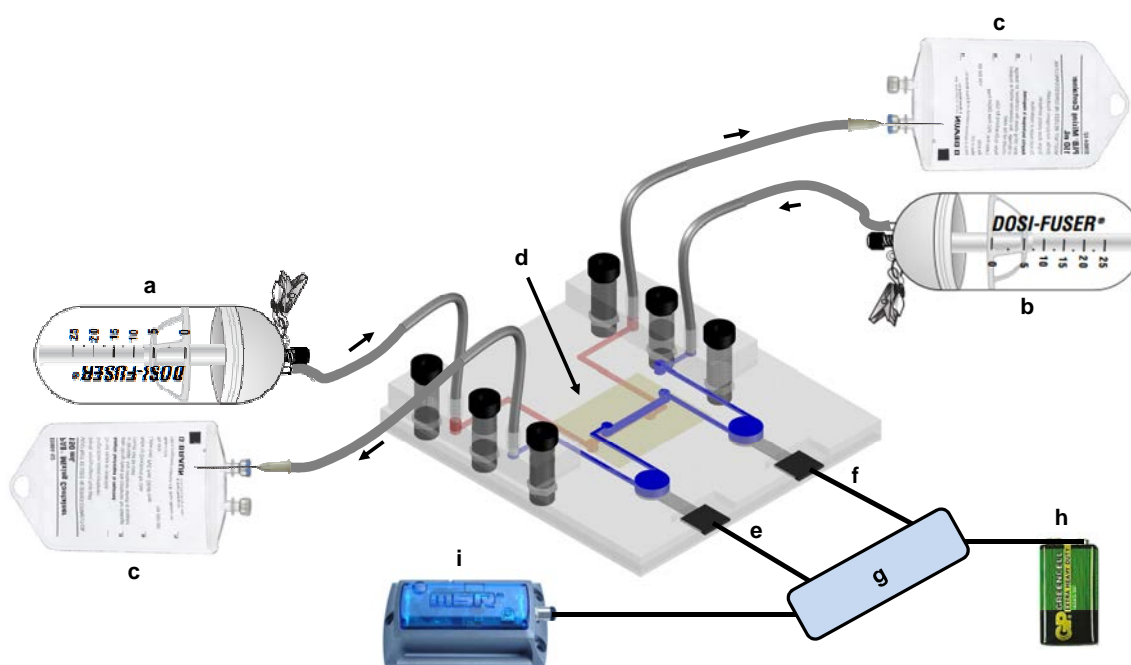


Figura 4.59. Esquema del montaje experimental para realizar las pruebas en condiciones de microgravedad. (a) bomba de impulsión de $800 \mu\text{L min}^{-1}$ de caudal cargada con NaOH o con NaOH + $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ (según la prueba a realizar); (b) bomba de impulsión de $400 \mu\text{L min}^{-1}$ de caudal cargada con Tris 0.01 M pH 7.4; (c) bolsas vacías para recoger los desechos; (d) membrana de difusión gaseosa; (e) electrodo selectivo de amonio actuando como electrodo indicador; (f) electrodo selectivo de amonio actuando como electrodo de referencia; (g) potenciómetro hecho a medida miniaturizado; (h) pila; (i) registrador de datos autónomo.

La electrónica asociada a la adquisición y al tratamiento de datos también fue escogida para minimizar el tamaño, el peso y el consumo de energía del montaje experimental global. De esta manera, se usó un potenciómetro hecho a medida (TMI, Barcelona, España) para adquirir la señal generada por los ESI y procesarla en información útil, la cual fue almacenada en un registrador de datos (MSR, Suiza). Posteriormente, mediante volcado de la información del registrador en un PC, esta se pudo interpretar con un software dedicado. El potenciómetro fue el

único elemento de todo el montaje experimental que necesitó de alimentación eléctrica, proporcionada en este caso por una pila de 9V. Por su parte, el registrador de datos integraba una batería que se carga cuando se conecta al PC. Este, también integraba acelerómetro en los 3 ejes, barómetro y sensor de temperatura.

La figura 4.60 muestra las imágenes reales del montaje experimental utilizado. Como se puede apreciar, los diferentes elementos se montaron en un soporte metálico con un separador, colocando a un lado (A y B) los elementos electrónicos y al otro lado (C) los elementos fluidicos. Los elementos fluidicos fueron colocados a la misma altura y en el mismo eje de manera que se minimizasen los cambios de caudal provocados por los cambios de aceleración, reduciéndose así la distorsión de las medidas.

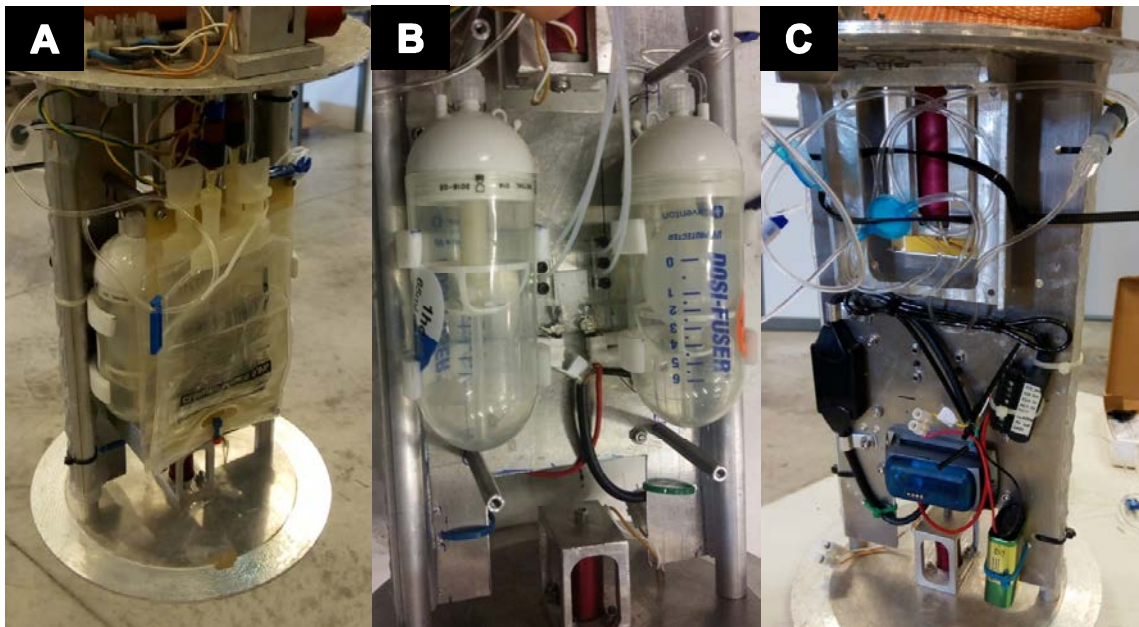


Figura 4.60. Imágenes del montaje experimental real montado para ser introducido en la ojiva del cohete. **A)** imagen general. **B)** parte con la fluidica y el prototipo analítico. **C)** parte con la electrónica del sistema de adquisición de datos.

4.3.6.2. Diseño de la plataforma microfluídica

El microanalizador para las pruebas de microgravedad fue fabricado de forma análoga al desarrollado previamente. El diseño de este nuevo microanalizador (Figura 4.61.A) estaba formado por cinco capas: 2 placas de 300 μm de grosor (Topas 5013) (“a” y “e”), 2 capas de 1 mm de grosor (Topas 5013) (“b” y “d”) y una de 50 μm de grosor (Topas 8007) “c”, más 4 láminas de 25 μm (Topas 8007) previamente laminadas sobre cada capa de Topas 5013. Las dimensiones del microanalizador fueron 31 x 34 x 2.7 mm y su peso total fue de 3.4 g. Las dimensiones de los canales fueron de 0.4 mm de ancho por 0.3 mm de alto y el

diámetro de cada una de las cámaras de detección fue de 3.5 mm. Las dimensiones de los canales del módulo de difusión fueron de 1 mm de ancho, por 0.1 mm de alto y 1 cm de largo. El volumen muerto de la cámara de detección y del microsistema total fue de 8 y 39 μL , respectivamente.

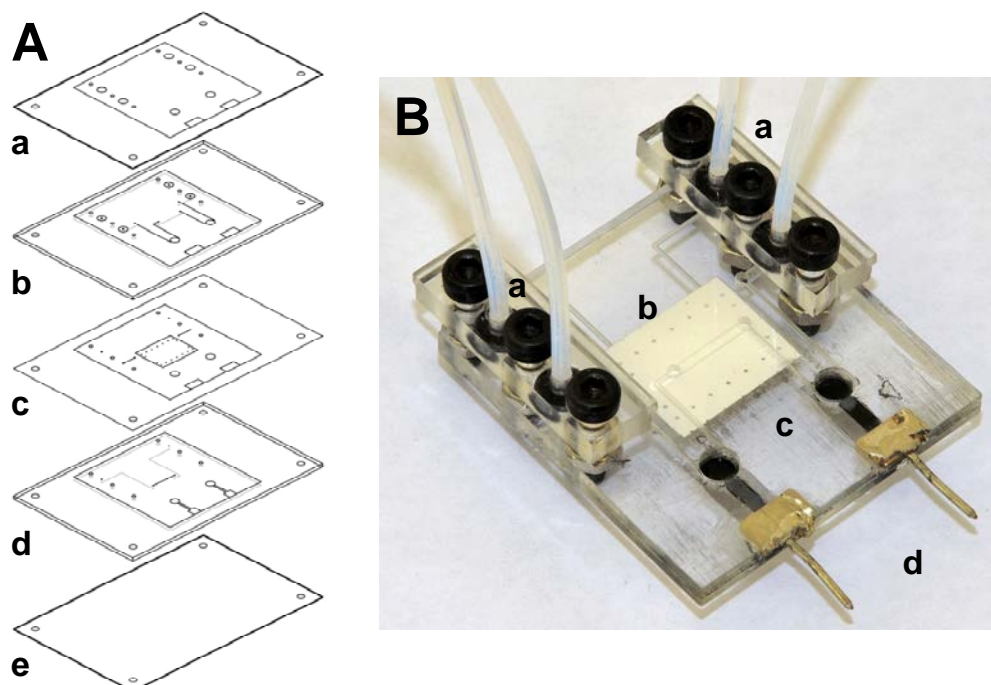


Figura 4.61. Microsistema desarrollado para hacer las pruebas en condiciones de microgravedad. **A)** diseño por capas del prototipo. En negro motivos sobre la capa, en gris motivos mecanizados por la parte de debajo de la capa. **B)** Imagen real del microsistema desarrollado: (a) conectores fluidicos; (b) membrana de difusión gaseosa; (c) ESIs; (d) conectores eléctricos.

Con la finalidad de reducir el volumen ocupado por el microanalizador y el consumo de reactivos, así como la generación de desechos, se decidió rediseñar por completo el microdispositivo analítico (Figura 4.61.B). En primer lugar, se cambió el concepto de sistema de detección. De esta manera, en vez de usar un sistema potenciométrico tradicional, con un electrodo de referencia de Ag/AgCl (que requiere una disolución auxiliar de KCl extra para mantener su potencial constante) y un electrodo selectivo de ión amonio, se decidió usar un sistema de detección formado por dos electrodos selectivos de amonio, uno actuando como electrodo de referencia y otro como electrodo indicador. En esta nueva versión, ambos ESI fueron colocados en serie en el canal de la disolución aceptora de Tris 0.01 M a pH 7.4 (Figura 4.59), pero uno antes del módulo de difusión (el electrodo de referencia) y el otro después del módulo de difusión (electrodo indicador). De esta manera, el electrodo de referencia siempre mediría un potencial constante fruto de medir la disolución acondicionadora, mientras que el electrodo indicador, al recibir los iones amonio difundidos en forma de amoníaco a través de la membrana de difusión gaseosa, mediría un cambio en el potencial, el cual se

correlacionaría con la concentración de este analito en la disolución del canal donador (que contendría NaOH 0.05 M solo o NaOH 0.05 M y 10 mg L⁻¹ NH₄⁺, según el tipo de ensayo).

Gracias a esta modificación se pudo reducir considerablemente el volumen y el peso del sistema experimental en general, ya que se eliminó el recipiente con la disolución auxiliar de KCl y el sistema de impulsión correspondiente.

Con el fin de compactar el microanalizador, se redujo, de forma considerable, el tamaño del módulo de difusión. Puesto que lo que se pretendía observar en este caso eran pequeñas variaciones en la señal que pudieran aparecer durante los pocos segundos de microgravedad, fruto de la formación de burbujas, y no la variación en términos absolutos del potencial medido, se decidió disminuir la longitud de los microcanales del módulo de difusión. De esta manera, al reducir la longitud de los canales que conectan el módulo de difusión con el ESI, que actúa como electrodo indicador, y el área efectiva de difusión, se consiguió disminuir el efecto de dilución del analito en la disolución aceptora, favoreciendo de esta manera también la capacidad de discernir entre pequeños cambios en el porcentaje de difusión de analito.

Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones extremas. Antes y después de alcanzar las condiciones de microgravedad, el microanalizador y el resto de componentes del montaje experimental (electrónica y sistema de propulsión de líquidos) estuvieron sujetos a grandes aceleraciones y desaceleraciones. Estas condiciones podían comportar por sí mismas alteraciones en la señal del ESI, por lo que se realizaron dos tipos de pruebas. La primera consistió en realizar el experimento sin difusión de amonio. De esta manera se realizó un experimento a modo de referencia para identificar las alteraciones de la señal que venían provocadas por factores ajenos a la formación de burbujas debido a la difusión de amoníaco. En este caso la disolución donadora, como es evidente, no contenía amonio, tan solo NaOH 0.05 M. La segunda prueba consistió en realizar el experimento de microgravedad con difusión de amonio. Para ello se utilizó una disolución donadora que contenía NaOH 0.05 M y 10 mg L⁻¹ NH₄⁺.

4.3.6.3. Ensayos en condiciones de microgravedad

El test realizado con el cohete de aerodelismo (Figura 4.62.A) fue llevado a cabo en un campo de lanzamiento autorizado situado en Alcolea de Cinca, Huesca, debido a que la altura alcanzada por el cohete superaba los 1000 metros de altitud y el espacio aéreo debía ser restringido.

Esta prueba consistió en lanzar el cohete con todo el montaje experimental funcionando, de manera que una vez que todo el combustible se agotara y el cohete

perdiera toda su inercia, el sistema entraría en una región de microgravedad (identificada cuando los valores del acelerómetro en los tres ejes fueran cercanos a 0 G) que es la que nos interesaba evaluar. Posteriormente, el cohete empezaría a descender y cuando los barómetros asociados al cohete detectaran que este estaba descendiendo, se accionaría el sistema de liberación de paracaídas que permitiría la recuperación del cohete, y de su carga, de manera controlada. Una vez recuperada la información, si la señal obtenida durante el periodo de microgravedad no se veía alterada con repentinos picos o alteraciones, se consideraría que no se generaban burbujas en condiciones de microgravedad.

La intención fue realizar, en primer lugar, un lanzamiento sin amonio en la disolución donadora para tener una señal de referencia y posteriormente realizar una serie de lanzamientos con amonio. De este modo, se podría confirmar si las distorsiones (si las hubiera) eran debidas o no a un fenómeno relacionado con la difusión de amoníaco.



Figura 4.62. Imágenes de los experimentos realizados: **A)** momento del lanzamiento del cohete. **B)** momento de uno de los lanzamientos del montaje experimental al vacío, a modo de “puenting”.

Desgraciadamente, en el primer lanzamiento de referencia hubo un problema en el sistema de eyección de los paracaídas que provocó la caída descontrolada y el posterior choque del cohete y del montaje experimental contra el suelo. El registrador de datos se pudo recuperar intacto, pero tanto el resto de elementos del montaje experimental como el cohete, quedaron inservibles. Por este motivo, las pruebas de microgravedad se tuvieron que continuar utilizando el método de la caída al vacío del montaje experimental desde gran altura. (Figura 4.62.B). En este caso, los test se llevaron a cabo con el asesoramiento técnico y con la ayuda de

expertos de la empresa Catalonia Adventures, que proporcionaron el lugar de lanzamiento (un puente de 30 metros de caída situado en Sant Sadurní d'Anoia, España) y todo el material para llevar a cabo los lanzamientos, estilo “puenting”, con seguridad. De esta manera se realizaron 10 lanzamientos de referencia y 10 lanzamientos con amonio.

En la figura 4.63 se muestra el registro de la señal y de los acelerómetros del único experimento que se pudo realizar con el cohete (sin difusión de amoníaco). Como se puede observar, todo fue perfectamente hasta el momento en que falló la apertura de los paracaídas (Figura 4.63.e), momento en el que los acelerómetros marcaron valores muy altos en todas direcciones y la señal del ESI mostró considerables perturbaciones. Hasta entonces se había conseguido unos resultados satisfactorios, con un tiempo de microgravedad de 3.3 segundos (Figura 4.63.d), observándose una variación de la señal del microanalizador durante este tiempo de ± 0.5 mV, por lo que los resultados eran altamente prometedores.

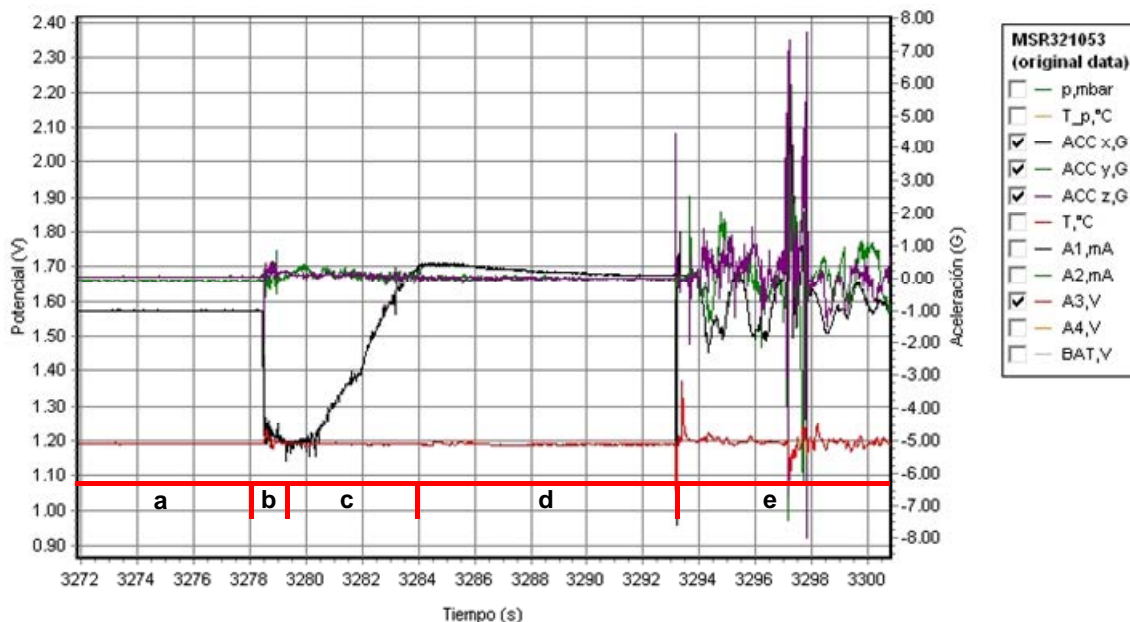


Figura 4.63. Registro de la prueba de microgravedad usando el cohete. (a) momentos en que el cohete está en la plataforma de lanzamiento; (b) lanzamiento del cohete; (c) desaceleración del cohete a medida que el combustible se agota; (d) instantes de microgravedad; (e) caída libre del cohete. Debido a la colocación del registrador respecto a la dirección de desplazamiento, el eje x del acelerómetro corresponde al eje z en el experimento.

Por desgracia no se pudo disponer de más información con este experimento y se tuvo que recurrir a los test de caída al vacío (puenting). En la figura 4.64 se puede observar, a modo de ejemplo, el registro de la señal y de los acelerómetros de uno de los experimentos, en los que se difundía amoníaco, llevados a cabo lanzando el montaje experimental al vacío. Como se puede observar, en este caso al estar sometido a continuas fuerzas de aceleración y desaceleración (lanzamiento, rebotes, recuperación del montaje experimental, etc.), la estabilidad de la señal fue menor.

A pesar de esto, en este caso concreto, se alcanzó un tiempo de 1.3 segundos en condiciones de microgravedad (Figura 4.64.b) observándose una variación de la señal durante este tiempo de ± 2 mV, justo antes de empezar el montaje experimental a zarandearse (Figura 4.64.c), debido a la cuerda que lo sujeta, y a la posterior desaceleración provocada por el rebote inelástico fruto del uso de cuerdas semirrígidas.

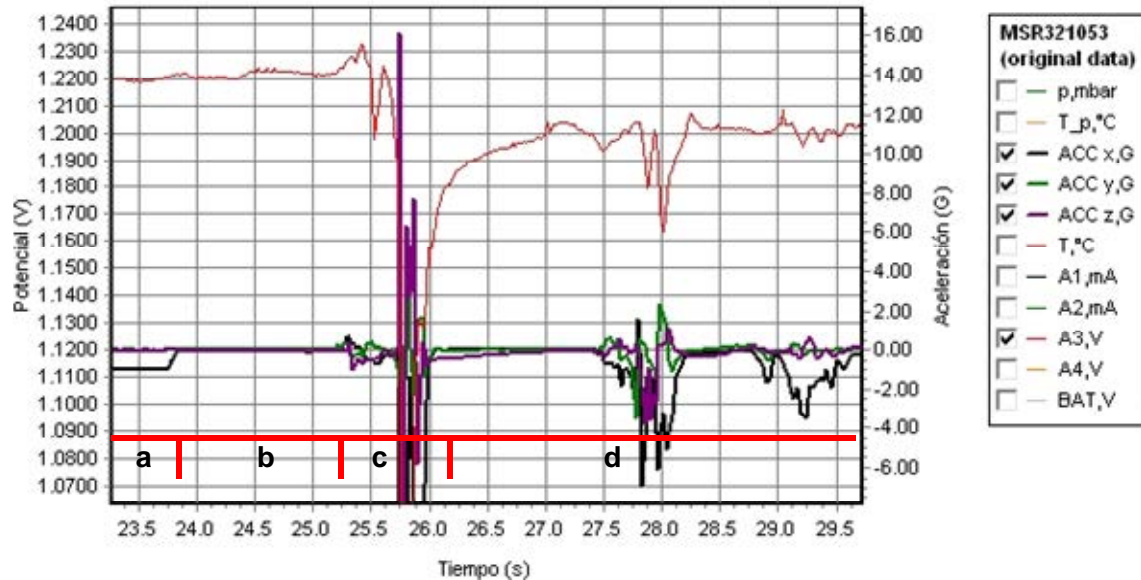


Figura 4.64. Registro de la prueba de microgravedad mediante lanzamiento al vacío (puenting). (a) momentos antes de lanzar el montaje experimental al vacío; (b) momentos de microgravedad mientras cae la estructura al vacío; (c) desaceleraciones bruscas al llegar al máximo de la cuerda; (d) recuperación del montaje subiéndolo, estirando de la cuerda.

A continuación se resumen los resultados obtenidos tanto para los experimentos realizados con el cohete como para los realizados lanzando el montaje experimental al vacío, sin difusión de amoníaco (Tabla 4.9) y con difusión (Tabla 4.10).

Tabla 4.9. Tabla resumen de los resultados obtenidos sin difusión de amonio.

| | Amplitud de ruido máxima (mV) | Tiempo μ -gravedad (s) | Formación de burbujas |
|-----------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Cohete | ± 0.5 | 3.3 | No |
| Puenting | ± 7 | 1.3 - 1.5 | No |

Como se puede observar, los resultados obtenidos mostraron una amplitud de ruido máxima de ± 8.5 mV. Se apreció una mayor variabilidad de la señal en los ensayos con lanzamiento al vacío, debido a las continuas aceleraciones y desaceleraciones a las que el montaje experimental se vio sometido en fracciones de tiempo muy pequeñas. A pesar de todo esto, a partir de los resultados obtenidos se pudo

constatar que no se generaban burbujas en condiciones de microgravedad, ya que en ningún momento aparecieron alteraciones en la señal propias de estas.

Tabla 4.10. Tabla resumen de los resultados obtenidos con difusión de amonio.

| | Amplitud de ruido máxima (mV) | Tiempo μ -gravedad (s) | Formación de burbujas |
|----------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Cohete | - | - | - |
| Puenting | ± 8.5 | 1.2 - 2 | No |

4.3.7. Conclusiones

En esta sección se ha diseñado, fabricado, caracterizado y aplicado al análisis de muestras reales, un prototipo de microanalizador para la determinación potenciométrica de ión amonio, que integra una etapa de difusión gaseosa. El módulo de difusión gaseosa y el sistema de detección han sido concienzudamente optimizados con la finalidad de alcanzar las características analíticas requeridas y maximizar la autonomía operacional y el tiempo de vida, características que serán necesarias en futuras misiones espaciales tripuladas de larga duración. En este sentido, la nueva configuración de los puertos de entrada al módulo de difusión ha permitido un mayor tiempo de vida de las membranas de PVDF y, por tanto, del microanalizador en general. De esta manera, se han demostrado las posibilidades que la tecnología de polímeros ofrece para el desarrollo de analizadores miniaturizados robustos y simples que integran distintas operaciones unitarias como etapas de pretratamiento de muestra y sistemas de detección. Por otra parte, ha sido verificado el buen funcionamiento de este tipo de microsistemas analíticos en condiciones de microgravedad, no observándose la aparición de burbujas que podrían alterar las medidas obtenidas. En este sentido, se ha presentado un sistema de propulsión de fluidos altamente autónomo y miniaturizado, que a su vez demuestra una gran precisión en el caudal aportado. Este tipo de sistemas podrían ser implantados en la futura aplicación. Además se ha demostrado la potencialidad de usar un sistema potenciométrico con dos ESI en serie (uno actuando como electrodo indicador y otro como referencia) en lugar de un sistema potenciométrico tradicional de electrodo de referencia de Ag/AgCl y ESI como electrodo indicador. La aplicación de este sistema de detección ha proporcionado buenos resultados analíticos, a la vez que ha simplificado el proceso de fabricación y ha permitido la reducción del consumo de reactivos.

Las características analíticas del microanalizador, por tanto, cumplen con los requisitos establecidos por la ESA con el objetivo de ser aplicado para la monitorización on-line de amonio en muestras de agua reciclada en futuras misiones espaciales tripuladas.

4.4. Referencias

1. International Space Exploration Coordination Group. *Scientific opportunities enabled by human exploration beyond low-earth orbit*. (2016).
2. Laurini, K. C., Hufenbach, B., Hill, J. & Ouellet, A. The global exploration roadmap and expanding human/robotic exploration mission collaboration opportunities. in *66th International Astronautical Congress* 1–9 (2015).
3. White, R. J., Averner, M., Ames, N. & Field, M. Humans in space. *Nature* **409**, 1115–1118 (2001).
4. Jones, H. W. & Kliss, M. H. Exploration life support technology challenges for the Crew Exploration Vehicle and future human missions. *Adv. Sp. Res.* **45**, 917–928 (2010).
5. Tamponnet, C. *et al.* Water recovery in space. *ESA Bull.* **97**, 56–60 (1999).
6. McEwen, A. S. *et al.* Seasonal flows on warm Martian slopes. *Science* **333**, 740–3 (2011).
7. Lasseur, C. *et al.* Melissa: The European project of closed life support system. *Gravitational Sp. Biol.* **23**, 3–12 (2006).
8. Grigoriev, a. I. *et al.* Regeneration of water at space stations. *Acta Astronaut.* **68**, 1567–1573 (2011).
9. Bobe, L. *et al.* Regenerative water supply for an interplanetary space station: The experience gained on the space stations ‘Salut’, ‘Mir’, ISS and development prospects. *Acta Astronaut.* **61**, 8–15 (2007).
10. Focht, D. D. & Chang, A. C. Nitrification and Denitrification Processes Related to Waste Water Treatment. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 153–186 (1975).
11. Chumbimuni-Torres, K. Y. & Kubota, L. T. Simultaneous determination of calcium and potassium in coconut water by a flow-injection method with tubular potentiometric sensors. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 225–230 (2006).
12. Komaba, S. *et al.* Flow injection analysis of potassium using an all-solid-state potassium-selective electrode as a detector. *Talanta* **46**, 1293–1297 (1998).
13. Chamarro, J. A. & Bartrolí, J. Sequential determination of calcium and nitrate ions in waters by potentiometric flow injection. *Analyst* **118**, 1527–1532 (1993).
14. Hassan, S. S. M., Sayour, H. E. M. & Al-Mehrezi, S. S. A novel planar miniaturized potentiometric sensor for flow injection analysis of nitrates in wastewaters, fertilizers and pharmaceuticals. *Anal. Chim. Acta* **581**, 13–18 (2007).
15. Lemos, S. G. *et al.* In-soil potassium sensor system. *J. Agric. Food Chem.* **52**,

- 5810–5 (2004).
16. Garcia, C. A. B., Júnior, L. R. & Neto, G. de O. Determination of potassium ions in pharmaceutical samples by FIA using a potentiometric electrode based on ionophore nonactin occluded in EVA membrane. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**, 11–18 (2003).
 17. Zárata, N., Irazu, E., Araújo, a N., Montenegro, M. C. B. S. M. & Pérez-Olmos, R. Simultaneous determination of potassium and nitrate ions in mouthwashes using sequential injection analysis with potentiometric detection. *Anal. Sci.* **24**, 803–7 (2008).
 18. Jianhan, L., Maohua, W., Mao, Z. & Yane, Z. Development and modelling of a soil nitrate and potassium simultaneous rapid detection system based on ion selective electrodes. *New Zeal. J. Agric. Res.* **50**, 635–640 (2007).
 19. Ibanez-Garcia, N. *et al.* Continuous Flow Analytical Microsystems Based on Low-Temperature Co-Fired Ceramic Technology. Integrated Potentiometric Detection Based on Solvent Polymeric Ion-Selective Electrodes. *Anal. Chem.* **78**, 2985–2992 (2006).
 20. Ibáñez-García, N., Alonso, J., Martínez-Cisneros, C. S. & Valdés, F. Green-tape ceramics. New technological approach for integrating electronics and fluidics in microsystems. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 24–33 (2008).
 21. Parra Godayol, A. A la recerca d'un sensor d'o-fosfat per al monitoratge directe de nutrients en sols i altres aplicacions en els camps agroalimentari i mediambiental (Tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2007).
 22. Knoll, M., Cammann, K., Dumschat, C., Eshold, J. & Sundermeier, C. Micromachined ion-selective electrodes with polymer matrix membranes. *Sensors Actuators B Chem.* **21**, 71–76 (1994).
 23. Ibáñez-García, N. *et al.* Biparametric Potentiometric Analytical Microsystem Based on the Green Tape Technology. *Electroanalysis* **22**, 2376–2382 (2010).
 24. Zhang, X. F., Zhang, J. & Liu, L. Fluorescence properties of twenty fluorescein derivatives: Lifetime, quantum yield, absorption and emission spectra. *J. Fluoresc.* **24**, 819–826 (2014).
 25. Alegret, S., Alonso, J., Bartroli, J. & Martinez-fabregas, E. Flow Injection System for On-line Potentiometric Monitoring of Ammonia in Freshwater Streams. *Analyst* **114**, 1443–1447 (1989).
 26. Gallardo, J. *et al.* An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 248–256 (2003).
 27. Ibáñez-García, N. Miniaturización de analizadores químicos mediante la tecnología LTCC (Tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona,

- 2007).
28. Fonseca Ortiz, O. Desarrollo de un analizador automático para la determinación del ion plomo en muestras medioambientales (Tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2003).
 29. Liu, R.-M., Liu, D.-J. & Sun, A.-L. Potentiometric detection in flow injection without use of a conventional reference electrode. *Analyst* **117**, 1335–1337 (1992).
 30. Alonso-Chamarro, J. Diseño y construcción de detectores potenciométricos para FIA. Aplicación al análisis multiparamétrico en FIA (Tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 1987).
 31. Barquero, E. Disseny, construcció i avaluació d'analitzadors per a la monitorització mediambiental (Tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2001).
 32. Campanella, L. *et al.* Sensitive membrane ISFETs for nitrate analysis in waters. *Sensors Actuators B. Chem.* **27**, 329–335 (1995).
 33. Ammann, D., Chao, P. & Simon, W. Valinomycin-based K⁺ selective microelectrodes with low electrical membrane resistance. *Neurosci. Lett.* **74**, 221–226 (1987).
 34. Umezawa, Y., Bühlmann, P., Umezawa, K., Tohda, K. & Amemiya, S. Potentiometric Selectivity Coefficients of Ion-Selective Electrodes. Part I. Inorganic Cations (Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **72**, 1851–2082 (2000).
 35. Umezawa, Y., Umezawa, K. & Sato, H. Selectivity coefficients for Ion-Selective Electrodes: recommended methods for reporting K_{A,B}pot values. *Pure Appl. Chem.* **67**, 507–518 (1995).
 36. Lindner, E. & Umezawa, Y. Performance evaluation criteria for preparation and measurement of macro- and microfabricated ion-selective electrodes (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **80**, 85–104 (2008).
 37. Birke, M. *et al.* Determination of major and trace elements in European bottled mineral water - Analytical methods. *J. Geochemical Explor.* **107**, 217–226 (2010).
 38. Michalski, R. Ion chromatography as a reference method for determination of inorganic ions in water and wastewater. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **36**, 107–127 (2006).
 39. Rice, E. W., Baird, R. ., Eaton, A. D. & Clesceri, L. S. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods* (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012).

40. Utiérrez, M. A. G. *et al.* Nutrient Solution Monitoring in Greenhouse Cultivation Employing a Potentiometric Electronic Tongue. 1810–1817 (2008).
41. Dimitrakopoulos, L. T. & Dimitrakopoulos, T. Evaluation of a four sensor array used in a wall-jet configured flow cell for flow injection potentiometry. *Electroanalysis* **13**, 161–163 (2001).
42. Feres, M. A., Fortes, P. R., Zagatto, E. A. G., Santos, J. L. M. & Lima, J. L. F. C. Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications. *Anal. Chim. Acta* **618**, 1–17 (2008).
43. Rocha, F. R. P., Infante, C. M. C. & Melchert, W. R. A Multi-purpose Flow System Based on Multi-commutation. *Spectrosc. Lett.* **39**, 651–668 (2006).
44. Lima, J. L. F. C., Santos, J. L. M., Dias, A. C. B., Ribeiro, M. F. T. & Zagatto, E. A. G. Multi-pumping flow systems: An automation tool. *Talanta* **64**, 1091–1098 (2004).
45. Ymbern, O. *et al.* Versatile Lock and Key Assembly for Optical Measurements with Microfluidic Platforms and Cartridges. *Anal. Chem.* **87**, 1503–1508 (2015).
46. Ymbern, O., Sández, N., Calvo-López, A., Puyol, M. & Alonso-Chamarro, J. Gas diffusion as a new fluidic unit operation for centrifugal microfluidic platforms. *Lab Chip* **14**, (2014).
47. Gómez-De Pedro, S. *et al.* Optical microfluidic system based on ionophore modified gold nanoparticles for the continuous monitoring of mercuric ion. *Sensors Actuators, B Chem.* **194**, 19–26 (2014).
48. Schelcher, G. *et al.* Cyclic olefin copolymer plasma millireactors. *Lab Chip* **14**, 3037–42 (2014).
49. Do, J. & Ahn, C. H. A polymer lab-on-a-chip for magnetic immunoassay with on-chip sampling and detection capabilities. *Lab Chip* **8**, 542–549 (2008).
50. Lee, D.-S., Yang, H., Chung, K.-H. & Pyo, H.-B. Wafer-scale fabrication of polymer-based microdevices via injection molding and photolithographic micropatterning protocols. *Anal. Chem.* **77**, 5414–20 (2005).
51. ASTM International. *Standard Practice for Evaluating Ink or Coating Adhesion to Flexible Packaging Materials Using Tape (F2252)*. (2003).
52. Jin, M., Xu, J., Jiang, L., Xu, Y. & Chu, H. Investigation on the performance characteristics of chloride selective electrode in concrete. *Ionics (Kiel)*. **21**, 2981–2992 (2015).
53. Martínez-Cisneros, C. S. *Microsistemas Analíticos Basados en la Tecnología LTCC. Diseño, fabricación, integración y evaluación de plataformas microfluídicas y electrónicas (Tesis doctoral)*. (Universitat Autònoma de

- Barcelona, 2010).
54. da Rocha, Z. M. *et al.* Compact and autonomous multiwavelength microanalyzer for in-line and in situ colorimetric determinations. *Lab Chip* **12**, 109 (2012).
 55. Yao, M., Tu, W., Chen, X. & Zhan, C.-G. Reaction pathways and free energy profiles for spontaneous hydrolysis of urea and tetramethylurea: unexpected substituent effects. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 7595–605 (2013).
 56. Shen, S., Li, M., Li, B. & Zhao, Z. Catalytic hydrolysis of urea from wastewater using different aluminas by a fixed bed reactor. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 12563–12568 (2014).
 57. Cerda, A., Oms, M. T., Forteza, R. & Cerda, V. Evaluation of Flow-Injection Methods for Ammonium Determination in Waste-Water Samples. *Anal. Chim. Acta* **311**, 165–173 (1995).
 58. Lima, J. L. F. C., Rangel, A. O. S. S. & Souto, M. R. S. Flow injection system with gas diffusion for the sequential determination of total nitrogen and phosphorus in vegetables. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **358**, 657–662 (1997).
 59. Oliveira, S. M., Lopes, T. I. M. S., Tóth, I. V. & Rangel, A. O. S. S. A multi-commuted flow injection system with a multi-channel propulsion unit placed before detection: Spectrophotometric determination of ammonium. *Anal. Chim. Acta* **600**, 29–34 (2007).
 60. Oliveira, S. M., Marques da Silva Lopes, T. I., Tóth, I. V. & Santos Silva Rangel, A. O. Determination of ammonium in marine waters using a gas diffusion multicommutated flow injection system with in-line prevention of metal hydroxides precipitation. *J. Environ. Monit.* **11**, 228–234 (2009).
 61. Oms, M. T., Cerda, A., Cladera, A., Cerda, V. & Forteza, R. Gas diffusion techniques coupled sequential injection analysis for selective determination of ammonium. *Anal Chim Acta* **318**, 251–260 (1996).
 62. Van der Linden, W. Membrane separation in flow injection analysis:: Gas Diffusion. *Anal. Chim. Acta* **151**, 359–369 (1983).
 63. Martelli, P. B. *et al.* Sequential analyte removal in flow analysis: determination of nitrogen, phosphorus and potassium in fertilizers. *Anal. Chim. Acta* **317**, 239–245 (1995).
 64. Shen, H., Cardwell, T. J. & Cattrall, R. W. Determination of Ammonia in Waste Waters by a Differential pH Method Using Flow Injection Potentiometry and a Nonactin-Based Sensor. **122**, 89–93 (1997).
 65. Lima, J. L. F. C., Montenegro, M. C. B. S. M. & Pinto, A. P. M. M. O. Determination of total nitrogen in food by flow injection analysis (FIA) with a potentiometric differential detection system. *Fresenius. J. Anal. Chem.*

- 364**, 353–357 (1999).
66. Joslyn, M. A. in *Methods in Food Analysis* 281–303 (Academic Press, 1950).
 67. Yuan, Y. & Lee, T. R. in *Surface Science Techniques* (eds. Bracco, G. & Holst, B.) 3–34 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
 68. Hall, P. O. J. & Aller, R. C. Rapid, small volume, flow injection analysis for CO₂ and NH₄⁺ in marine and freshwaters. *Limnol. Ocean.* **37**, 1113–1119 (1992).
 69. Mertens, J., Vandenwi.P & Massart, D. L. Use of an Ammonium Selective Electrode for Automatic Determination of Ammonia in Boiler Feed-Waters. *Anal. Lett.* **6**, 81–88 (1973).
 70. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (American Public Health Association, 2015).
 71. Sabbatini, M. *ESA User Guide to Low Gravity Platforms*. (2014).