



**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 5

Otras aplicaciones del microsistema analítico para la monitorización de ión amonio

El ión amonio no solo es un parámetro importante a tener en cuenta en procesos de reciclado de agua en misiones espaciales tripuladas, tal y como se ha explicado en el capítulo anterior (§4.3). En la Tierra, su importancia radica, tanto en disoluciones acuosas como en fluidos biológicos, en que es un protagonista destacado del ciclo del nitrógeno y está involucrado en una gran cantidad de procesos químicos, tanto naturales como antropogénicos.^{1,2}

Por una parte, como ya es conocido, es un indicador de la calidad del agua y de los ecosistemas acuáticos en general, estando relacionado con procesos de degradación como la eutrofización. Esto se debe a que es un nutriente limitante del crecimiento de plantas y algas.^{1,3} También es un compuesto tóxico para la vida de los peces, debido a que dificulta la correcta eliminación de su propio amonio metabolizado.² Por lo que respecta a agua de consumo, concentraciones de amonio por encima de 0.2 mg L⁻¹ pueden hacer inefectiva la desinfección por cloración, mientras que valores entre 1.5 y 35 mg L⁻¹ afectan a sus propiedades organolépticas.^{1,6,7}

En cuanto al ser humano, una intoxicación aguda provocada por una ingesta de amonio en grandes cantidades, o derivada de problemas metabólicos, puede acarrear edema pulmonar, disfunción del sistema nervioso, acidosis, daño renal e incluso, en casos extremos, puede conducir a la muerte.^{1,8,9}

Por todo ello, la determinación de amonio, a diferentes niveles de concentración, es de vital importancia en un amplio abanico de campos y áreas de aplicación. Así, existe una demanda real y creciente de microanalizadores confiables y sencillos, que permitan obtener información de dicho parámetro en tiempo real.

Este nuevo capítulo mostrará la extensión del uso del microanalizador descrito en el capítulo anterior (§4.3), previa adecuación de su diseño a las características diferenciales de las nuevas muestras y procesos que se propone monitorizar.

5.1. Determinación de amonio en aguas residuales, tanto industriales como urbanas, y en agua potable.

La legislación recomienda una concentración límite de amonio en agua potable de 0.5 mg L^{-1} y de entre 10 y 50 mg L^{-1} en efluentes de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) descargados a cuerpos de agua, aunque la concentración de amonio en sus afluentes puede rondar entre los 10 y los 100 mg L^{-1} , en el caso de EDARs urbanas, y entre los 10 y 6000 mg L^{-1} (en casos puntuales) en EDARs industriales.^{4,10-14} Por ello, como se ha destacado anteriormente, son necesarios microanalizadores portátiles, autónomos, automáticos y de funcionamiento simple y versátil, que sean capaces de determinar ión amonio en tiempo real en un amplio rango de concentraciones y en una amplia gama de matrices de muestra, no solo a escala de laboratorio sino también a pie de proceso, con la finalidad de optimizar más eficientemente los procesos de tratamiento y asegurar que el agua que se vierte a los cuerpos acuáticos (lagos, ríos, mares, etc.) o se distribuye en la red, cumple con la legislación.³⁻⁵

En esta parte del trabajo se presenta el rediseño y adecuación del microanalizador descrito anteriormente (§4.3) con la finalidad de aplicarlo al análisis de amonio en distintas muestras de naturaleza acuosa procedentes de diferentes procesos, reduciendo el consumo de reactivos y muestra, y el tiempo de análisis obtenidos previamente. Para disminuir, también, el tamaño del instrumental asociado, se miniaturizará el sistema de adquisición y procesado de datos y se implementará un sistema de gestión de fluidos, basado en microbombas y microválvulas como el presentado previamente (§4.2), potenciando, así, la automatización, la autonomía, y la reducción del consumo de energía del sistema analítico global. Mediante el desarrollo de diferentes programas de autocalibración y distintos modos de actuación se posibilitará la adaptación de las características analíticas de todo el equipo a las muestras a analizar, pudiendo monitorizar la concentración de amonio de forma autónoma. El montaje experimental se aplicará al análisis de muestras de agua de la red de distribución y aguas procedentes de distintas etapas de una EDAR, tanto industrial como urbana. Para el desarrollo de esta parte del trabajo se utilizarán los mismos materiales y reactivos que los especificados en el apartado §4.3.1 del capítulo anterior.

5.1.1. Montaje experimental automatizado

La figura 5.1 muestra una ilustración del montaje experimental completo, que ocupó un volumen estimado de $10 \times 30 \times 50 \text{ cm}$, pudiendo funcionar alimentado con energía solar. Estaba dividido en tres partes fundamentales: el microanalizador, el sistema de gestión de fluidos y el sistema de adquisición y procesado de datos.

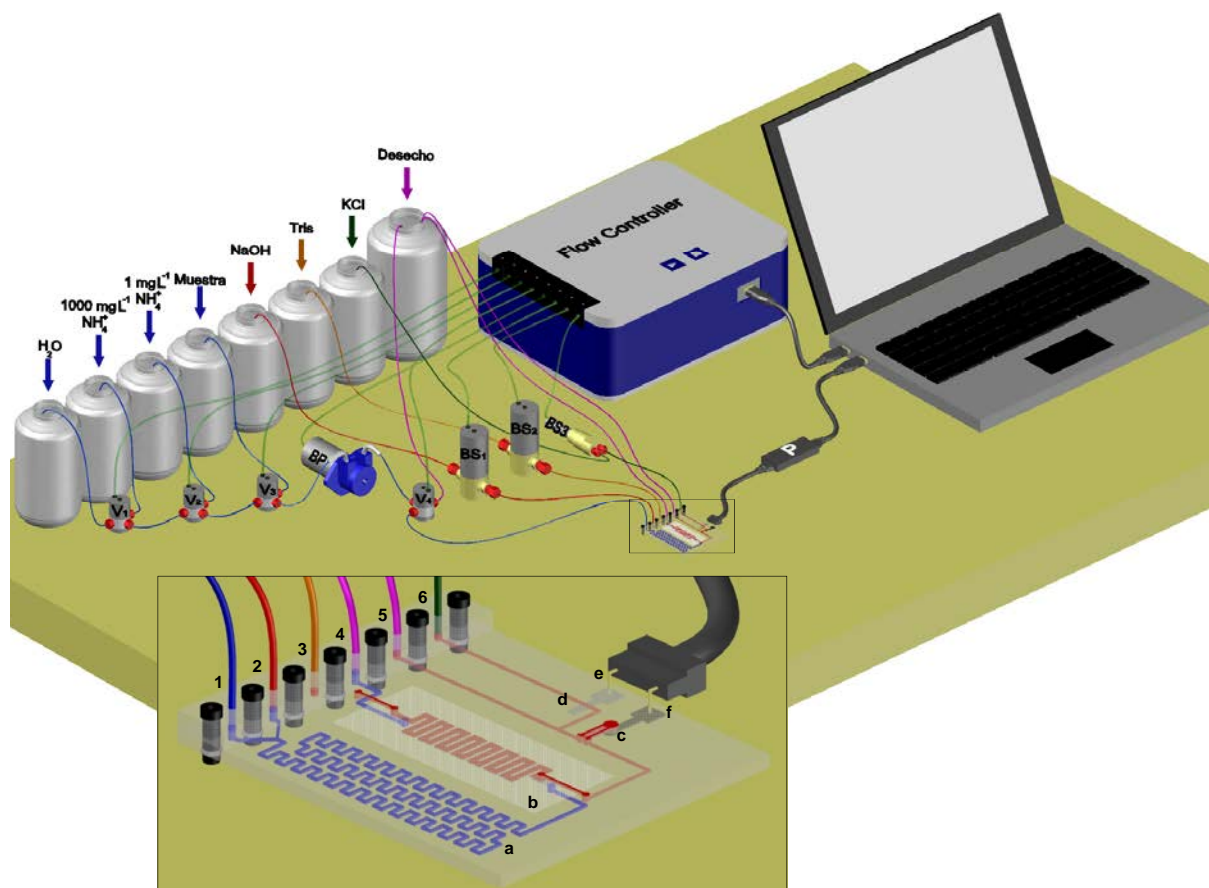


Figura 5.1. Esquema del montaje experimental automatizado y autónomo utilizado: (a) micromezclador; (b) membrana de difusión de PVDF; (c) electrodo selectivo de ión amonio; (d) electrodo de referencia integrado de Ag/AgCl; (e) conector eléctrico del electrodo de referencia; (f) conector eléctrico del electrodo indicador; (Vx) válvula solenoide de tres vías; (BP) microbomba peristáltica; (BSx) microbomba solenoide; (P) potenciómetro hecho a medida. Entradas de líquido al microsistema: (1) subsistema de multiconmutación, (2) NaOH, (3) Tris y (6) KCl. Salidas a desecho: (4) y (5).

El sistema de flujo incluía tres microbombas solenoides -una (Figura 5.1, BS3) de 4 μL por pulso (P/N 030SP124-4TV) y otras dos (Figura 5.1, BS1 y BS2) de 10 μL por pulso (P/N 120SP1210-5TP) (todas de BiochemValve Inc., Montluçon Cedex, Francia)- una microbomba peristáltica (Figura 5.1, BP) (Kamoer KP-S10DGC0, Shanghai, China) con un controlador de revoluciones hecho a medida (TMI, Barcelona, España) y tubo de Tygon® de 0.19 mm de diámetro interno (Ismatec, Wertheim, Alemania), y cuatro microválvulas solenoides de tres vías (Figura 5.1, Vx) (161T031, NResearch, Suiza). Para conectar los distintos elementos fluidicos al microsistema analítico se usó tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno (Scharlab, S.L., Cambridge, Inglaterra). El controlador de dispositivos fluidicos (Flowtest™, Biotray, Francia) con su correspondiente software se usó para programar el proceso de autocalibración mediante multiconmutación y para automatizar el proceso analítico completo sin la necesidad de la intervención del usuario. La adquisición y el procesamiento de datos fueron llevados a cabo

mediante un potenciómetro personalizado (TMI, Barcelona, España) y su propio software. Tanto el controlador de dispositivos fluidicos como el potenciómetro fueron controlados por ordenador.

5.1.2. Rediseño y optimización de la plataforma microfluídica y de las variables hidrodinámicas

El principio de medida del microanalizador fue el mismo que el del apartado anterior (§4.3), aunque se modificó ligeramente el diseño de los elementos microfluídicos para reducir el consumo de reactivos y el tiempo de análisis. También se dotó de mayor robustez a las conexiones eléctricas de los electrodos.

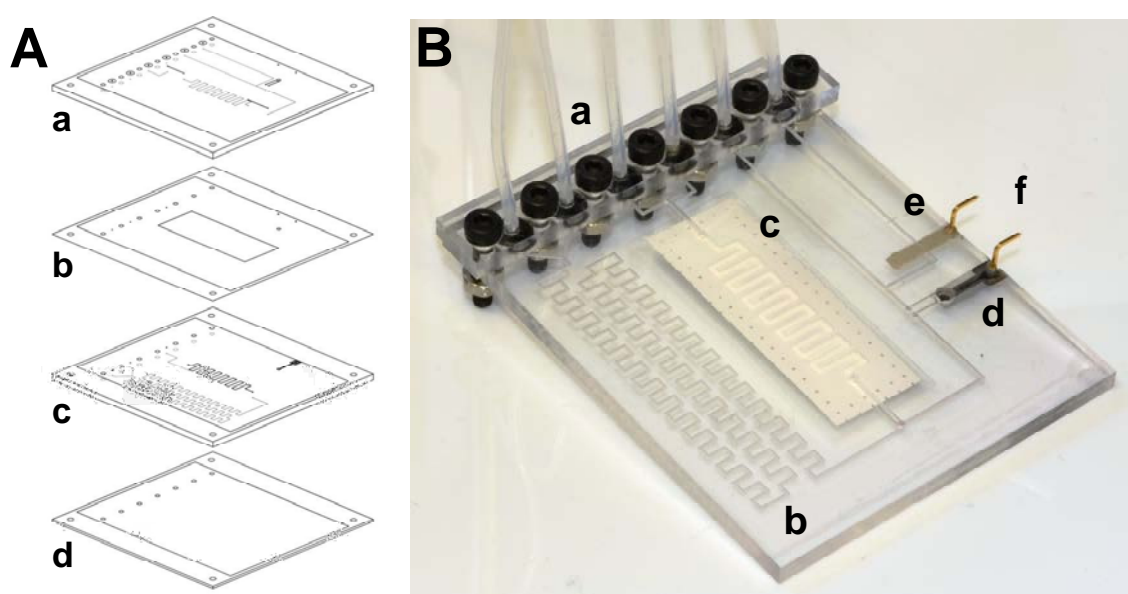


Figura 5.2. A) Diseño por capas del microanalizador. Las capas “a” y “c” tienen motivos mecanizados en ambos lados por bajo-relieve, en la parte superior en color negro y en la parte inferior en color gris. B) Imagen del dispositivo final: (a) conexiones fluidicas; (b) microfluídica; (c) membrana de PVDF; (d) ESI; (e) electrodo de referencia; (f) conexiones eléctricas.

El microanalizador fue fabricado, también, usando como sustrato COC. El diseño del microanalizador (Figura 5.2.A) estaba formado por cuatro capas con motivos mecanizados: 2 placas de 1 mm de grosor (Topas 5013) (a y c), 1 placa de 300 μm de grosor (Topas 5013) (d) y una lámina de 50 μm de grosor (Topas 8007) (b) y 3 láminas de 25 μm (Topas 8007) previamente laminadas sobre cada capa de Topas 8007, de manera que una vez mecanizadas, superpuestas, alineadas y laminadas, constituyeron la estructura en tres dimensiones deseada. Las dimensiones del microanalizador fueron 50 x 65 x 3 mm y su peso total fue de 10 g. 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 2 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. El

volumen muerto de la cámara de detección y del microsistema total fue de 2 y 97 μL , respectivamente. Los conectores eléctricos fueron fijados con una pasta conductora de epoxi-plata CircuitWorks® (Chemtronics, Holanda).

Se testaron diferentes volúmenes de cámara de detección (Figura 5.3), inferiores al utilizado previamente, con la finalidad de reducir el tiempo de análisis y, por tanto, el consumo de reactivos y muestra. Esta reducción se consiguió gracias a que la disminución del volumen total de la cámara disminuyó el volumen de acumulación. Esto facilitó la evacuación rápida y completa de la muestra, reduciendo, así, el tiempo de retorno a línea base.

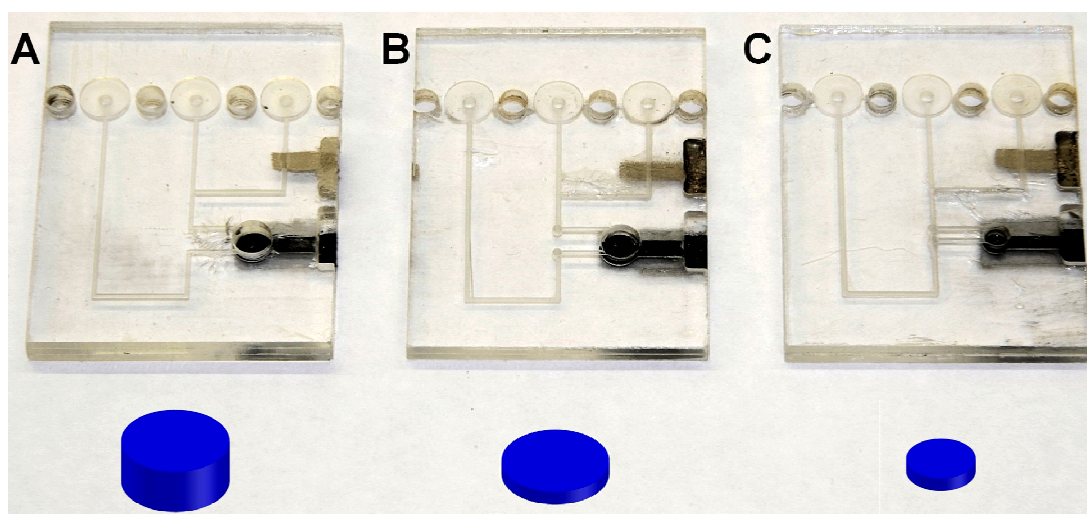


Figura 5.3. Imagen de los módulos de detección potenciométrica fabricados con los 3 diferentes volúmenes de cámara de detección testados, cuyo esquema se indica en color azul para una mejor comparación. **A)** 15 μL ; **B)** 5 μL y **C)** 2 μL

Con un montaje experimental modular, análogo al usado en la figura 4.46, se procedió a evaluar cómo variaban las características de respuesta del microanizador en función del tamaño de cámara usado y de las variables hidrodinámicas empleadas. Para ello se realizaron distintos calibrados variando los parámetros de estudio pero siempre usando una membrana de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro para difundir el analito, como disolución donadora NaOH 0.1 M + EDTA 10^{-3} M, como disolución aceptora Tris 0.01 M a pH 7.4 y como disolución auxiliar KCl 0.1 M.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.1. Se ensayaron una gran variedad de combinaciones de variables con el objetivo de explorar, lo más extensamente posible, las capacidades del microsistema analítico.

A grandes rasgos, se puede observar que, fijados unos parámetros hidrodinámicos, a menor volumen de cámara de detección, menor tiempo de análisis pero también menores alturas de pico que se traducían en LD y LIRL más altos. Lo que puso de

Tabla 5.1. Características analíticas del microanalizador en función del volumen de la cámara de detección y de diferentes parámetros hidrodinámicos.

| Volumen de cámara (μL) | Caudal* ($\mu\text{L min}^{-1}$) | Volumen de inyección (μL) | Rango lineal testado (mg L^{-1}) | LD (mg L^{-1}) | Vuelta a línea base con 100 mg L^{-1} (min) |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|---|---------------------------|---|
| 15 | 400 | 100 | 0.75-1000 | 0.2 | 6 |
| 15 | 400 | 225 | 0.15-500 | 0.07 | 9 |
| 15 | 400 | 325 | 0.075-100 | 0.03 | 11 |
| 15 | 200 | 275 | 0.075-100 | 0.03 | 16 |
| 5 | 400 | 225 | 0.5-100 | 0.08 | 8 |
| 5 | 400 | 325 | 0.075-100 | 0.04 | 9 |
| 2 | 400 | 100 | 1-1000 | 0.3 | 5 |
| 2 | 400 | 225 | 0.5-500 | 0.1 | 6 |
| 2 | 350 | 325 | 0.075-100 | 0.03 | 11 |

*Caudal de cada uno de los canales del sistema, salvo el canal auxiliar de KCl, fijado en $100 \mu\text{L}/\text{min}$.

manifiesto esta tabla fue la enorme versatilidad del sistema analítico, pudiéndolo adaptar a múltiples necesidades, priorizando el rango lineal, el límite de detección, el tiempo de análisis o el consumo de reactivo, todo dependiendo del tipo de muestra a analizar y del contenido de amonio que ésta presentase. También, de esta manera, se puso de manifiesto la potencialidad del microsistema si se integraba en un sistema de gestión de fluidos automatizado. En este sentido, seleccionando un dispositivo analítico, con un volumen de cámara de detección predeterminado, se podrían reconfigurar automáticamente, mediante software, las características analíticas del dispositivo como el rango de trabajo, la sensibilidad y el LD. Para ello, se crearían programas para generar secuencias de autocalibración y muestreo automáticas, mediante la modificación de variables como el caudal y el volumen de inyección.

En cuanto a las interferencias del electrodo selectivo de ión amonio (§4.3.3.4), se evitaron las provocadas por iones como Na^+ o K^+ , pero se mantuvieron las interferencias de las aminas volátiles, que a pH básicos, son capaces de difundir a través de la membrana de PVDF, pudiendo interferir en la respuesta del ESI. En esta ocasión, al analizar muestras de aguas residuales procedentes de EDARs industriales, podría darse el caso de que existiera una interferencia positiva real si las muestras analizadas contuvieran este tipo de compuestos. Este punto habría que valorarlo individualmente para cada aplicación concreta.

5.1.3. Características analíticas del sistema

Como se ha descrito anteriormente, la implementación de un sistema controlado por ordenador de gestión de fluidos versátil, autónomo y automatizado potenciaría la ya de por sí gran versatilidad que presenta el microanalizador, y ayudaría a cumplir los objetivos de esta parte del trabajo. El sistema de gestión de fluidos utilizado consistió en un sistema híbrido que combina microbombas y microválvulas solenoides y una microbomba peristáltica (para hacer las secuencias de dilución), gestionadas por un controlador de dispositivos fluídicos (Flowtest™). Para programar una adecuada secuencia de dilución por multiconmutación se tuvieron que tener en mente diferentes parámetros, como el tiempo de inyección y el tiempo mínimo de actuación de la microválvula solenoide (establecido en 100 ms).¹⁵ Estos parámetros eran los que limitaban el factor de dilución que se podía obtener al diluir una disolución madre de un analito determinado.

Tomando como referencia los resultados obtenidos previamente (§4.2.4), y para garantizar una precisión adecuada de los resultados, se estableció un factor máximo de dilución de 100 (esto es diluir 100 veces la disolución madre). Con la finalidad de cubrir todo el rango de concentraciones, de 0.08 a 1000 mg L⁻¹ NH₄⁺, previamente evaluado en el proceso de optimización del microanalizador (§5.1.2), se utilizaron dos disoluciones madre diferentes (1 y 1000 mg L⁻¹ NH₄⁺) y se programaron dos secuencias de dilución diferentes, con diferente tiempo de inyección y caudal. Así, la primera secuencia (programa 1), permitió la obtención de un rango de trabajo apto para medir concentraciones de amonio bajas (de 0.08 a 10 mg L⁻¹ NH₄⁺), mientras que la segunda secuencia (programa 2), permitió obtener un rango de trabajo apto para medir concentraciones elevadas (de 1 a 1000 mg L⁻¹ NH₄⁺), habituales en procesos de depuración.

Las variables hidrodinámicas escogidas para el programa 1 fueron un caudal de 350 µL min⁻¹ y un tiempo de inyección de 60 s (correspondiente a un volumen de inyección de 350 µL) y para el programa 2, un caudal de 400 µL min⁻¹ y un tiempo de inyección de 20 s (correspondiente a un volumen de inyección de 133 µL).

La tabla 5.2 muestra las diferentes disoluciones estándar preparadas y como fueron generadas mediante los dos programas de dilución. A modo de ejemplo, en el caso del programa 1, cuando se preparó una disolución estándar de 1 mg L⁻¹ NH₄⁺, se introdujo durante todo el tiempo de inyección (60 s en este caso) la disolución madre de 1 mg L⁻¹ NH₄⁺ sin ninguna dilución. Sin embargo, cuando se preparó la disolución de 0.08 mg L⁻¹ NH₄⁺, la secuencia de dilución por multiconmutación introdujo la disolución madre de 1 mg L⁻¹ NH₄⁺ durante 0.1 s y agua durante 1.24 s. De esta manera, a lo largo de los 60 s que duró la inyección se realizaron 48 ciclos de conmutación, consiguiendo el factor de dilución deseado respecto a la disolución madre.

Tabla 5.2. Secuencias de dilución por multiconmutación (programa 1 y 2) utilizados para generar las disoluciones estándar requeridas a partir de dos disoluciones madre de 1 y 1000 mg L⁻¹ NH₄⁺.

| Programa | Disolución estándar (mg L ⁻¹) | A partir de la madre de (mg L ⁻¹) | Tiempo de inyección total (s) | Tiempo en “on” (madre) (s) | Tiempo en “off” (H ₂ O) (s) | Nº ciclos | Factor dilución |
|----------|---|---|-------------------------------|----------------------------|--|-----------|-----------------|
| 1 | 10 | 1000 | 60 | 0.1 | 9.9 | 6 | 100 |
| 1 | 1 | 1 | 60 | 60 | 0 | 1 | 0 |
| 1 | 0.1 | 1 | 60 | 0.1 | 0.9 | 60 | 10 |
| 1 | 0.08 | 1 | 60 | 0.1 | 1.24 | 48 | 12.5 |
| 2 | 1000 | 1000 | 20 | 20 | 0 | 1 | 0 |
| 2 | 100 | 1000 | 20 | 0.1 | 0.9 | 20 | 10 |
| 2 | 10 | 1000 | 20 | 0.1 | 9.9 | 2 | 100 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 20 | 0 | 1 | 0 |

En el caso de que se requiriera medir muestras cuya concentración de amonio pudiera oscilar en un rango tan amplio que hiciera insuficiente el prefijado por cada uno de los dos programas previstos, existiría la posibilidad de combinar ambos automáticamente, usando las dos curvas de calibrado simultáneamente. También sería posible generar nuevos programas para adaptarse a la concentración de amonio esperada en las muestras a analizar. Incluso si se debieran determinar muestras con una concentración de amonio extremadamente alta, sería posible implementar un sistema de dilución automático de la muestra para poder adecuarla a cualquiera de los rangos de trabajo obtenidos. Como se puede apreciar, en función de cada caso, se podría crear un programa de autocalibración a medida de manera muy sencilla mediante un software de interfaz muy intuitivo.

La figura 5.4 muestra, desglosada, la secuencia esquemática de operación de cada uno de los elementos de gestión de fluidos que es necesaria para implementar un caso hipotético de multiconmutación. Este caso consistiría en llenar todo el sistema analítico de reactivos e inyectar tres disoluciones estándar y una muestra usando el programa 1. En la etapa 1, se produce el llenado con la solución madre de 1000 mg L⁻¹ NH₄⁺ hasta la válvula 1. En la etapa 2, se llena con H₂O el sistema hasta la válvula 2. En la etapa 3, la solución madre de 1 mg L⁻¹ NH₄⁺ ocupa su lugar hasta la válvula 2. En la etapa 4 se llena con H₂O hasta la válvula 3. Posteriormente, en la etapa 5, se llena con muestra el canal hasta la válvula 3. En la etapa 6, se llena de H₂O hasta la válvula 4, quedando todo el subsistema de dilución por multiconmutación preparado. Seguidamente, en la etapa 7, se produce el llenado del microsistema con la disolución acondicionadora, H₂O y la disolución auxiliar de KCl hasta la estabilización de la línea base. A partir de la etapa 8, se inicia la inyección de las disoluciones de amonio al microanalizador. En primer lugar, se produce la inyección de una disolución estándar de 1 mg L⁻¹ NH₄⁺ (la disolución

madre es introducida durante los 60 s sin dilución). En la etapa 9, se inyecta una disolución estándar de 10 mg L⁻¹ NH₄ obtenida por una secuencia de dilución por multiconmutación (seis ciclos introduciendo alternadamente 0.1 s disolución madre de 1000 mg L⁻¹ y 9.9 s de agua). En la etapa 10, se inyecta una disolución estándar de 1000 mg L⁻¹ NH₄⁺ (la disolución madre es introducida los 60 s sin dilución). Finalmente en la etapa 11 se inyecta la muestra.

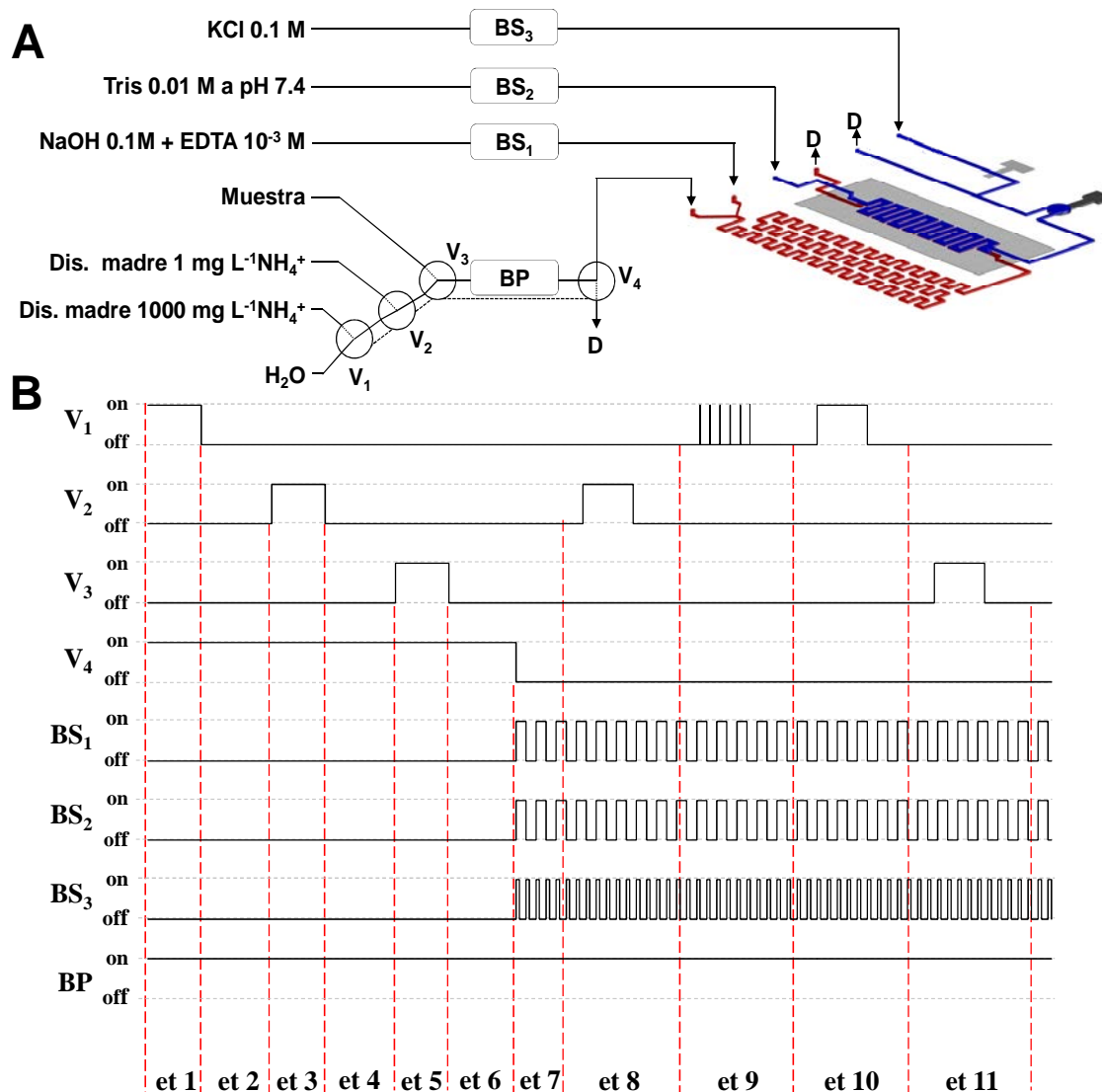


Figura 5.4. A) Esquema del montaje experimental mostrado en la figura 5.1, repetido para mejorar la comprensión de la explicación: (D) desecho. B) Secuencia esquemática de cada elemento de control de fluido: (on) 12 V son aplicados al dispositivo de control de fluido para accionarlo; (off) 0 V son aplicados al dispositivo de control de fluidos para desactivarlo; (V_x) microválvula solenoide de 3 vías; (BS_x) microbomba solenoide; (BP) microbomba peristáltica.

A partir de las diferentes curvas de calibración obtenidas con los programas 1 y 2, se extrajeron las características analíticas de cada configuración. La figura 5.5 muestra el registro de la señal y la correspondiente curva de calibración, obtenida en uno de los experimentos, usando el programa 1 (rango de concentraciones bajas).

La ecuación de Nernst ($n = 4$; 95 % confianza) fue $E = 333 (\pm 4) + 57 (\pm 1) \log [\text{NH}_4^+]$ con $r^2 = 0.9996$. El rango lineal fue de 0.08 a 10 mg L⁻¹ NH₄⁺. El LD, obtenido de acuerdo con el procedimiento propuesto por la IUPAC¹⁶, fue 0.03 mg L⁻¹ NH₄⁺.

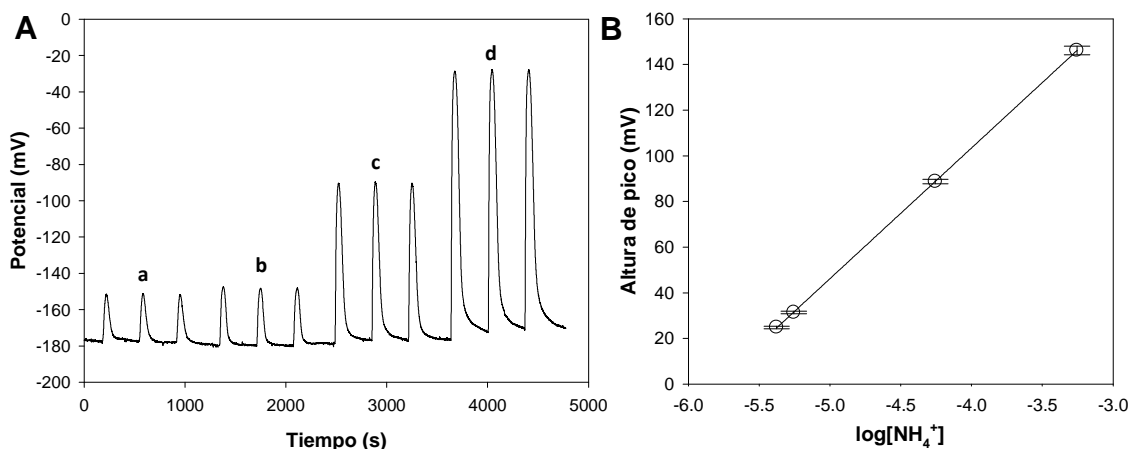


Figura 5.5. Registro de la señal (A) y curva de calibración (B) correspondiente a uno de los calibrados del microanalizador usando el programa 1, con disoluciones estándar de amonio de 0.08 mg L⁻¹ (a), 0.1 mg L⁻¹ (b), 1 mg L⁻¹ (c) y 10 mg L⁻¹ (d).

La figura 5.6 muestra el registro de la señal y la curva de calibración de uno de los experimentos realizados usando el programa 2 (rango de concentraciones altas). La ecuación de Nernst ($n = 4$; 95 % confianza) fue $E = 251 (\pm 3) + 52 (\pm 1) \log [\text{NH}_4^+]$ con $r^2 = 0.9993$. El rango lineal fue de 1 a 1000 mg L⁻¹ NH₄⁺. El LD fue 0.3 mg L⁻¹ NH₄⁺.

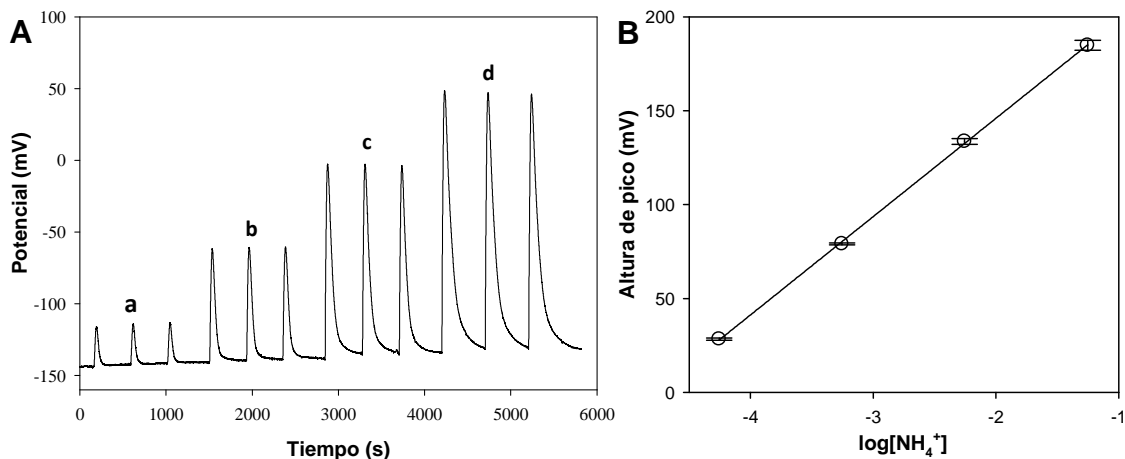


Figura 5.6. Registro de la señal (A) y curva de calibración (B) correspondiente a un calibrado del microanalizador usando el programa 2, con disoluciones estándar de amonio de 1 mg L⁻¹ (a), 10 mg L⁻¹ (b), 100 mg L⁻¹ (c) y 1000 mg L⁻¹ (d).

Al ser, en esencia, el mismo microanalizador que el presentado previamente (§4.3.4), no se calculó de nuevo su reproducibilidad considerando como extrapolable en este trabajo los buenos resultados obtenidos en el capítulo anterior, entendiendo reproducibilidad como el CV % de la sensibilidad.

En cuanto a la repetitividad del sistema, esta pudo observarse en los replicados de cada disolución estándar en los registros de las rectas de calibrado. En este caso, el CV estuvo por debajo del 3 %.

La frecuencia de análisis, una vez fijados los parámetros hidrodinámicos y tomando como referencia el tiempo que transcurría desde la inyección de la disolución estándar más concentrada hasta el retorno a línea base de la señal, fue de 10 y 8 muestras por hora, usando el programa 1 y 2 respectivamente. Automatizando la inyección de la siguiente muestra/disolución estándar, justo cuando la señal recobra la línea base tras una inyección anterior, permitiría incrementar drásticamente la frecuencia de análisis, llegando incluso a doblar el número de muestras por hora.

5.1.4. Análisis de muestras reales

Con la finalidad de testar y validar el microanalizador propuesto y el sistema analítico global implicado, se analizaron muestras reales procedentes de tres orígenes diferentes y con distintas matrices. Se obtuvieron un conjunto de muestras de las diferentes etapas de la planta de tratamiento de aguas residuales de una industria de fabricación de detergentes llamada Evonik, ubicada en Granollers, España. El segundo conjunto de muestras procedió de diferentes etapas de la planta piloto que el proyecto MELiSSA (*Micro-Ecological Life Support System Alternative*) tiene instalada en Bellaterra (Barcelona, España). El último conjunto de muestras procedió de la red de distribución de agua potable de Cerdanyola del Vallès, España. Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de agua procedentes de la empresa Evonik y de la planta piloto de MELiSSA fueron validados por comparación con los resultados obtenidos espectrofotométricamente con el método de referencia basado en el azul de indofenol.¹⁷ Por su parte, las muestras de agua de la red de distribución tomadas del grifo, al presentar una cantidad indetectable de amonio inicialmente, fueron dopadas y se llevaron a cabo estudios de recuperación para verificar los resultados.

En la figura 5.7 se puede observar la comparación entre los resultados obtenidos con el microanalizador propuesto y los obtenidos por el método de referencia para las muestras procedentes de las distintas etapas y procesos de la EDAR de la empresa Evonik. Dicha empresa se dedica a la fabricación de detergentes y tensioactivos catiónicos, por lo que las aguas residuales generadas poseen una matriz compleja que podría contener gran cantidad de amonio.

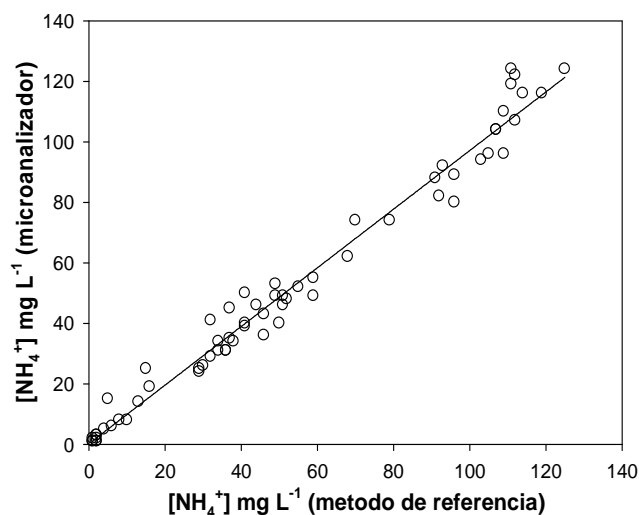


Figura 5.7. Muestras de agua residuales industriales. Recta de regresión entre los valores obtenidos por el método de referencia y los obtenidos por el microanalizador propuesto. Cada valor es el promedio de tres medidas.

Antes de proceder al análisis de cada una de las muestras, se dejaron reposar durante 10 minutos para permitir la precipitación de toda la biomasa (Figura 5.8). Acto seguido se analizó el decantado sin filtrar.

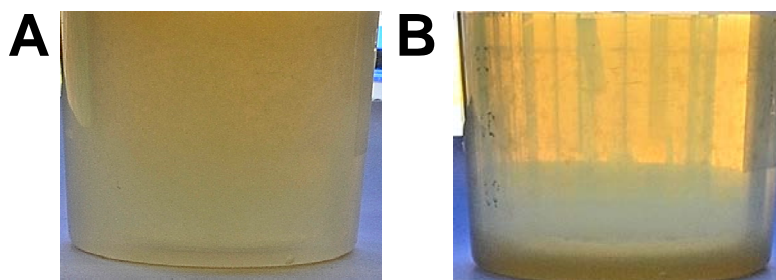


Figura 5.8. Recipiente con una muestra de agua procedente de uno de los tanques de una depuradora de aguas residuales industriales. **(A)** Muestra recién tomada. **(B)** Muestra después de dejar decantar la biomasa durante 10 minutos.

Se encontraron concentraciones entre 1 y 124 mg L⁻¹ NH₄⁺, dependiendo de si las muestras de agua fueron tomadas de tanques correspondientes a las primeras etapas del proceso de tratamiento o de tanques de las etapas finales. Como se puede observar, no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el microanalizador y los obtenidos por el método de referencia según la prueba de t de Student apareada ($t_{\text{calc}} = 1.933$; $t_{\text{tab}} = 2.000$; $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$) y según la representación gráfica de los resultados obtenidos por cada uno de los métodos (Figura 5.7), obteniéndose una recta de regresión ($n = 65$, 95 % confianza) con una ordenada al origen de $a = 0 \pm 2$, una pendiente de $b = 0.97 \pm 0.03$ y una coeficiente de correlación de 0.9782. Esto confirmó que no existía una presencia significativa de compuestos interferentes para el ESI en las muestras analizadas.

En la figura 5.9 se recogen los resultados del análisis de las muestras de agua procedentes de diferentes etapas de la planta piloto del proyecto MELiSSA. Como se vio previamente (§4), este proyecto pretende crear un sistema de soporte vital de ciclo cerrado autosuficiente, en misiones espaciales tripuladas de larga duración, que permita obtener alimento, oxígeno y agua a partir de los desechos orgánicos mediante bacterias, algas y plantas.¹⁸ Previamente al análisis de cada una de las muestras, estas fueron filtradas para eliminar la biomasa. Las concentraciones de amonio obtenidas rondaron entre 4 y 700 mg L⁻¹, dependiendo del origen de la muestra con respecto a las etapas del proceso. Aquellas muestras de agua procedentes de etapas de reciclado de agua se asemejaban a las muestras que podrían proceder de una planta potabilizadora, ya que esta agua puede ser acondicionada para el consumo. Las concentraciones extremadamente altas obtenidas procedían de procesos de purga, donde se concentraban los desechos. Como se puede observar, no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el microanalizador y los obtenidos por el método de referencia según la prueba de t de Student apareada ($t_{\text{calc}} = 0.892$; $t_{\text{tab}} = 2.064$; $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$) y según la representación gráfica de los resultados obtenidos por cada uno de los métodos (Figura 5.9), obteniéndose una recta de regresión ($n = 25$, 95 % confianza) con una ordenada al origen de $a = 1 \pm 6$, una pendiente de $b = 1.00 \pm 0.02$ y una coeficiente de correlación de 0.997.

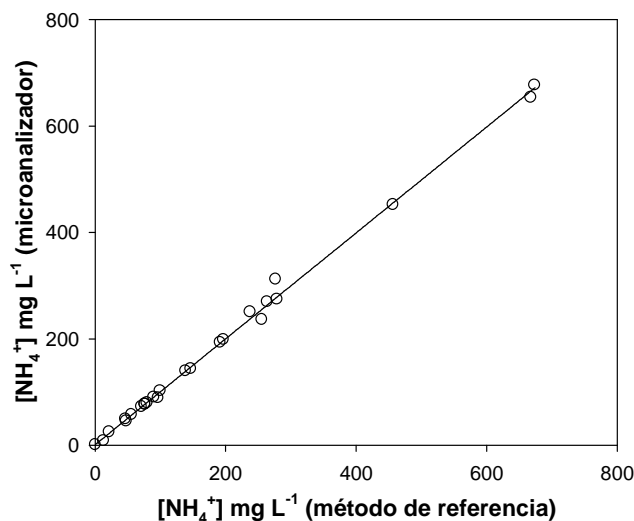


Figura 5.9. Muestras de agua residual procedentes de diferentes etapas y procesos de la planta piloto MELiSSA. Recta de regresión entre los valores obtenidos por el método de referencia y los obtenidos por el microanalizador propuesto. Cada valor es el promedio de tres medidas.

En cuanto al análisis de las muestras de agua potable, se tomó una muestra de la red, tras dejar correr el agua durante 5 minutos, y se analizó posteriormente. En vista de que la concentración obtenida se encontraba bajo el LD del microsistema analítico, la muestra se dopó con concentraciones crecientes de ión amonio para evaluar el funcionamiento del microanalizador con este tipo de matriz. Los

resultados (Tabla 5.3) mostraron una buena correlación entre la cantidad añadida y la determinada, encontrándose recuperaciones entre el 98 y el 106 %. Como se pudo extraer de los resultados, todas las concentraciones analizadas estuvieron por debajo del límite recomendado por la legislación de 0.5 mg L⁻¹ NH₄⁺. Puesto que el LD del microanalizador estaba muy por debajo del límite legal, quedó demostrado que este puede ser usado para monitorizar ión amonio en agua potable o agua dulce en general, incluso cuando el agua no se considera contaminada según la legislación, pudiendo medir así su calidad o pureza.

Tabla 5.3. Muestras de agua de la red de distribución de agua potable de Cerdanyola del Vallès. Valores de concentración promedio en mg L⁻¹ (n = 3, 95 % confianza) del análisis de las muestras.

| Muestra | Añadido | Encontrado | % Rec |
|---------|---------|-------------|-------|
| 1 | 0 | <0.075 | - |
| 2 | 0.1 | 0.11 ± 0.01 | 106 |
| 3 | 0.2 | 0.20 ± 0.01 | 99 |
| 4 | 0.3 | 0.31 ± 0.02 | 104 |
| 5 | 0.4 | 0.39 ± 0.02 | 98 |
| 6 | 0.5 | 0.51 ± 0.05 | 102 |

Todos los resultados obtenidos fueron satisfactorios y confirmaron que tanto el microsistema analítico desarrollado como el montaje experimental implementado son herramientas útiles para la determinación de ión amonio en un amplio rango de muestras y concentraciones.

5.1.5. Simulación de validación en campo. Test de operatividad en funcionamiento autónomo

Con la finalidad de verificar el funcionamiento automático y autónomo del microsistema en condiciones de campo, se llevó a cabo una simulación de la monitorización de ión amonio en una planta de tratamiento de agua residual. En este caso, se simuló un tanque con agitación continua y se utilizó una muestra proporcionada por Evonik sin ningún tratamiento previo, es decir, con toda la biomasa incluida, para monitorizar periódicamente su concentración de amonio. Lo que se pretendía observar era si los sólidos en suspensión presentes en la muestra, o cualquier otro componente de la matriz, provocaban alguna alteración en las señales obtenidas o incluso el taponamiento de los canales. Se realizaron inyecciones sucesivas de la muestra, cada 15 minutos, durante 7 horas. Los resultados (Figura 5.10) mostraron un valor de concentración de amonio promedio (n = 26, 95 % confianza) de 2.9 ± 0.4 mg L⁻¹ no viéndose alteraciones en el sistema significativas. A continuación, se decidió dar un paso más y simular un proceso

dinámico de tratamiento de agua, donde la concentración de amonio fluctuara con el tiempo. De esta manera, partiendo de la misma muestra real proporcionada por Evonik y simulando de nuevo un tanque con agitación continua, se fue añadiendo agua o una disolución estándar de amonio concentrada, para disminuir o aumentar la concentración de amonio artificialmente en el reactor, mientras se iba monitorizando la concentración resultante.

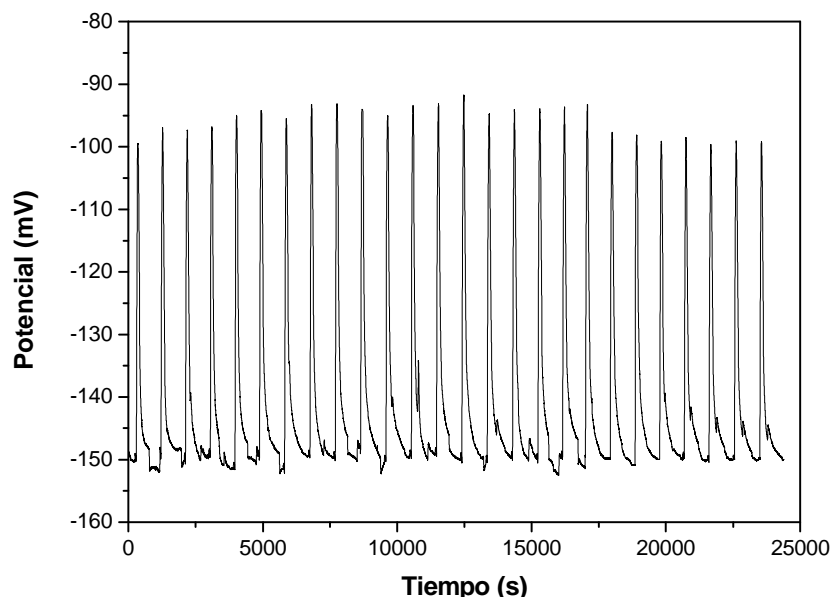


Figura 5.10. Registro de la señal del microanalizador correspondiente a 26 inyecciones cada 15 minutos de una muestra de agua residual procedente de Evonik, sin decantar ni filtrar.

La figura 5.11 muestra el registro de la señal del proceso simulado, durante casi 5 horas, con un análisis cada 15 minutos. Como se puede observar, inicialmente se tuvo la muestra original con una concentración de $2.9 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$. A partir de un cierto momento (a), se añadió agua al reactor con la finalidad de disminuir la concentración inicial a la mitad y acto seguido para disminuirla a un cuarto de la inicial (b). Como se puede constatar, cada cambio en la concentración de amonio se pudo seguir con el registro de la señal. Posteriormente, a partir de un momento determinado (c), se añadió la cantidad de amonio necesaria para volver a obtener la concentración inicial en el tanque. A partir del punto (d), se fueron realizando pequeñas adiciones de agua o disolución concentrada de amonio, con la finalidad de simular un proceso de tratamiento de agua residual real donde la concentración de amonio es dinámica y fluctúa sobre unos parámetros, más o menos, habituales. De esta manera, se demostró la potencialidad del microanalizador y de su montaje experimental asociado para monitorizar, en tiempo real, la evolución de la concentración de amonio en muestras reales con matriz muy compleja, durante periodos relativamente largos de tiempo, en plantas de tratamiento de aguas residuales.

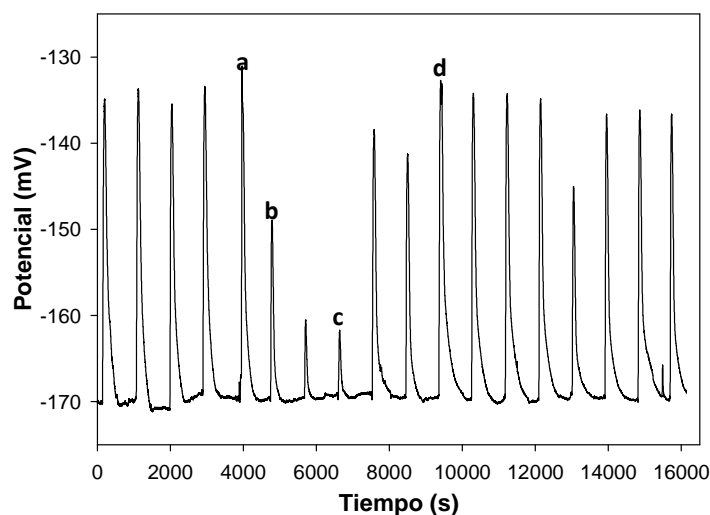


Figura 5.11. Registro de la señal del microanalizador simulando la monitorización de ión amonio en una muestra de agua en un proceso dinámico de tratamiento de agua residual. (a), (b), (c) y (d) se corresponden a momentos de adición de agua o de disolución estándar concentrada de amonio.

5.1.6. Conclusiones

En esta parte del trabajo se ha rediseñado, fabricado, caracterizado y aplicado al análisis de muestras reales de diferente procedencia, el prototipo de microanalizador para la determinación potenciométrica de ión amonio, integrando una etapa de difusión gaseosa, presentado en el capítulo anterior. El microanalizador integraba la microfluídica, un módulo de difusión y un sistema de detección potenciométrico, basado en un ESI y en un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

El tamaño de la cámara de detección ha sido reducido, con la finalidad de reducir tanto el tiempo de análisis como el consumo de reactivos y muestra.

Además, se ha integrado un sistema de gestión de fluidos controlado por ordenador, incorporando microbombas y microválvulas. Este ha permitido incrementar el nivel de miniaturización, automatización y autonomía de todo el sistema analítico, confiriéndole gran versatilidad. Asimismo, la reducción del tamaño y del consumo de energía del sistema analítico global ha contribuido a dotarlo de portabilidad, permitiendo su uso a pie de proceso.

Los satisfactorios resultados obtenidos por el microanalizador en el análisis de amonio en muestras de diferentes procesos y naturaleza, han permitido validar la propuesta realizada.

5.2. Determinación de amonio en sangre y plasma en pacientes diagnosticados con desordenes en el ciclo de la urea.

Los desordenes en el ciclo de la urea (DCU) son errores congénitos del metabolismo de los aminoácidos causados por defectos en las enzimas relacionadas con dicho ciclo metabólico.¹⁹⁻²¹ Estos defectos pueden resultar en hiperamonemia (altos niveles de amonio en sangre), caracterizada por coma hiperamonemico a los pocos días de nacer o por manifestaciones neurológicas más sutiles durante la infancia.

El rango de concentraciones de amonio habitual en individuos sanos oscila entre los 11 y los 35 mg L⁻¹ NH₄⁺, mientras que el límite para discriminar entre una concentración de amonio normal y una patológica es de 60 mg L⁻¹ en adultos y de 75 mg L⁻¹ en recién nacidos, siendo a partir de 200 mg L⁻¹ un episodio muy severo de hiperamonemia que puede acarrear consecuencias irreversibles.²¹⁻²⁵ Los episodios graves de hiperamonemia tienen un 50 % de mortalidad, mientras que los supervivientes experimentan un severo retraso en el desarrollo y crisis hiperamonemicas recurrentes. Un diagnostico precoz y rápido, y el tratamiento de los DCU, son esenciales para minimizar daños irreversibles en los pacientes, especialmente daños cerebrales debidos a la toxicidad provocada por el amonio al traspasar la barrera hematoencefálica.²² Por estas razones, existe un gran demanda de analizadores *point-of-care* (POC) de bajo coste, automáticos y miniaturizados, de elevada robustez, alta frecuencia de análisis y bajo consumo de reactivos y muestra, que permitan la determinación de amonio en plasma o sangre, en el lugar donde se halle el paciente, con una gran inmediatez. Por ello, en esta parte del trabajo se presenta una nueva adaptación del microanalizador de amonio, desarrollado previamente (§4.3), para su uso como microanalizador POC para monitorizar la concentración de este parámetro en plasma y sangre de pacientes diagnosticados con desordenes en el ciclo de la urea. El funcionamiento del microanalizador será validado mediante el estudio comparativo de diferentes muestras de plasma y sangre, proporcionadas por el Hospital Sant Joan de Déu (Esplugues, España), analizadas simultáneamente con el microsistema propuesto y con el método convencional utilizado en el laboratorio clínico de dicho hospital.

5.2.1. Montaje experimental

La figura 5.12 muestra el montaje experimental utilizado inicialmente. Este consistió en un sistema analítico modular y ya fue utilizado anteriormente (Figura 4.46) para caracterizar individualmente cada uno de los elementos que lo componen.

En este caso, básicamente se pretendía evaluar el efecto de la matriz del plasma o la sangre sobre la membrana de PVDF. Una vez verificado el correcto funcionamiento del sistema analítico, se procedió a utilizar el microanalizador monolítico (Figura 4.32), con todos los elementos integrados en un único sustrato.

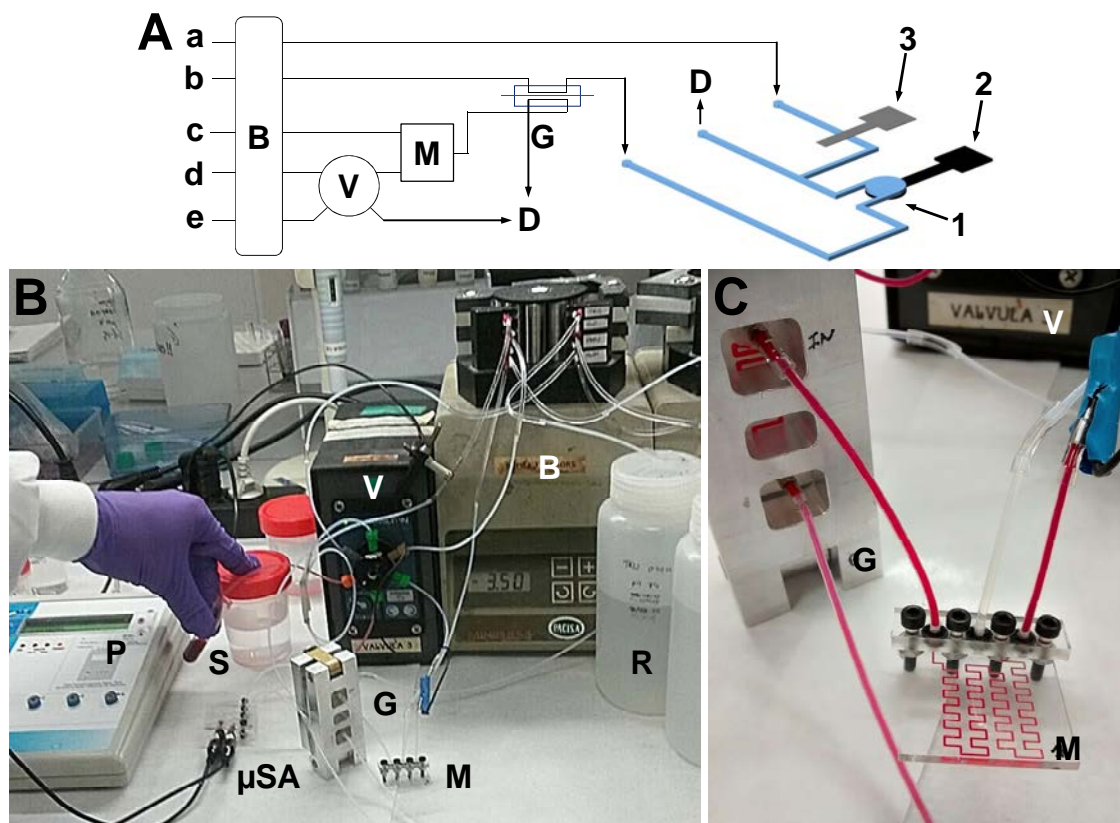


Figura 5.12. Montaje experimental utilizado en las pruebas realizadas en el laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu. **A)** Diagrama esquemático de la configuración modular. **B)** Perspectiva general del montaje experimental. **C)** Detalle de parte del montaje experimental tras la inyección de una muestra de sangre. En todas las imágenes: (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⁺ o muestra; (B) bomba peristáltica; (V) válvula de inyección 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; (P) potenciómetro; (μ SA) módulo de detección potenciométrica de amonio; (S) muestra; (R) reactivos; (1) cámara de detección; (2) ESI; (3) electrodo de referencia.

5.2.2. Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas y características analíticas del sistema

Como disolución básica para generar amoniaco a partir de amonio se utilizó NaOH 0.1 M + EDTA 10^{-3} M. Este último evitó, como se ha descrito anteriormente (§4.3.3.4), la precipitación de algunos metales presentes en la sangre en forma de hidróxidos, que podrían bloquear o dañar los canales microfluídicos o la membrana de PVDF). Como disolución acondicionadora aceptora de amonio se utilizó Tris 0.01

M a pH 7.4 y como disolución auxiliar se usó KCl 0.1M, tal y como se había optimizado previamente (§4.3).

Las variables hidrodinámicas escogidas, en función de los resultados obtenidos en los ensayos previos (Tabla 5.1), fueron un caudal de $350 \mu\text{L min}^{-1}$ y un volumen de inyección de $325 \mu\text{L}$, con la finalidad de alcanzar un compromiso entre el rango de trabajo, el LD, el tiempo de análisis y el consumo de reactivo y muestra.

La figura 5.13 muestra, a modo de ejemplo, el registro de la señal y la correspondiente curva de calibración para un calibrado. La ecuación de Nernst obtenida ($n = 4$; 95 % confianza) fue $E = 305 (\pm 5) + 53 (\pm 1) \log [\text{NH}_4^+]$ con $r^2 = 0.9996$. El rango lineal fue de 4.2 a $555 \mu\text{M NH}_4^+$ y el límite de detección, de acuerdo con la IUPAC¹⁶, fue de $1.7 \mu\text{M NH}_4^+$. Como se puede observar, el rango lineal obtenido englobaba tanto concentraciones correspondientes a valores normales de amonio en sangre, el valor de corte en adultos ($60 \mu\text{M}$) y en niños ($75 \mu\text{M}$) y valores típicos de casos agudos de hiperamonemia ($>250 \mu\text{M}$), por lo que las características analíticas de microanalizador fueron las idóneas para la aplicación deseada.

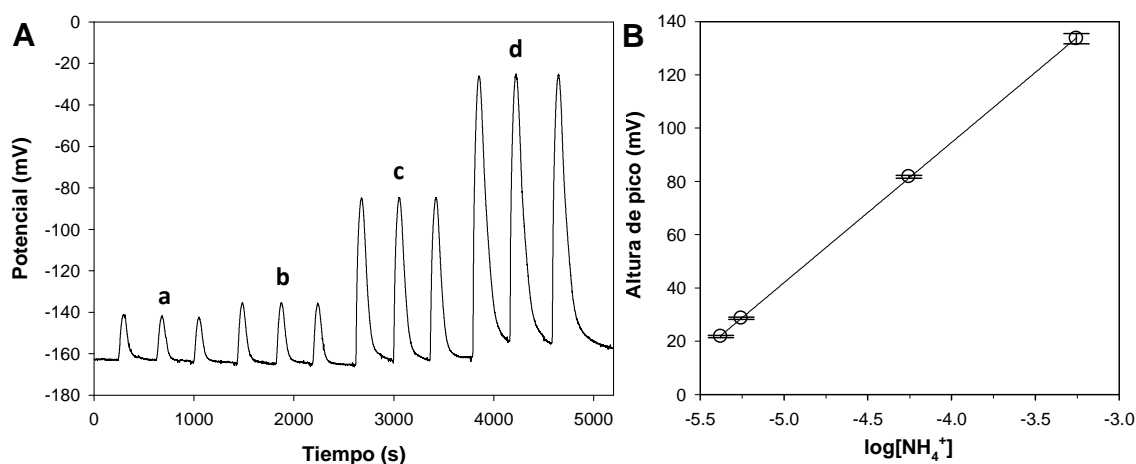


Figura 5.13. Registro de la señal (A) y curva de calibración (B) para un calibrado usando disoluciones estándar de NH_4Cl con concentraciones de NH_4^+ de $4.2 \mu\text{M}$ (a), $5.6 \mu\text{M}$ (b), $55.6 \mu\text{M}$ (c) y $555.6 \mu\text{M}$ (d).

5.2.3. Análisis de muestras reales

Se analizaron, utilizando el microanalizador POC propuesto, diferentes muestras de plasma y sangre de pacientes con distintos grados de hiperamonemia proporcionadas por el Hospital Sant Joan de Déu. Los resultados obtenidos fueron validados por comparación con los obtenidos por el método de referencia implementado en el laboratorio clínico del mismo hospital. Este estaba basado en la detección enzimática automatizada mediante medida espectrofotométrica.²⁶

Puesto que la membrana de difusión de PVDF tiene carácter lipofílico y las muestras de naturaleza biológica que se pretendían analizar contenían gran

cantidad de compuestos lipofílicos (como lipoproteínas), hubo que verificar que el fenómeno de difusión gaseosa y la integridad de la membrana del microanalizador se mantuvieran a lo largo de los análisis.

En primer lugar se procedió a analizar muestras de plasma, ya que tendrían una matriz más sencilla. Para ello se centrifugaron las muestras de sangre durante 10 minutos a 2500-3000 rpm y se recogió el sobrenadante correspondiente a la fracción de sangre, conocida como plasma. En este punto, cabe destacar, que el método utilizado por el hospital para determinar la concentración de amonio en sangre analiza plasma y no sangre directamente. La figura 5.14 muestra los resultados obtenidos por ambos métodos en el análisis de 19 muestras de plasma.

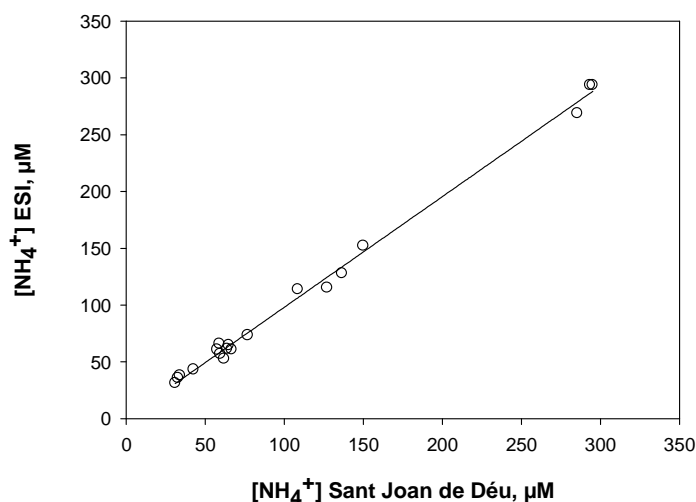


Figura 5.14. Resultados del análisis de las muestras de plasma realizados. Recta de regresión entre los valores obtenidos por el método de referencia y los obtenidos por el microanalizador (ESI) propuesto. Cada valor corresponde a una medida.

Del tratamiento estadístico de los datos, se puede concluir que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el microanalizador y los obtenidos por el método de referencia según la prueba de t de Student apareada ($t_{\text{calc}} = 1.455$; $t_{\text{tab}} = 1.729$; $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$) y según la representación gráfica de los resultados obtenidos por cada uno de los métodos, obteniéndose una recta de regresión ($n = 19$, 95 % confianza) con una ordenada en el origen de $a = 1 \pm 4$, una pendiente de $b = 0.97 \pm 0.03$ y una coeficiente de correlación de 0.9956.

Con el objetivo de testar la repetitividad del microanalizador en las medidas de muestras reales complejas, se realizó el análisis de 4 muestras de plasma por duplicado. Los resultados obtenidos (Tabla 5.4) mostraron que la repetitividad del microanalizador fue satisfactoria, al igual que la exactitud de las medidas, mostrando una variabilidad de los resultados muy baja.

Estos resultados demostraron la viabilidad del microanalizador presentado para el análisis de amonio en muestras de plasma.

Tabla 5.4. Muestras analizadas por duplicado para obtener la repetitividad del microanalizador en el análisis de muestras reales de plasma.

| Muestra | Rep. 1 (μM)* | Rep. 2 (μM) | ESI (μM) | Referencia (μM) | % CV |
|---------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------|------|
| 1 | 33.20 | 32.51 | 33 ± 3 | 35.85 | 8 |
| 2 | 42.80 | 42.68 | 42.7 ± 0.5 | 43.20 | 1 |
| 3 | 34.09 | 33.95 | 34.0 ± 0.6 | 38.07 | 11 |
| 4 | 59.44 | 59.67 | 60 ± 1 | 56.92 | 5 |

*Rep. 1 =valor de concentración obtenido en el primer análisis de la muestra.

En este punto se decidió analizar muestras de sangre completa para evaluar, con ellas, el funcionamiento del microanalizador. Se observó que a medida que se iban haciendo inyecciones sucesivas de una misma muestra de sangre, la altura de pico obtenida cada vez era menor, hasta llegar a un punto en el que se observaba, a simple vista, que la membrana de PVDF se volvía permeable, tal y como ocurría en los estudios de la durabilidad de las membranas llevados a cabo previamente (§4.3.3.2). Además también se veían alteraciones en el registro de la señal observándose una subida progresiva del valor de potencial de línea base. Finalmente, no se observaban picos al inyectar muestras o disoluciones estándar de amonio. Este fenómeno se pudo deber a que, como se comentó anteriormente, los compuestos lipofílicos presentes en la sangre se fueron adhiriendo sobre la superficie de la membrana de PVDF. Este hecho, a la larga provocaría una serie de modificaciones superficiales que podrían desencadenar en un cambio en la permeabilidad de la membrana que hiciera permear NaOH al canal de la disolución aceptora. Este razonamiento encajaría con lo observado en cuanto a la subida del valor de potencial de la línea base y a la disminución progresiva de la magnitud de la señal. Estos problemas se podrían solucionar modificando el diseño del módulo de difusión e integrando una membrana hidrófila entre la membrana hidrófoba y el canal de la disolución donadora. De esta manera, los compuestos lipofílicos no se adherirían sobre la membrana y, sin embargo, el amonio podría traspasarla para posteriormente, en forma de amoníaco, difundir a través de la membrana de PVDF hidrófoba. Buscando alternativas que permitieran analizar muestras de sangre, se procedió a evaluar dos opciones distintas. A unas muestras se las diluyó a la mitad con agua, con la finalidad de diluir la cantidad de compuestos lipofílicos y por lo tanto limitar los efectos de estos sobre la membrana, y las otras muestras se dejaron reposar 15 minutos, para que precipitaran los componentes densos, cogiendo el sobrenadante para ser analizado, siendo similar al plasma centrifugado. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Resultados de los análisis de muestras de sangre diluidas a la mitad con agua o analizando solo el sobrenadante. Cada valor de concentración corresponde a un solo análisis.

| Muestra | ESI (μM) | Referencia (μM) | % CV |
|----------------------------|-----------------------|------------------------------|------|
| 1 (diluida $\frac{1}{2}$) | 111.91 | 134.61 | 17 |
| 2 (diluida $\frac{1}{2}$) | 55.03 | 69.10 | 20 |
| 3 (sobrenadante) | 126.50 | 113.78 | 11 |

Como se puede observar, las muestras de sangre diluidas a la mitad con agua mostraron concentraciones ligeramente por debajo del valor obtenido por el método de referencia, cosa que se podría relacionar con el bloqueo de algunos poros por parte de los compuestos lipofílicos. Por su parte, las muestras de sangre que se dejaron reposar, y cuyo sobrenadante fue analizado, mostraron concentraciones más próximas a las obtenidas con el método de referencia, pero sin llegar a los excelentes resultados obtenidos en el análisis de las muestras de plasma.

Estos resultados demostraron que el microsistema analítico se puede usar para la determinación de amonio en plasma de manera sencilla y robusta. Para el análisis en sangre, se podría introducir el concepto de microanalizador de un solo uso desechable, debiendo buscar alternativas que limitaran el deterioro de la membrana de difusión de PVDF con el uso, como incrementar el factor de dilución de la muestra o incorporar una membrana de diálisis.

5.2.4. Conclusiones

En esta parte del trabajo, el microanalizador para la determinación potenciométrica de ión amonio presentado en el capítulo anterior, se ha aplicado al análisis directo de muestras de plasma con resultados satisfactorios. En el caso de analizar muestras de sangre entera, los resultados serían satisfactorios tras un proceso de dilución previa. En comparación con otros analizadores POC previamente reportados,²⁷ el microanalizador utilizado presenta unas características analíticas mejoradas en términos de rango de trabajo, límite de detección, simplicidad y facilidad de automatización, con una buena precisión, repetitividad y reproducibilidad. Además, es un sistema analítico mucho más pequeño y económico que los equipos utilizados en los laboratorios clínicos del área de la sanidad. Debido a las dimensiones reducidas, el microanalizador presenta también un bajo consumo de reactivos y muestra y un tiempo de análisis relativamente rápido.

Los resultados y las características analíticas obtenidas demuestran que el microanalizador puede ser usado para aplicaciones clínicas, como POC, para la determinación de amonio en muestras de sangre y plasma de pacientes diagnosticados con desordenes en el ciclo de la urea, a pie de cama, incluso en centros de atención primaria.

5.3. Referencias

1. World Health Organization. Ammonia in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Guidelines for drinking-water quality (2003).
2. Šraj, L. O., Almeida, M. I. G. S., Swearer, S. E., Kolev, S. D. & McKelvie, I. D. Analytical challenges and advantages of using flow-based methodologies for ammonia determination in estuarine and marine waters. *TrAC Trends Anal. Chem.* **59**, 83–92 (2014).
3. Xiao, Y., Zheng, Y., Wu, S., Yang, Z.-H. & Zhao, F. Nitrogen recovery from wastewater using microbial fuel cells. *Front. Environ. Sci. Eng.* **10**, 185–191 (2016).
4. Carty, G., O’Leary, G. & Meaney, B. Wastewater Treatment Manuals. Primary, secondary and tertiary treatment. Environmental Protection Agency (Environmental Protection Agency, 1997).
5. Stenholm, A., Eriksson, E., Lind, O. & Wigilius, B. Comparison of continuous flow analysis including photometric detection and ion-selective electrode potentiometry for the measurement of ammonium nitrogen in wastewater. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **88**, 165–176 (2008).
6. World Health Organization. Monochloramine in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Guidelines for drinking-water quality (2004).
7. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. **1**, (2004).
8. Hindfelt, B., Plum, F. & Duffy, T. E. Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J. Clin. Invest.* **59**, 386–396 (1977).
9. Monfort, P., Kosenko, E., Erceg, S., Canales, J. J. & Felipe, V. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: Role of NMDA receptors. *Neurochem. Int.* **41**, 95–102 (2002).
10. 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).
11. Carrera, J. Biological elimination of nitrogen in an high load effluent (tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2001).
12. Gaber, B. Bio-removal of nitrogen from waste water-A review. *Nat. Sci.* **8**, 210–228 (2010).

13. Official journal of the european communities. 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste-water treatment. EEC Council Directive (1991).
14. Consortium for the defense of the basin of Besòs river. Regulation of wastewater discharges. (1994).
15. da Rocha, Z. M. et al. Compact and autonomous multiwavelength microanalyzer for in-line and in situ colorimetric determinations. *Lab Chip* **12**, 109 (2012).
16. 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).
17. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (American Public Health Association, 2015).
18. Lasseur, C. et al. Melissa: The European project of closed life support system. *Gravitational Sp. Biol.* **23**, 3–12 (2006).
19. Häberle, J. et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, 32 (2012).
20. Raghuvver, T. S., Garg, U. & Graf, W. D. Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: An update. *Am. Fam. Physician* **73**, 1981–1990 (2006).
21. Cohn, R. M. Hyperammonemia, Bane of the Brain. *Clin. Pediatr. (Phila)*. **43**, 683–689 (2004).
22. Cooper, A. J. & Plum, F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* **67**, 440–519 (1987).
23. Bernal, W. et al. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. *Hepatology* **46**, 1844–1852 (2007).
24. Rao, A. N., Varma, P., Sumitra & Dhanya, S. Hyperammonemia: Diagnostic experience at the metabolism laboratory. *Perinatology* **9**, 9–13 (2007).
25. Tseng, Y.-L. et al. Risk Factors of Hyperammonemia in Patients With Epilepsy Under Valproic Acid Therapy. *Medicine (Baltimore)*. **93**, e66 (2014).
26. Bishop, M. L., Fody, E. P. & Schoeff, L. E. *Clinical chemistry: principles, techniques and correlations*. (Wolters Kluwer, 2013).
27. Goggs, R. et al. Clinical investigation of a point-of-care blood ammonia analyzer. *Vet. Clin. Pathol.* **37**, 198–206 (2008).

Capítulo 6

Microsistema analítico con etapa de difusión gaseosa integrada para la determinación espectrofotométrica de dióxido de carbono en vino y cerveza

El dióxido de carbono (CO_2) es un parámetro clave en la monitorización de los procesos de fermentación que se llevan a cabo en la elaboración de vinos y cervezas,¹ además de ser un factor importante que condiciona las propiedades organolépticas finales de dichos productos.^{2,3} Por estos motivos, el CO_2 es controlado de manera rutinaria en los procesos de producción de estas bebidas tanto en bodegas como en compañías cerveceras.

Existen tradicionalmente tres métodos oficiales para la determinación de CO_2 en este tipo de muestras: el manométrico, el enzimático y el titrimétrico. Este último es el seleccionado como primera opción debido a sus ventajas frente al resto de métodos, entre las que destaca un menor tiempo de análisis y una mayor reproducibilidad.⁴⁻⁶ Este procedimiento consiste en la titulación del CO_2 alcalinizado, con ácido sulfúrico, entre pH 8.6 y 4.0 usando un electrodo de pH. A pesar de las ventajas que presenta, muestra también algunos problemas como, por ejemplo, una baja sensibilidad y las dificultades intrínsecas a una valoración con bureta. Alternativamente, se han propuesto procedimientos basados en la medida directa de CO_2 disuelto, usando técnicas electroquímicas.⁷ Sin embargo, estos métodos, que aprovechan mayoritariamente el principio de Severinghaus,⁸ muestran tiempos de respuesta elevados, a veces baja reproducibilidad y, en general, suelen ser caros y difíciles de automatizar. Como otra opción, se han puesto en práctica sistemas automatizados basados en metodologías de flujo continuo con detección espectrofotométrica y con una etapa de separación del analito por difusión gaseosa.⁹⁻¹¹ De esta manera, se mejoran diferentes características analíticas, como el tiempo de análisis, el consumo de reactivo y muestra y la reproducibilidad de las medidas, sin la necesidad de personal de laboratorio cualificado. En este tipo de sistemas analíticos, el proceso de determinación del CO_2 normalmente empieza cuando la muestra es inyectada en una disolución portadora que se mezcla con una disolución ácida. En este momento, todas las especies inorgánicas de carbono presentes son convertidas a CO_2 , que difunde a través de una membrana permeable a gases. Posteriormente, una

disolución aceptora, con propiedades ácido-base, recoge el CO₂ difundido. Este hecho, provoca un cambio en el pH que es detectado, a su vez, por un cambio en la absorbancia de un indicador ácido-base presente en dicha disolución. Sin embargo, estos sistemas presentan rangos de trabajo estrechos que dificultan la determinación de CO₂ en cerveza (alrededor de 5000 mg L⁻¹) y en vinos (desde 1000 mg L⁻¹, en vinos ligeramente espumosos, hasta 12000 mg L⁻¹, en vinos excepcionalmente gasificados).^{1,10} Además, el consumo de reactivos y muestra sigue siendo demasiado alto y el tamaño de los equipos analíticos hace que no sean portátiles, limitando su uso tanto en el análisis de muestras discretas in situ, como en la monitorización on-line de procesos de fermentación.

Con el objetivo de desarrollar un dispositivo capaz de operar en estas condiciones, se decidió utilizar para su fabricación la tecnología de polímeros, usando COC como sustrato. Por otra parte, como se ha apuntado en la introducción (§1.1.2.4.2), los avances en optoelectrónica de gran consumo han permitido la aparición de nuevas fuentes de luz, como los LED,¹²⁻¹⁶ y detectores, como los fotodiodos,¹²⁻¹⁵ de un tamaño muy reducido, que han permitiendo miniaturizar y hacer portátiles los montajes experimentales frente a los equipos convencionales.^{17,18}

Explotando todas estas potencialidades, en este capítulo se presenta un microanalizador de bajo coste fabricado en COC, con una etapa de difusión gaseosa integrada, para la determinación espectrofotométrica de CO₂ utilizando como disolución aceptora, una disolución tampón que contiene azul de bromotimol (BTB) como indicador ácido-base colorimétrico. El microanalizador integrará, también, la celda de detección óptica de flujo. El tamaño reducido del microsistema analítico, unido al tamaño reducido y a la simplicidad del sistema de detección, hacen del equipo global un sistema potencialmente portátil, con un consumo de reactivos y muestra reducido y con un rango lineal de trabajo muy amplio. Para demostrar su aplicabilidad, se analizarán diferentes muestras de vino y cerveza.

6.1. Materiales y reactivos

El microanalizador se construyó usando placas y láminas de COC proporcionadas por Topas Advanced Polymers (Florence, KY, EEUU) en diferentes grados y grosores: placas Topas 5013 de 500 µm y 1 mm de grosor y láminas Topas 8007 de 25 y 50 µm de grosor.

Para separar el analito de la matriz de la muestra por difusión gaseosa, se utilizó una membrana hidrófoba de 125 µm de grosor hecha de PVDF con tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore, EEUU).

Todos los reactivos usados para la evaluación y optimización del microsistema fueron de calidad analítica o superior. El carbonato de sodio (Na₂CO₃), el dihidrogenofosfato de sodio (NaH₂PO₄), el hidrogenofosfato de sodio (Na₂HPO₄) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) fueron suministrados por Panreac (Barcelona,

España). El azul de bromotimol (BTB) y el ácido sulfúrico al 98 % (H_2SO_4) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Barcelona, España).

Todas las disoluciones fueron preparadas con agua doblemente destilada o Milli-Q. Las disoluciones estándar de CO_2 fueron preparadas y desgasificadas diariamente a partir de una disolución madre de 50000 mg L^{-1} de Na_2CO_3 . Como disolución donadora, para convertir todas las especies inorgánicas de carbono en CO_2 , se usó una disolución de H_2SO_4 0.2 M, conteniendo 60 mg L^{-1} de H_2O_2 para evitar la potencial interferencia del SO_2 mediante su oxidación a SO_4^{2-} .⁹ Como disolución aceptora se usó una disolución tamponada de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 12 mM a pH 7.6, conteniendo BTB 0.06 mM.

6.2. Montaje experimental

El esquema del montaje experimental utilizado se muestra en la figura 6.1.

Este está dividido en tres partes: el microanalizador, el sistema de impulsión e inyección en flujo continuo y el sistema de detección.

El sistema de impulsión e inyección en flujo continuo estaba constituido por 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).

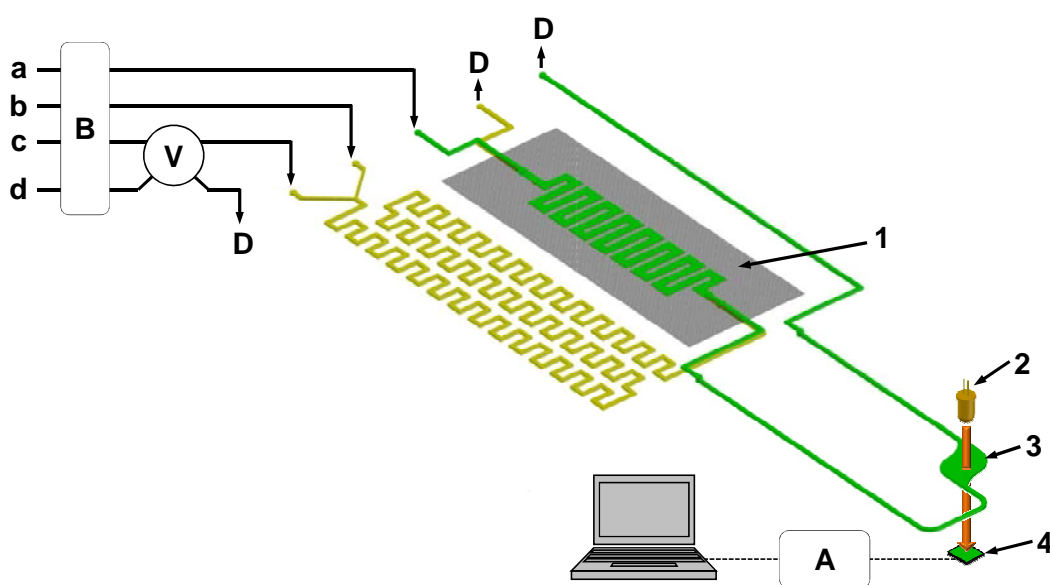


Figura 6.1. Diagrama esquemático de la microfluídica, el sistema de detección y el montaje experimental. (a) canal con la disolución aceptora de tampón fosfato con BTB; (b) disolución de H_2SO_4 0.2 M con 60 mg L^{-1} H_2O_2 ; (c) disolución portadora (H_2O); (d) disolución estándar/muestra; (B) bomba peristáltica; (V) válvula de inyección de 6 vías; (D) desecho; (1) membrana de PVDF; (2) LED a 607 nm; (3) celda de detección; (4) fotodiodo; color amarillo: microcanales bajo la membrana de PVDF; color verde: microcanales sobre la membrana de PVDF; (A) tarjeta de adquisición de datos; Líneas solidas son conexiones fluídicas y líneas discontinuas son conexiones eléctricas.

El microsistema se conectó a los diferentes elementos externos mediante tubos de Teflón de 0.8 mm de diámetro interno (Scharlab, S.L., Cambridge, Inglaterra).

El sistema de detección óptica utilizado (Figura 6.2) fue desarrollado por el GSB en colaboración con miembros del Grupo de Tecnologías Fotónicas (GTF) de la Universidad de Zaragoza, siendo descrito previamente.^{18,19} Está constituido por un lector óptico, compacto y robusto, de plataformas microfluídicas, compuesto por una estructura de PMMA que sirvió para fijar y posicionar las dos partes fundamentales del sistema: una placa de circuito impreso (PCB), con los diferentes componentes electrónicos integrados para la detección óptica, y un puerto de inserción para posicionar, de manera reproducible, las plataformas microfluídicas. Este puerto de inserción se diseñó siguiendo el concepto de llave-cerradura, para permitir un alineamiento perfecto entre la fuente de luz, la celda de detección y el detector (Figura 6.2.C). Así, se dispuso de un sistema de medida muy versátil que podía ser adaptado a plataformas microfluídicas de cualquier tamaño y configuración. Para ello, basta con cambiar la pieza de encaje que actúa como “cerradura” del puerto de inserción, siempre que el contorno de ésta tenga la forma complementaria de la plataforma microfluídica “llave” (Figura 6.2.C.c).

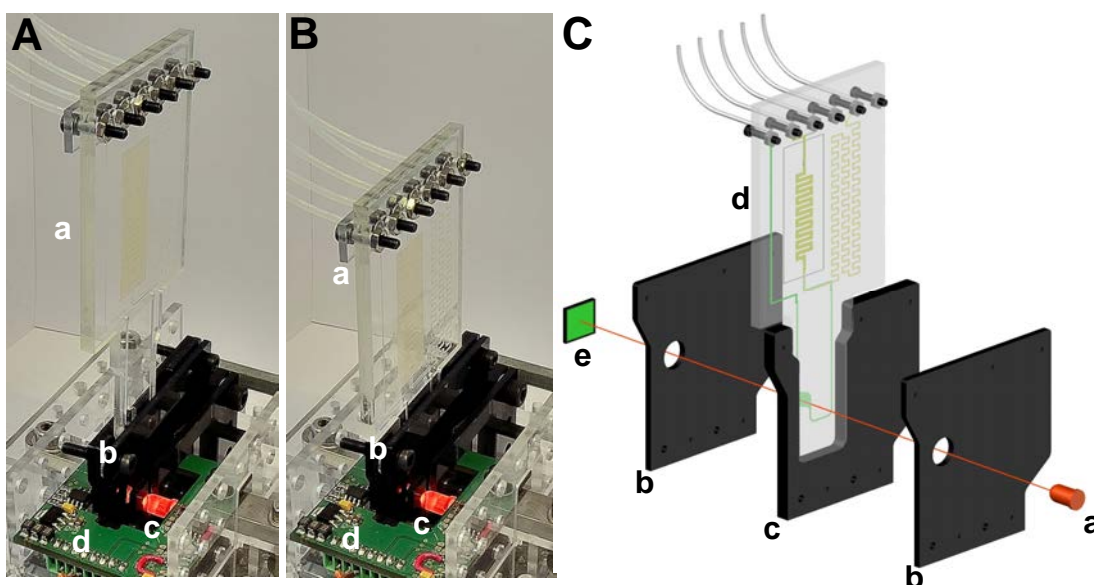


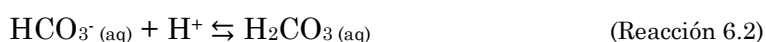
Figura 6.2. A y B) Imagen del microsistema analítico fuera y dentro del sistema de detección: (a) microanalizador; (b) puerto de inserción diseñado bajo el concepto de llave-cerradura integrando una máscara con un agujero circular que solo permite el paso de luz a través de la celda de detección; (c) LED a 607 nm; (d) PCB con la electrónica asociada al control y a la adquisición de la señal. C) Esquema del concepto de llave-cerradura del sistema de detección: (a) LED a 607 nm; (b) máscara con un agujero circular que solo deja pasar la luz a través de la celda de detección; (c) pieza actuando como “cerradura” del puerto de inserción; (d) microanalizador actuando como “llave”; (e) fotodiodo.

Por su parte, la estructura PCB integraba un LED como fuente de radiación, con un pico de emisión centrado a 607 nm (Kingbright, Taipei, Taiwán), y un fotodiodo PIN Hamamatsu S1337-66BR, con 33 mm² de área efectiva, actuando como

detector. Tanto la fuente de emisión como el detector podían ser cambiados en función de la aplicación, confiriéndole este hecho una enorme versatilidad al sistema de detección. La señal generada fue adquirida mediante una tarjeta de adquisición de datos (DAQ) NI USB-6211 de National Instruments (Austin, Texas, EEUU), que transfirió la señal de la PCB, vía USB, a un ordenador, donde fue procesada usando un amplificador lock-in digital. La frecuencia de adquisición de datos fue de 10 por segundo. El uso de la amplificación lock-in digital permitió incrementar la relación señal/ruido y trabajar en condiciones de luz ambiente, evitando así el efecto de luz parásita en las medidas, sin la necesidad de recurrir a amplificadores físicos.¹⁵

6.3. Diseño y optimización de la plataforma microfluídica

La fabricación del microanalizador se realizó en esta ocasión utilizando la tecnología de polímeros, usando como sustrato COC. El diseño del microanalizador (Figura 6.3.A) estaba formado por cinco capas con motivos mecanizados: 3 placas de 1 mm de grosor (“a”, “b” y “d”), otra de 500 μm de grosor “e” (todas ellas Topas 5013) y una lámina de 50 μm “c” (Topas 8007). Se utilizaron también 4 láminas de 25 μm (Topas 8007) como elemento sellante entre capas, laminándolas previamente sobre cada capa de Topas 5013. Cuando todas las capas fueron alineadas, superpuestas y laminadas, se obtuvo la estructura tridimensional deseada. Las dimensiones del microanalizador fueron 45 x 60 x 4 mm en la parte de la microfluídica y el módulo de difusión (parte ancha), y 22.5 x 40 x 3 mm en la zona de la celda de detección (parte estrecha). Esta última es la que se inserta en el sistema de detección basado en el concepto de llave-cerradura. Su peso total fue de 16 g. El microsistema presentaba 3 entradas y 2 salidas de líquidos (Figura 6.1). Así, la disolución portadora (c), donde se inyecta la muestra/disolución estándar (d), y la disolución ácida de H_2SO_4 (b), entran en el microsistema a través de los puertos de entrada correspondientes. Estos canales convergen en un punto de confluencia en forma de Y, en el interior del microsistema. Después de esto, las disoluciones fluyen a lo largo de un micromezclador en forma de serpentín, dando lugar a la disolución donadora. En dicho trayecto, se va obteniendo el CO_2 a partir de todas las especies de carbono inorgánico disueltas (DIC) presentes en la muestra/disolución estándar siguiendo las siguientes reacciones químicas:^{20–22}



La disolución resultante es conducida al módulo de difusión donde, a lo largo de un canal en forma de serpentin, el dióxido de carbono generado se difunde a través de la membrana de PVDF hacia una disolución aceptora, compuesta por un tampón fosfato 12 mM a pH 7.6 y el indicador de pH BTB. Esta disolución aceptora, introducida por la tercera entrada del microanalizador (a), recoge el CO₂ difundido. Este produce un cambio de pH en dicha disolución aceptora, que a su vez provoca un cambio de la absorbancia a 607 nm del indicador ácido-base presente (transición de color azul a amarillo). Finalmente, tanto la disolución donadora como la aceptora son dirigidas al desecho.

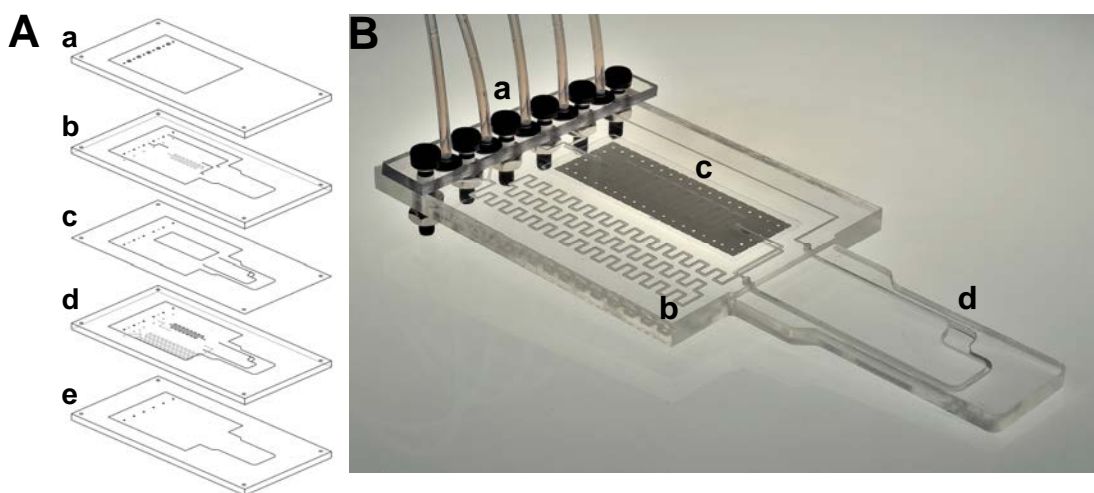


Figura 6.3. A) Diseño por capas del microanalizador. Las capas “b” y “d” tienen motivos mecanizados en ambos lados por bajo-relieve, en la parte superior en color negro y en la parte inferior en color gris. B) Imagen del dispositivo final: (a) conexiones fluídicas; (b) microfluídica; (c) membrana de PVDF; (d) celda de detección de flujo.

Las dimensiones de los microcanales fueron de 0.4 mm de ancho por 0.3 mm de alto, salvo en la parte del módulo de difusión, que 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) y en la parte que se inserta en el sistema de detección, donde el canal de entrada a la celda de detección fue de 0.8 mm de ancho por 1 mm de alto mientras que el canal de salida de la celda de detección fue de 0.4 mm de ancho por 1 mm de alto. El diámetro de la celda de detección fue de 4.5 mm y el camino óptico fue de 1 mm. El volumen muerto total del microsistema fue de 200 μ L.

Finalmente, los conectores fluídicos fueron fijados sobre las entradas y salidas del microanalizador mediante un soporte y tornillos (Figura 6.3.B).

Utilizando el tipo de micromezclador descrito previamente (§4.3.3.1), se procedió a evaluar la configuración del módulo de difusión y de la cámara de detección, así como las variables químicas e hidrodinámicas implicadas, con el objetivo de fijar más condiciones operacionales que ayudaran a cumplir los requisitos planteados por la aplicación propuesta. Estos eran ser fácilmente automatizable, de tamaño

reducido y compacto, tener un rango de trabajo amplio con un bajo consumo de reactivos y muestra y tener un tiempo de vida elevado.

6.3.1. Verificación de la configuración del módulo de difusión

Con la finalidad de incrementar el tiempo de vida del microanalizador y maximizar la difusión del analito, se escogió la configuración de módulo de difusión optimizada previamente (§4.3.3.2.). Esta incluía una entrada de líquidos no coincidente al módulo de difusión, diferente sentido de flujo entre disolución donadora y aceptora y un posicionamiento de la membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro, con su lado más hidrofóbico dirigido al canal de la disolución donadora. Para confirmar que esta configuración era la idónea para la aplicación estudiada, se realizaron diferentes experiencias de verificación. Una de ellas fue determinar si realizar el proceso de difusión a contraflujo o en el mismo sentido de flujo producía diferencias significativas de señal. Según algunos trabajos publicados,²³ usar una configuración a contraflujo en el módulo de difusión, favorece la transferencia de masa aumentando el área de pico. No obstante, al provocar una mayor dispersión del analito, el aumento del área de pico se traduce en una anchura de pico más grande pero una altura de pico inferior. Esto iría en detrimento del LD. Para comprobar este hecho, se realizaron una serie de calibrados utilizando el montaje experimental mostrado en la figura 6.1 usando ambas configuraciones con unas condiciones arbitrarias de $500\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$ de caudal por cada canal, $25\ \mu\text{L}$ de volumen de inyección, una disolución donadora constituida por $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0.2\ \text{M}$ y una aceptora formada por un tampón fosfato $12\ \text{mM}$ (pH 7.1) con BTB 0.06. Como se puede observar (Figura 6.4), ambas configuraciones daban lugar a perfiles de señal prácticamente idénticos, sin observarse diferencias significativas, por lo que se mantuvo la configuración optimizada previamente de flujo a contracorriente.

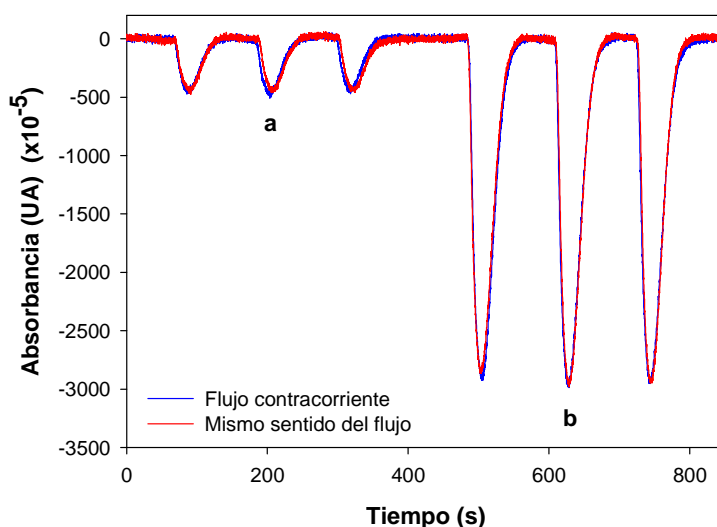


Figura 6.4. Gráfica comparando la señal obtenida usando una configuración de entrada de líquidos a contraflujo o a mismo sentido de flujo: (a) $1000\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}\ \text{CO}_2$ y (b) $7500\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}\ \text{CO}_2$.

6.3.2. Configuración de la celda de flujo del sistema de detección

La configuración de la celda de flujo para medidas ópticas (Figura 6.5) fue diseñada y optimizada, en colaboración con otros miembros del GSB. Se introdujeron contornos de geometría suavizada, sin ninguna discontinuidad o canto abrupto, teniendo en cuenta el efecto Venturi y el principio de Bernoulli.¹⁷ Este fenómeno hace que al disminuir la sección de paso del fluido (paso de un canal o cámara más grande a un canal más estrecho), en ese punto, su velocidad aumente, disminuyendo la presión. Este hecho permitió minimizar la retención y/o formación de burbujas en el interior de la celda de detección. Además, en el caso de que eventualmente apareciera una burbuja, su evacuación se vio favorecida debido a la diferencia de presión y velocidad del fluido entre la cámara, constituyente de la celda de detección, y el microcanal de salida. De esta manera, se evitó la aparición de ruido, señales transitorias y/o derivas en la línea base, relacionadas, habitualmente, con la retención o paso de burbujas en o a través de la celda de detección. Esto incrementó la robustez global del microanalizador.

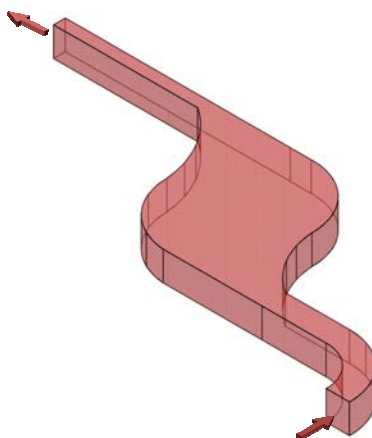


Figura 6.5. Diseño tridimensional de la celda de flujo. Las flechas indican la dirección de flujo.

Además, el contorno exterior del microsistema fue diseñado, basándose en el concepto de llave-cerradura, para ser insertado en el sistema de detección, consiguiéndose un alineamiento perfecto y reproducible entre el LED, la cámara de la celda de flujo y el fotodiodo. Así, se consiguió un sistema compacto y robusto, como se demostró previamente.¹⁸

6.3.3. Evaluación de las variables químicas e hidrodinámicas

En este apartado, se evaluó, usando un proceso de optimización univariante, la influencia tanto de las variables químicas (composición de la disolución aceptora y donadora y presencia de potenciales compuestos interferentes) como de los parámetros hidrodinámicos (caudal y volumen de inyección) sobre las

características analíticas proporcionadas por el microanalizador. El objetivo fue llegar a un compromiso entre la sensibilidad, la estabilidad de la línea base, el LD, el rango lineal de trabajo, el consumo de reactivos y muestra y la frecuencia de muestreo.

De acuerdo con la bibliografía, se han utilizado diferentes indicadores colorimétricos ácido-base, como por ejemplo el púrpura de bromocresol,¹¹ el rojo de fenol^{24,25} y el azul de bromotimol (BTB),^{9,21,24,26,27} disueltos en una disolución aceptora, para determinar CO₂ en muestras reales. En el presente capítulo se ha utilizado BTB disuelto en una disolución de tampón fosfato, debido a que es el indicador que muestra mayores rangos de trabajo manteniendo una buena sensibilidad,^{21,24} ambos requisitos indispensables para la aplicación planteada.

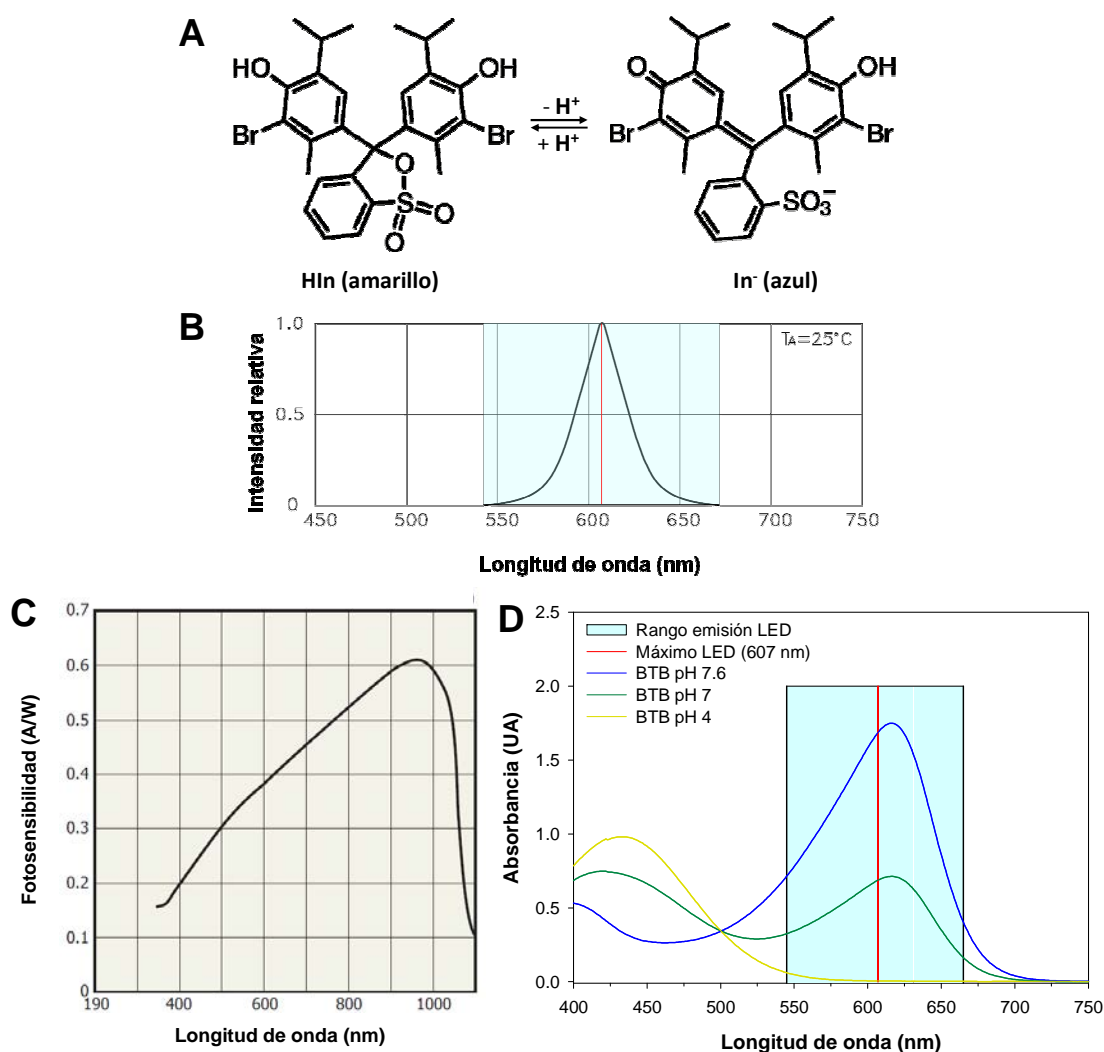


Figura 6.6. A) Equilibrio ácido-base de la molécula de BTB. B) Espectro de emisión del LED escogido. C) respuesta espectral del fotodiodo a diferentes longitudes de onda. D) Absorbancia del indicador de pH a diferentes pH y longitudes de onda con el espectro de emisión del LED solapado.

El BTB es un indicador de pH con un pK_a de 7.1 y con un rango de trabajo que va desde pH 6 a 7.6.²⁸ Por debajo de este rango, en su forma ácida (HIn) (Figura

6.6.A), presenta coloración amarilla con un máximo de absorción a 440 nm (Figura 6.6.D), mientras que por encima del rango de trabajo, en su forma básica (In^-), presenta coloración azul con un máximo de absorción a 615 nm. A valores de pH dentro del rango de trabajo, cercanos al pK_a , el indicador presenta diferentes tonalidades verdosas, en función de la contribución de cada una de las dos especies (ácida y básica). Tanto el LED como el fotodetector utilizados fueron escogidos para trabajar en la monitorización de la especie desprotonada del indicador (In^-). El LED presentaba un máximo de emisión a 607 nm (Figura 6.6.B) y el detector una fotosensibilidad adecuada a la longitud de onda de trabajo escogida (Figura 6.6.C). Una vez seleccionado el BTB como indicador sensible a pH, se procedió a optimizar la concentración del tampón $\text{HPO}_4^{2-}\text{-H}_2\text{PO}_4^-$ de la disolución aceptora. Para ello se realizaron inyecciones, por triplicado, de diferentes disoluciones estándar con la finalidad de obtener distintas curvas de calibrado, siempre con el objetivo de alcanzar un rango lineal de trabajo hasta 10000 mg L^{-1} de CO_2 , con la máxima sensibilidad posible. Recordemos que en la mayoría de muestras a analizar, el valor máximo de concentración de CO_2 que podemos encontrar ronda los 10000 mg L^{-1} .

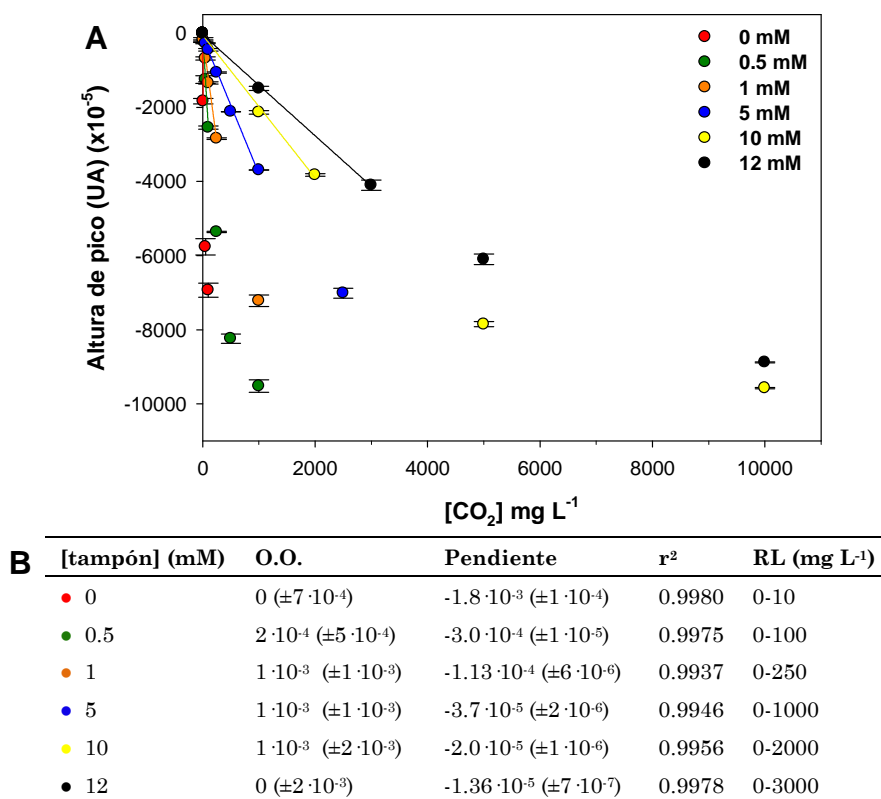


Figura 6.7. Optimización de la concentración del tampón de la disolución aceptora. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico a diferentes concentraciones de CO_2 . **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación) y el rango lineal de trabajo alcanzado.

Como variables químicas e hidrodinámicas se fijó un caudal de $500 \mu\text{L min}^{-1}$ para cada uno de los canales (disolución portadora - donde se inyectan las disoluciones

estándar/muestras-, disolución ácida y disolución aceptora), un volumen de inyección de 225 μL , una concentración de BTB 0.06 mM, un pH de 7.1 en la disolución aceptora y una concentración de H_2SO_4 0.2 M en la disolución ácida. Se evaluaron diferentes concentraciones de tampón desde 0 hasta 12 mM. La figura 6.7 muestra los resultados obtenidos. Como se puede observar, a mayor concentración de tampón, menor altura de pico causada por una concentración de CO_2 determinada y menor también la sensibilidad obtenida, pero, sin embargo, al mismo tiempo se consiguió alargar el rango de trabajo lineal. Teniendo en cuenta que el objetivo de esta parte del trabajo consiste en desarrollar un microanalyzer con un rango de trabajo relativamente amplio, centrado en concentraciones altas de CO_2 en vinos y cervezas, se primó este factor frente a obtener un LD muy bajo o una sensibilidad muy alta. Por todo ello, se escogió una concentración de tampón fosfato 12 mM como valor óptimo. Además, usando esta disolución tamponada tan concentrada, los cambios de pH producidos por la absorción de CO_2 atmosférico fueron negligibles. No obstante, en otras aplicaciones en las que se tengan que determinar concentraciones extremadamente bajas de CO_2 , sería necesario usar una disolución aceptora sin tampón o con una concentración de tampón muy baja. En estos casos, la absorción del CO_2 atmosférico sería un problema serio que se podría minimizar introduciendo cartuchos de cal sodada en la entrada de los recipientes de los reactivos, con la finalidad de eliminar el CO_2 atmosférico.²⁹

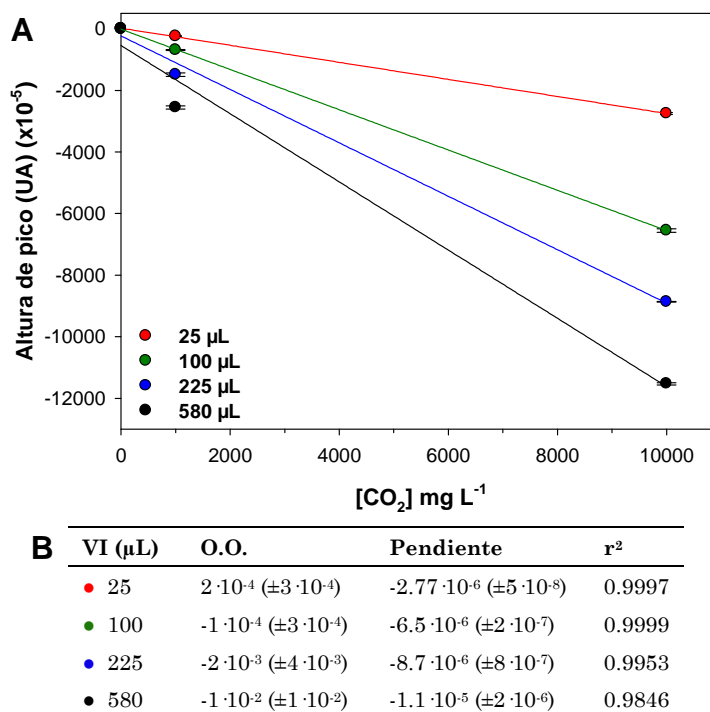


Figura 6.8. Optimización del volumen de inyección. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación).

Para optimizar el volumen de inyección se realizó la misma experiencia que en el caso anterior, fijando el valor óptimo de concentración de tampón fosfato de 12 mM. Se testaron volúmenes de inyección entre 25 y 580 μL . Los resultados (Figura 6.8) mostraron que a mayor volumen de inyección, mayor altura de pico para una concentración de CO_2 dada, lo que suponía mayor sensibilidad y LD. Sin embargo, también implicaba un mayor tiempo de análisis y un menor rango lineal de trabajo. Teniendo en cuenta que se requería un rango de trabajo lo más amplio posible, se decidió escoger como óptimo un volumen de inyección de 25 μL . Utilizando un volumen de inyección de 100 μL se obtenía, también, un rango de trabajo lineal hasta los 10000 mg L^{-1} CO_2 , proporcionando, incluso, una mayor sensibilidad y LD que con 25 μL . No obstante, en dichas condiciones se consumía cuatro veces más reactivos y muestra y se alargaba el tiempo de análisis en aproximadamente un minuto. Fijado el volumen de inyección, se siguieron optimizando el resto de parámetros y variables químicas e hidrodinámicas.

Para evaluar el papel que tenía la concentración del indicador BTB en las características analíticas del microanalizador, se realizaron distintos calibrados variando este parámetro entre 0.03 y 0.08 mM, tomando como referencia los valores encontrados en la bibliografía.^{9,21,24,27} Para ello se fijaron los valores ya optimizados de concentración del tampón fosfato, 12 mM, y volumen de inyección, 25 μL . El resto de parámetros fueron los establecidos arbitrariamente al inicio del proceso de optimización.

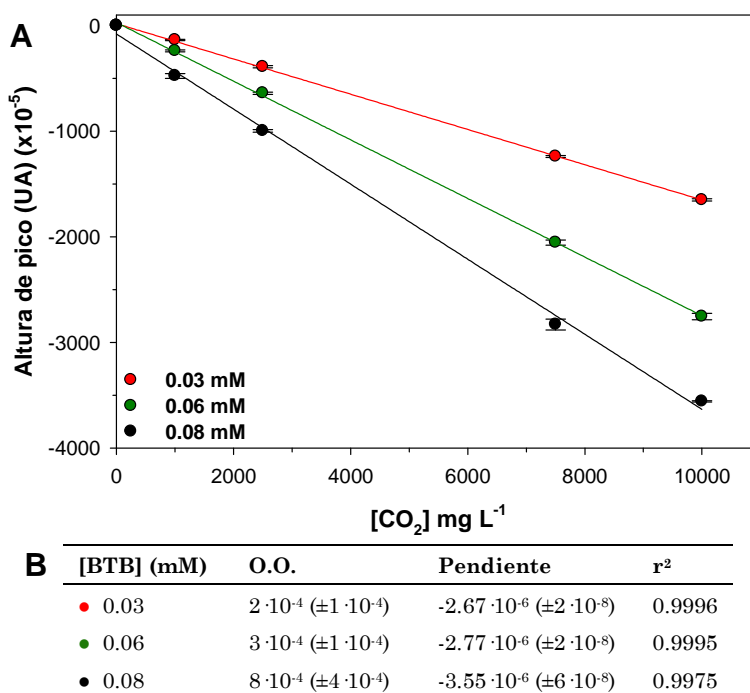


Figura 6.9. Optimización de la concentración de BTB en la disolución aceptora. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Los resultados obtenidos (Figura 6.9) mostraron que a mayor concentración de indicador, mayores alturas de pico y mayor sensibilidad. Sin embargo, utilizando una concentración de 0.08 mM, el rango lineal empezó a reducirse por lo que se fijó como óptima una concentración de BTB de 0.06 mM.

Llegados a este punto, se procedió a evaluar el pH de la disolución aceptora. Utilizando los valores de los parámetros ya optimizados y los fijados desde el inicio, se testaron valores de pH que oscilaban entre 7.1 y 8.2.

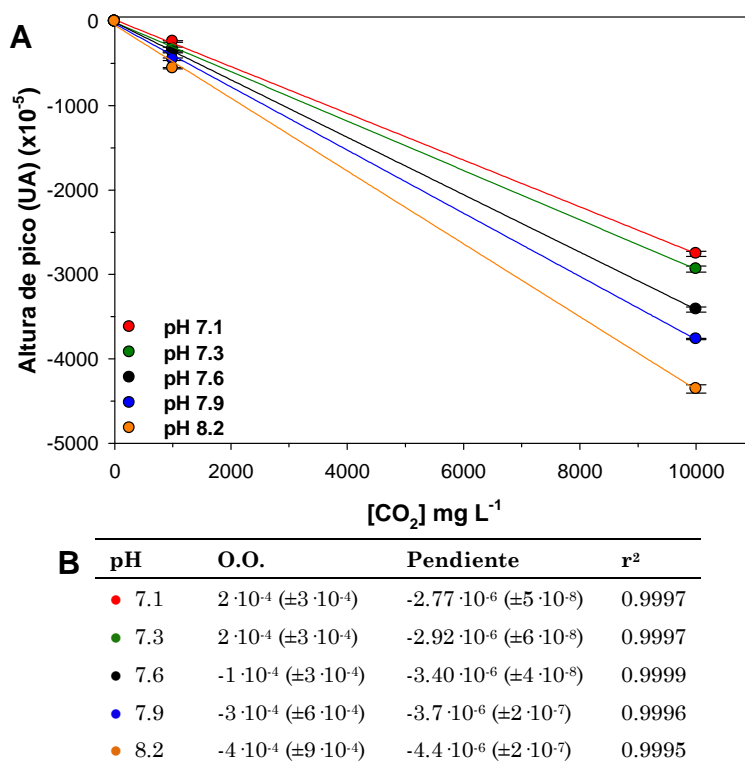


Figura 6.10. Optimización del pH de la disolución aceptora. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación).

De la correcta elección del pH de la disolución aceptora, junto a la concentración del tampón, depende la forma de la curva de calibración. En función del rango de trabajo del indicador de pH, la elección de un pH inicial demasiado alto (por encima de este) podría dificultar la determinación de concentraciones bajas del analito, debido a una disminución de la sensibilidad causada por estar fuera del rango lineal de trabajo del indicador. Este hecho provoca variaciones de absorbancia inferiores a lo esperado. Por su parte, la selección de un pH demasiado bajo, podría provocar acortamiento del rango lineal obtenido o problemas de linealidad, como en el caso anterior, si el pH escogido está por debajo del rango de trabajo lineal del indicador.¹¹ Por este motivo y en vista de los resultados (Figura 6.10), se decidió escoger como valor óptimo de pH el correspondiente al límite superior del rango

lineal de trabajo del indicador (pH 7.6) para evitar los problemas mencionados y potenciar las características analíticas del sistema.

Optimizado el pH, la siguiente variable evaluada fue el caudal de las disoluciones portadora, ácida y aceptora. Siguiendo el mismo procedimiento univariante, se testaron valores de caudal entre 100 y 500 $\mu\text{L min}^{-1}$.

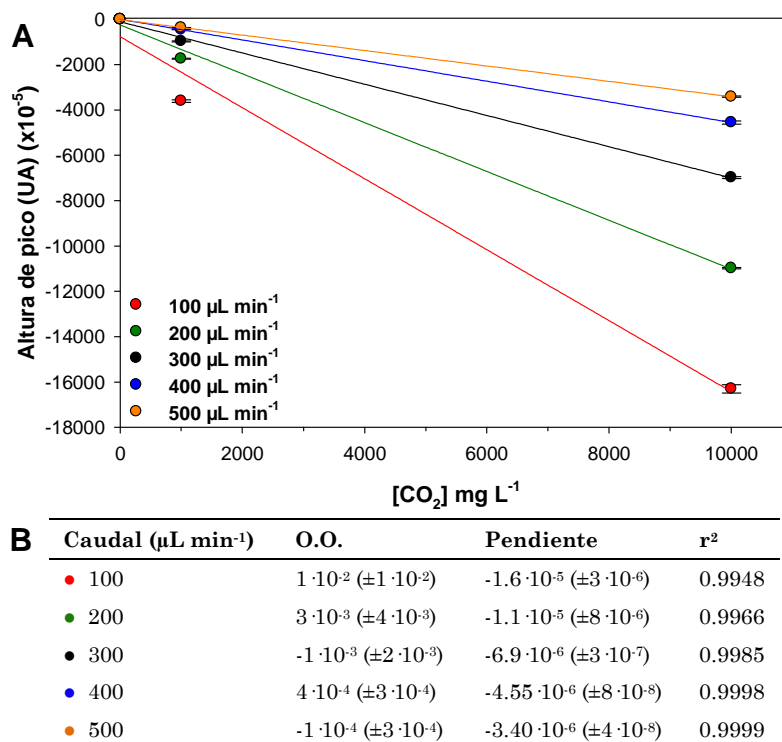


Figura 6.11. Optimización del caudal. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Los resultados (Figura 6.11) mostraron que a mayor caudal, menores alturas de pico y menores sensibilidades pero, a su vez, mayores rangos lineales de trabajo. Como se puede observar, caudales de 400 y 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ proporcionaron el rango de trabajo deseado. Finalmente, se escogió el de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$ debido a que incrementaba en un 33 % la sensibilidad obtenida, sin suponer un aumento apreciable en el tiempo de análisis.

Se barajó la posibilidad de usar, en la preparación de la disolución ácida, tanto HCl como H₂SO₄. Sin embargo, se escogió este último debido a que el HCl, al presentar una presión de vapor mayor, puede difundir a través de la membrana de PVDF provocando un cambio de pH indeseado en la disolución aceptora. La concentración de H₂SO₄ fue evaluada entre 0.2 y 0.6 M siguiendo la misma metodología usada hasta ahora. Como se puede extraer de los resultados (Figura 6.12), no existían diferencias significativas al usar las distintas concentraciones de ácido, por lo que se decidió escoger como óptima la de concentración menor (0.2 M).

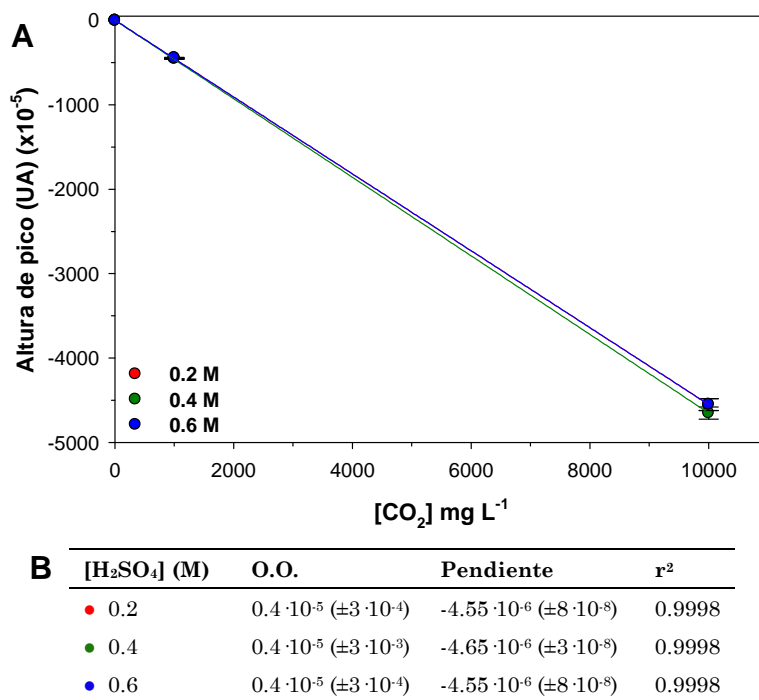


Figura 6.12. Optimización de la concentración de ácido de la disolución donadora. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Finalmente, se evaluó la relación de caudales entre las disoluciones donadora y aceptora en el interior del módulo de difusión. Se testaron relaciones de caudal en las que el más alto era el de la disolución aceptora y en otros casos era a la inversa.

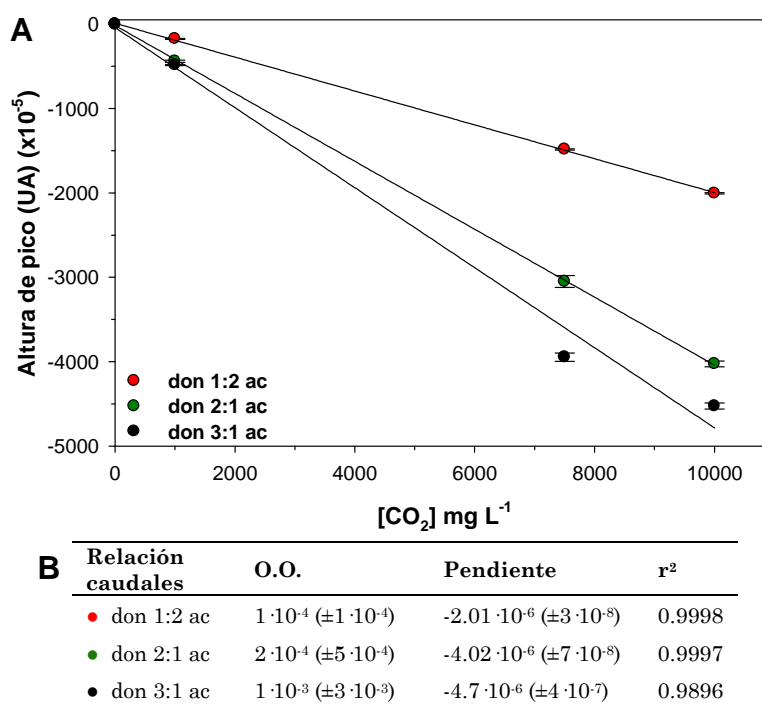


Figura 6.13. Optimización de la relación de caudales en el interior del módulo de difusión entre disolución donadora y aceptora. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

En vista de los resultados obtenidos (Figura 6.13), si el caudal de la disolución aceptora se reducía (incrementando la relación de caudales donador:aceptor) las alturas de pico aumentaban, aumentando la sensibilidad en comparación a los resultados obtenidos en condiciones isocinéticas. Sin embargo, existían limitaciones en cuanto a la integridad de la membrana de difusión de PVDF y, en consecuencia, a la robustez del microanalizador en general. Si se aplicaban relaciones de caudales altas, como por ejemplo 3:1 o 4:1 (donador:aceptor), la membrana podría sufrir más estrés y tensión debido a la diferencia de presión entre los canales de ambos lados. Este hecho podría acortar la vida de la membrana, a pesar de haberse diseñado el módulo de difusión para tratar de minimizar este efecto. Además, también se observaron problemas de linealidad e incremento del tiempo de análisis y, por tanto, de mayor consumo de reactivos y muestra, usando relaciones de caudal altas. Por este motivo, se escogió una relación de caudales de la disolución donadora y aceptora 2:1 para permitir un ligero efecto de preconcentración del analito, que se tradujo en una mayor sensibilidad, pero manteniendo el rango lineal de trabajo deseado y un tiempo de análisis aceptable.

Resumiendo, los parámetros óptimos seleccionados fueron una disolución aceptora de tampón HPO_4^{2-} - H_2PO_4^- 12 mM a pH 7.6 con BTB 0.06 mM, una disolución ácida de H_2SO_4 0.2 M, un caudal para cada canal de $400 \mu\text{L min}^{-1}$, un volumen de inyección de $25 \mu\text{L}$ y una relación de caudales en el interior del módulo de difusión 2:1 (donador:aceptor).

En cuanto a los posibles compuestos interferentes que se pueden encontrar en los tipos de muestra a analizar, tan solo se tuvo en cuenta el ión sulfito (SO_3^{2-}) ya que es el único compuesto presente en vinos, en concentraciones significativas, capaz de difundir en condiciones ácidas, en forma de dióxido de azufre (SO_2), a través de la membrana de PVDF.⁹ Su concentración en vinos puede llegar a ser de hasta $450 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_2$.³⁰ Por este motivo se decidió añadir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a la disolución ácida con la finalidad de asegurar la oxidación total del dióxido de azufre a ión sulfato (SO_4^{2-}),^{31,32} el cual no puede difundir a través de la membrana y por tanto no genera un efecto interferente. La concentración de H_2O_2 usada fue optimizada previamente,⁹ siendo de 60 mg L^{-1} . De esta manera, la composición final optimizada para la disolución ácida fue una concentración de H_2SO_4 0.2 M con una concentración de H_2O_2 de 60 mg L^{-1} . No obstante, dado que en vinos la concentración de SO_2 está normalmente en menor proporción que el CO_2 , el peróxido de hidrógeno puede ser suprimido sin obtener diferencias significativas en los resultados.

6.4. Características analíticas del microsistema

La caracterización analítica del microanalizador se llevó a cabo mediante la realización sucesiva de diferentes calibrados usando distintas disoluciones

estándar de CO₂ comprendidas entre los 0 y los 10000 mg L⁻¹. La figura 6.14 muestra, como ejemplo, el registro de la señal y la curva de calibración para un calibrado. La ecuación obtenida (n = 8; 95 % confianza) fue $A = -4.45 \cdot 10^{-6} (\pm 2 \cdot 10^{-8}) [\text{CO}_2] + 0 (\pm 1 \cdot 10^{-4})$ con $r^2=0.9999$. El LD, calculado como tres veces la desviación estándar del blanco, fue 83 mg L⁻¹, mientras que el rango lineal de trabajo conseguido fue de 255 a 10000 mg L⁻¹.

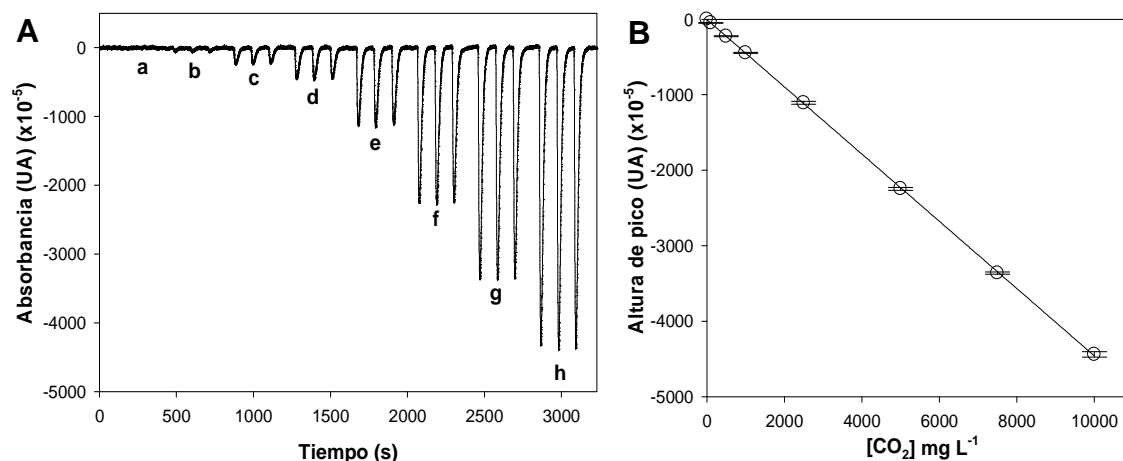


Figura 6.14. Registro de la señal (A) y curva de calibración (B) del microanalizador usando disoluciones estándar de Na₂CO₃ con concentraciones de CO₂ de 0 mg L⁻¹ (a), 100 mg L⁻¹ (b), 500 mg L⁻¹ (c), 1000 mg L⁻¹ (d), 2500 mg L⁻¹ (e), 5000 mg L⁻¹ (f), 7500 mg L⁻¹ (g) y 10000 mg L⁻¹ (h).

La repetitividad del microanalizador fue testada mediante la inyección sucesiva de dos disoluciones estándar de 2500 y 5000 mg L⁻¹ CO₂ (Figura 6.15). Los valores de CV de las señales (n = 10; 95 % confianza) fueron inferiores al 2 % en ambos casos.

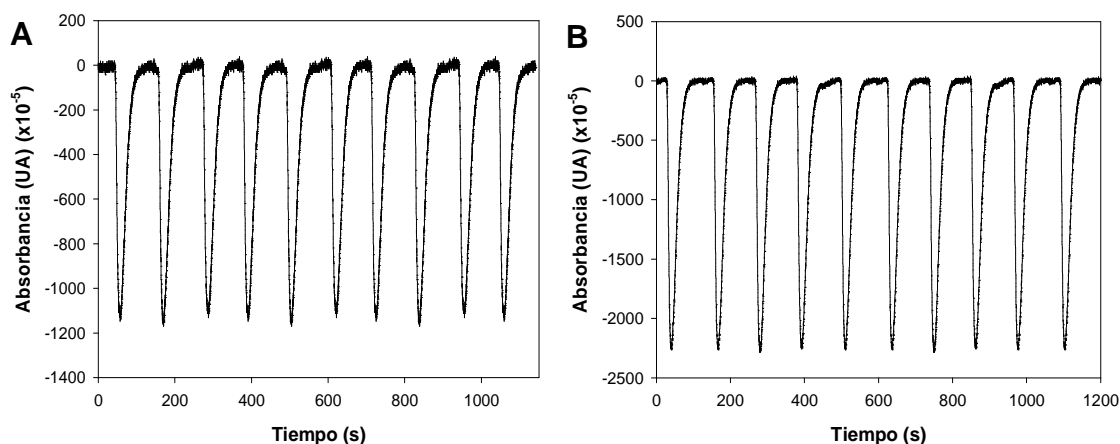


Figura 6.15. Gráficos mostrando el registro de la señal correspondiente a 10 inyecciones de una disolución estándar de 2500 mg L⁻¹ de CO₂ (A) y de 5000 mg L⁻¹ de CO₂ (B) con el fin de calcular la repetitividad del microsistema analítico.

Por último, la reproducibilidad de los resultados fue testada mediante dos calibrados llevados a cabo en diferentes días con disoluciones, tanto de reactivos como estándar, preparadas de nuevo para cada ocasión (Figura 6.16). El valor

promedio de pendiente obtenido fue de $4.39 \cdot 10^{-6}$ con un valor de CV inferior al 2 %, demostrando de esta manera la buena reproducibilidad del sistema.

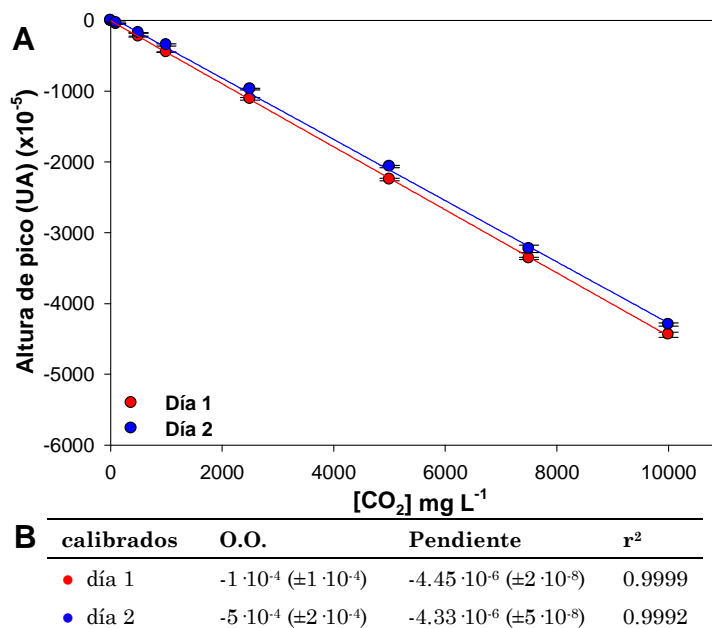


Figura 6.16. Grafico mostrando dos calibrados obtenidos en días consecutivos con distintos reactivos y disoluciones estándar con el fin de calcular la reproducibilidad del microsistema analítico propuesto. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación).

Con las condiciones optimizadas, se consiguió una frecuencia de muestreo de 30 muestras a la hora.

Todos estos resultados mostraron la robustez y la confiabilidad del microsistema analítico global y su potencialidad para ser utilizado en el análisis de muestras reales de vino y cerveza.

6.5. Análisis de muestras reales

Se analizaron diferentes muestras de vino y cerveza de distintos orígenes con la intención de validar el microanализador propuesto. Para cubrir un amplio rango de concentraciones de dióxido de carbono, se analizaron muestras de vinos ligeramente gasificados o de aguja, vinos espumosos y cervezas. Con el objetivo de establecer una comparación precisa entre los resultados obtenidos con el método propuesto y con el de referencia, las muestras fueron pretratadas de forma idéntica, siguiendo el procedimiento del método estándar.^{5,6} Así, las botellas se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de su análisis. Inmediatamente después de ser abiertas, su contenido fue tratado con 30 mL de una disolución de NaOH 10 M por cada litro de muestra. De este modo se fijó el CO₂, evitando su pérdida. Para evitar la posible absorción de CO₂ atmosférico, las muestras tratadas fueron

transferidas a botellas, que se llenaron sin dejar aire, donde se permitió que las mezclas alcanzasen temperatura ambiente antes de su determinación. Cabe destacar que el dispositivo desarrollado permite el análisis de muestras sin ningún tipo de pretratamiento previo. Como ha sido comentado previamente, se añadió NaOH para establecer una comparación más precisa entre los dos métodos. En el caso de que no se añadiera NaOH, cuanto más tiempo estén las botellas abiertas, más pérdida de analito se producirá, por lo que este es un detalle a tener en cuenta. Los resultados obtenidos con el microsistema óptico propuesto fueron validados por comparación con los obtenidos mediante el método de referencia titrimétrico. Este procedimiento, como ha sido mencionado previamente al inicio del capítulo, consistió en la valoración del CO₂ alcalinizado mediante ácido sulfúrico entre pH 8.6 y 4.0 usando un electrodo de pH. Como se puede observar (Tabla 6.1), los resultados obtenidos con el microanalizador desarrollado no difieren significativamente de los obtenidos con el método de referencia según la prueba de t de Student apareada ($t_{\text{calc}} = 1.595$; $t_{\text{tab}} = 2.365$; $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$). Este hecho confirma que el microanalizador propuesto es útil para la determinación de CO₂ en un amplio rango de muestras reales. Además, la precisión alcanzada fue mejor que la del método de referencia y comparable con la de otros analizadores más voluminosos, previamente reportados en la bibliografía.

Tabla 6.1. Valores promedio de concentración de CO₂ en mg L⁻¹ (n = 4, 95 % confianza) obtenido del análisis de las muestras de vino y cerveza utilizando el microsistema analítico propuesto.

| Muestra | Microanalizador | Método de referencia | % error |
|------------------------------------|-----------------|----------------------|---------|
| Freixenet ¹ | 6700 ± 100 | 7100 ± 320 | 6 |
| Vegaverde ² | 5000 ± 200 | 4800 ± 600 | 4 |
| Jordan ² | 4500 ± 200 | 4500 ± 700 | 0 |
| Marina de Vallformosa ² | 4100 ± 200 | 4300 ± 600 | 5 |
| Blanc Pescador ² | 3300 ± 100 | 3400 ± 300 | 3 |
| Casal Garcia ³ | 2900 ± 200 | 3000 ± 300 | 3 |
| La Marchesina ⁴ | 5800 ± 200 | 6000 ± 300 | 3 |
| Estrella Damm ⁵ | 5400 ± 200 | 5400 ± 600 | 0 |

¹Vino espumoso denominado Cava (España), ²Vino blanco ligeramente espumoso (España), ³Vino blanco ligeramente espumoso (Portugal), ⁴Vino tinto ligeramente espumoso denominado Lambrusco (Italia), ⁵Cerveza (España).

Merece la pena mencionar que el microanalizador desarrollado sería capaz de monitorizar on-line la concentración de CO₂ en procesos de fermentación en compañías cerveceras o en bodegas. Sin embargo, debido a dificultades logísticas, este tipo de muestras no pudieron ser analizadas.

6.6. Otras aplicaciones: monitorización de la acidificación del océano

Aproximadamente el 30 % del CO_2 antropogénico es absorbido por los océanos.^{33,34} El incremento del CO_2 disuelto en la superficie de estos afecta profundamente al sistema de carbonato del agua de mar a través de una serie de reacciones químicas bien conocidas (Figura 6.17).³⁵⁻³⁸ Como se puede apreciar, el CO_2 disuelto reacciona con el agua de mar para dar lugar al ácido carbónico, el cual se disocia en bicarbonato (HCO_3^-) y protones (H^+). Este fenómeno resulta en un descenso del pH, siendo comúnmente conocido como acidificación del océano. No obstante, el pH del agua del mar sigue siendo alcalino (alrededor de pH 8.1 en la actualidad).³⁴ Esto es posible porque al pH indicado, el sistema de carbonato constituye el tampón carbonato/bicarbonato.²⁰ Este hecho, provoca que el exceso de protones reaccione con los iones carbonato (CO_3^{2-}) presentes en el agua de mar, para generar más iones HCO_3^- , amortiguando así el descenso de pH. De esta manera, el agua va perdiendo su saturación de iones CO_3^{2-} , siendo suplidos por la redisolución de algunos minerales de CaCO_3 como la calcita y el aragonito,³⁹ constituyentes fundamentales de los exoesqueletos calcáreos de numerosos organismos marinos como moluscos, equinodermos, corales y algunas variedades de algas.

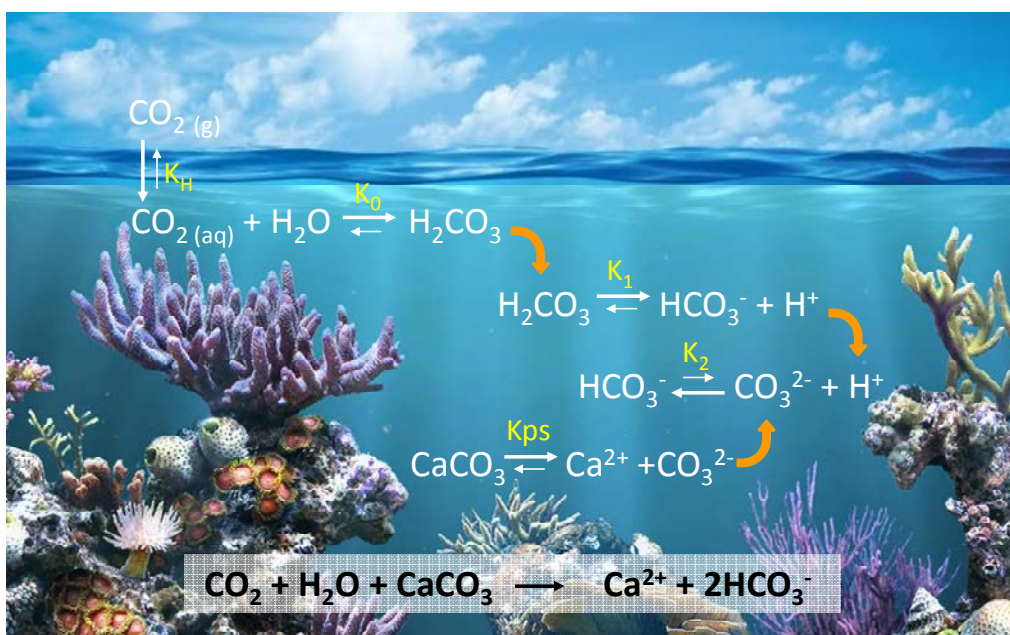


Figura 6.17. Diagrama explicativo de los procesos que producen la acidificación oceánica. K_H (ct. de solubilidad) = 2.19; pK_0 (ct. de hidratación) = 1.54; pK_1 (ct. de disociación 1) = 5.84; pK_2 (ct. de disociación 2) = 8.95; pK_{ps} (ct. de solubilidad) = 8.32.

Como consecuencias directas de este fenómeno destacan, como se ha descrito, la disminución del pH, el aumento de bicarbonato, el descenso de carbonato y, por consiguiente, el deterioro de los organismos con exoesqueleto calcáreo. Sin embargo

las consecuencias indirectas a largo plazo de todas estas alteraciones en la química del agua de mar pueden ser imprevisibles. Así, podrían inducir cambios en las cadenas tróficas de los ecosistemas acuáticos a escala local o global, provocando la disminución de la diversidad y de la cantidad de fauna y flora, hecho que podría repercutir negativamente en las actividades pesqueras.^{33,40,41} Además, la pérdida de la capacidad tampón del agua de mar, provocaría una disminución de la absorción del CO₂ atmosférico, hecho que potenciaría más el calentamiento global y los efectos del cambio climático.

Se estima que desde la revolución industrial, la acidificación de la superficie de los océanos ha aumentado cerca de un 30 %, disminuyendo el pH desde 8.18 hasta 8.1 en la actualidad.³⁴ Las previsiones basadas en modelos confeccionados por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) plantean escenarios de reducción del pH entre 0.14 y 0.35 unidades a lo largo del siglo 21, hasta llegar a un valor de 7.8 en el año 2100.⁴² Teniendo en cuenta que a lo largo de las edades geológicas de la Tierra, el valor de pH oceánico ha oscilado entre 8.3 y 8, es evidente la gravedad de la situación a la que se enfrenta la humanidad y los posibles efectos adversos que puede acarrear. Algunas soluciones que se han propuesto para paliar estos efectos son la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero, la reducción de la deforestación, la reducción de las actividades pesqueras a nivel local, en casos severos, y la captura o almacenamiento de CO₂ siguiendo diferentes procedimientos.⁴²⁻⁴⁴ Sin embargo el efecto de inercia del CO₂ ya generado puede seguir durante décadas, sin saber con certeza su impacto real.

Para tratar de paliar la acidificación oceánica, se requiere instrumentación analítica que permita la monitorización en tiempo real de las principales variables de las que depende la química del carbono en agua de mar, como pH, $p\text{CO}_2$, carbono inorgánico disuelto (DIC) y alcalinidad total.⁴¹ Esta instrumentación analítica debería poder ser instalada en boyas marinas autónomas, actuando como estaciones móviles de control analítico. Para cumplir dicho objetivo, la instrumentación debería presentar una elevada miniaturización y portabilidad, bajo coste, bajos límites de detección con sensibilidades altas, bajo consumo de reactivos y elevada robustez. Existen diferentes empresas que están desarrollando este tipo de instrumentación analítica, pero no siempre es posible que los equipos desarrollados cumplan todos los requisitos exigidos.⁴⁵

Por ello, en esta parte de la tesis, se presenta la adaptación del microanalizador de CO₂ desarrollado anteriormente para su uso en la monitorización de la concentración de DIC (sumatorio de [H₂CO₃], [HCO₃⁻] y [CO₃²⁻]) en forma de CO₂ en agua de mar.

Los materiales y reactivos utilizados, así como el montaje experimental y el diseño de la plataforma microfluídica son idénticos a los presentados en los apartados §6.1, §6.2, y §6.3, respectivamente.

6.6.1. Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas

Dado que el valor promedio de DIC en aguas consideradas normales ronda entre los 85 y los 95 mg L⁻¹ CO₂,^{46,47} la optimización de las variables químicas e hidrodinámicas del microanalizador tuvo, como principal objetivo, alcanzar la máxima sensibilidad del microanalizador en un rango de trabajo que abarcara hasta 100 mg L⁻¹ CO₂. Una mayor sensibilidad permitirá discriminar pequeñas variaciones de concentración de CO₂ y determinar con mayor precisión si existe, localmente, acidificación en las aguas marinas analizadas. En este apartado, análogamente al caso anterior (§6.3.3), se evaluaron las diferentes variables y parámetros usando una optimización univariante. Junto a una sensibilidad y rango lineal adecuados, se intentó llegar a un compromiso entre el consumo de reactivos y muestra, y la frecuencia de muestreo.

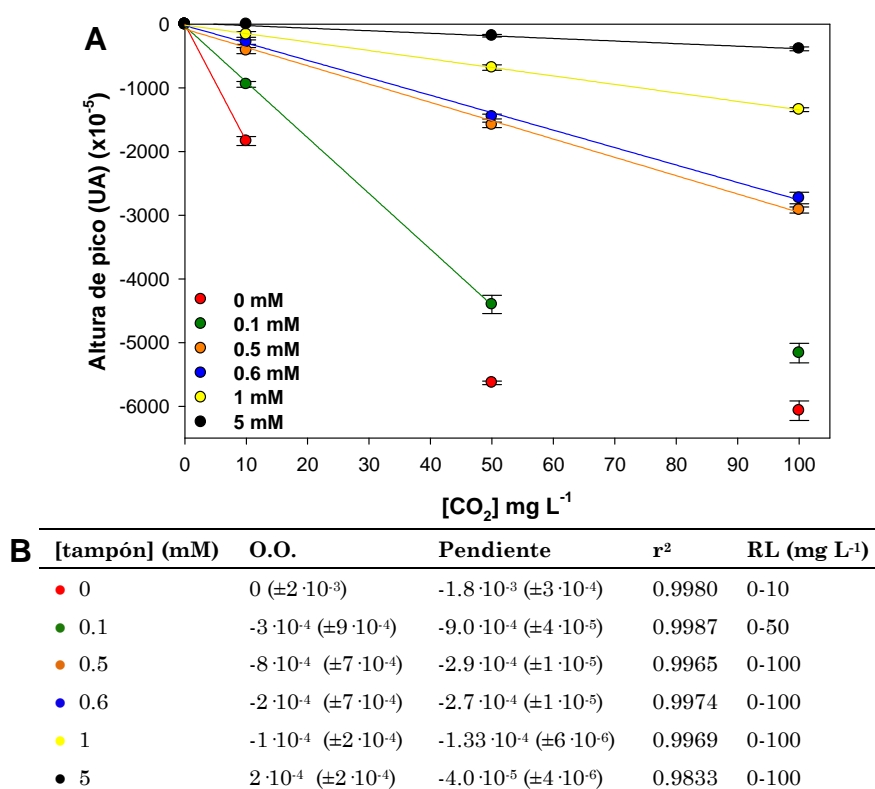


Figura 6.18. Optimización de la concentración del tampón de la disolución aceptora. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Inicialmente se optimizó la concentración del tampón HPO₄²⁻-H₂PO₄⁻ que constituye la disolución aceptora. Para ello se realizaron inyecciones, por triplicado, de diferentes disoluciones estándar con la finalidad de obtener distintas curvas de calibrado. Como variables químicas e hidrodinámicas iniciales se estableció un caudal de 400 μL min⁻¹ para cada uno de los canales (disolución portadora, ácida y aceptora), un volumen de inyección de 225 μL, una concentración de BTB de 0.06

mM, un pH de 7.1 en la disolución aceptora y una concentración de H_2SO_4 de 0.2 M en la disolución ácida. Se testaron diferentes concentraciones de tampón fosfato desde 0 hasta 5 mM. Como se puede observar (Figura 6.18), a mayor concentración de tampón, menor altura de pico para una concentración de CO_2 determinada y menor la sensibilidad obtenida. Sin embargo, el rango de trabajo lineal se incrementó. Para esta aplicación se escogió una concentración tampón de 0.6 mM, por ser el valor que permitía obtener una mayor sensibilidad respetando el rango de trabajo prefijado.

Teniendo en cuenta la elevada fuerza iónica (I) del agua de mar, se decidió verificar si cambios en la I de la muestra influían en el proceso de difusión gaseosa. Cabría recordar que la fuerza iónica del agua de mar tiene valores próximos a 0.7 m,⁴⁸ mientras que en las disoluciones estándar utilizadas, ésta es 500 veces menor ($I = 1.5 \cdot 10^{-3}$ m), al tener únicamente disuelto el analito. Con este objetivo, se realizó un ensayo en el que se inyectaron por triplicado, disoluciones estándar de 85 mg L^{-1} CO_2 con valores de fuerza iónica crecientes, hasta llegar a los 0.7 m, correspondientes al agua de mar. Las condiciones experimentales se mantuvieron, fijando la concentración de tampón fosfato en 0.6 mM.

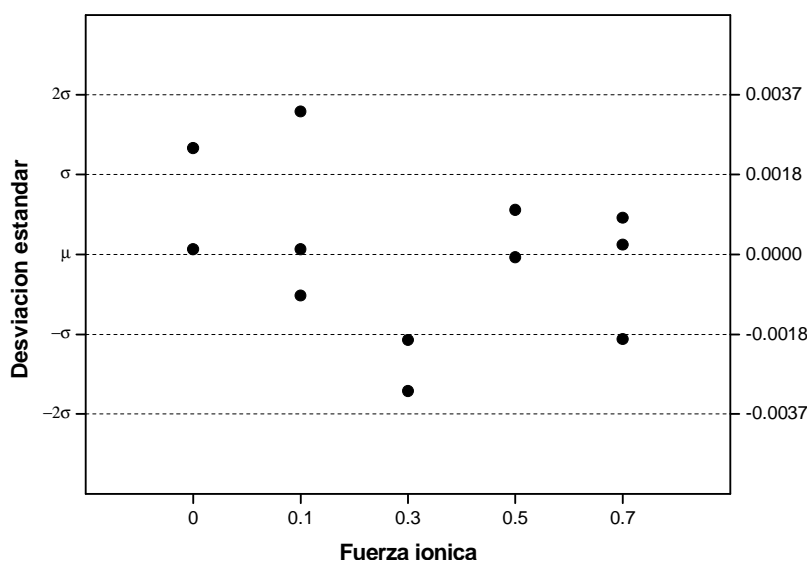


Figura 6.19. Estudio de la influencia de la fuerza iónica en la respuesta analítica del microanalizador.

Como se puede observar (Figura 6.19), hubo una distribución aleatoria de los resultados (dentro de los márgenes de variabilidad esperados), cosa que puso de relevancia la no influencia de la fuerza iónica en las medidas. Para verificar que los resultados eran idénticos en todos los niveles de concentración de CO_2 , se realizaron dos calibrados, uno utilizando disoluciones estándar preparadas con una fuerza iónica similar a la del agua de mar y otro con $I \approx 0$ m.

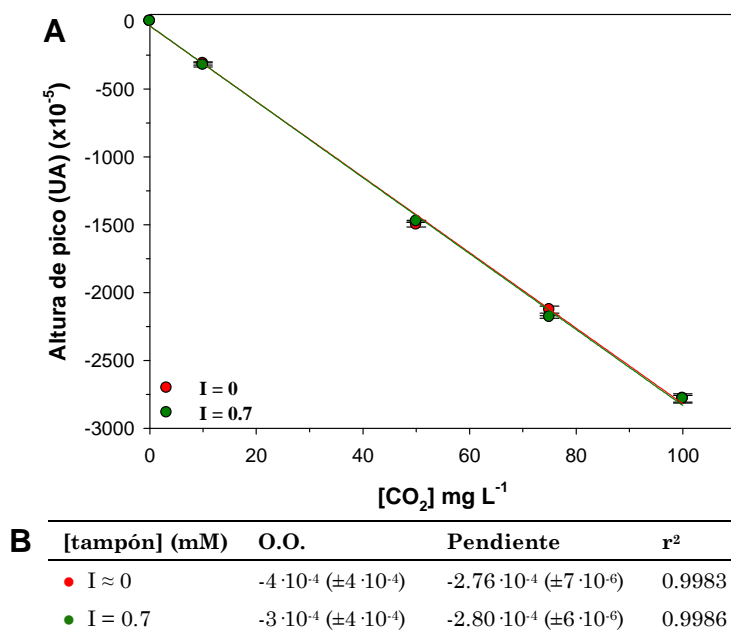


Figura 6.20. Estudio de la influencia de la fuerza iónica de la muestra en las características de respuesta. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación).

Los resultados mostraron (Figura 6.20), como era de esperar, que no había diferencias significativas en las alturas de pico para ambos calibrados, concluyéndose que la fuerza iónica no afectaba en el proceso de medida y, por tanto, tampoco al de difusión gaseosa. Por este motivo, no hizo falta preparar las disoluciones estándar con fuerza iónica similar a la del agua de mar.

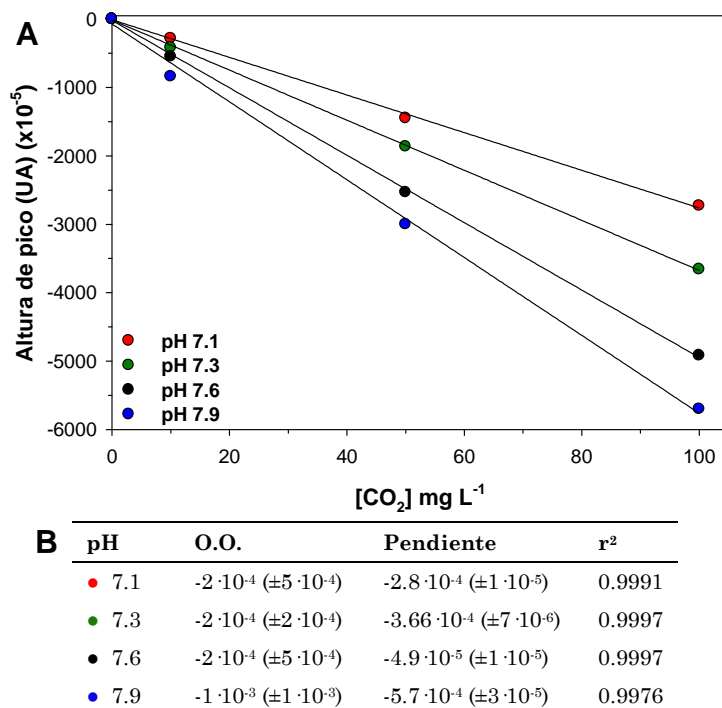


Figura 6.21. Optimización del pH de la disolución aceptora. **A)** representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

En cuanto a la optimización del pH de la disolución aceptora, se testaron valores entre 7.1 y 7.9. Se pudo observar (Figura 6.21) que al aumentar el pH se obtenían valores de sensibilidad mayores, aunque para los valores más altos de pH la linealidad de la recta deseada también empezaba a perderse. Por este motivo, se escogió pH 7.6 como valor óptimo.

Llegados a este punto, se optimizó la concentración de H₂SO₄ en la disolución ácida. Se testaron valores de concentración entre 0.2 y 1 M, observándose que no existían diferencias significativas en los calibrados obtenidos (Figura 6.22). Es por este motivo que se escogió como óptima la concentración más baja de las usadas, 0.2 M, por motivos de seguridad y por ahorro en gasto de reactivos.

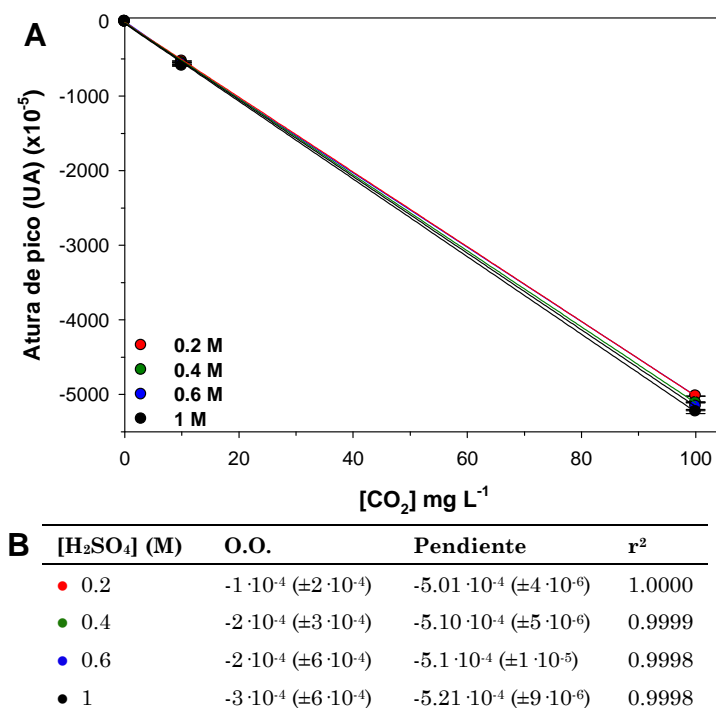


Figura 6.22. Optimización de la concentración de ácido de la disolución donadora. **A)** representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Por lo que respecta al volumen de inyección, se testaron valores entre 25 y 580 μL. Los resultados (Figura 6.23) mostraron que a mayor volumen de inyección, mayor altura de pico causada por una concentración de CO₂ dada. Esto implicaba una mayor sensibilidad y LD, pero, un mayor tiempo de análisis y un menor rango lineal de trabajo. Por todo ello, y como solución de compromiso, se escogió como óptimo un volumen de inyección de 225 μL para maximizar la sensibilidad en el rango de trabajo deseado.

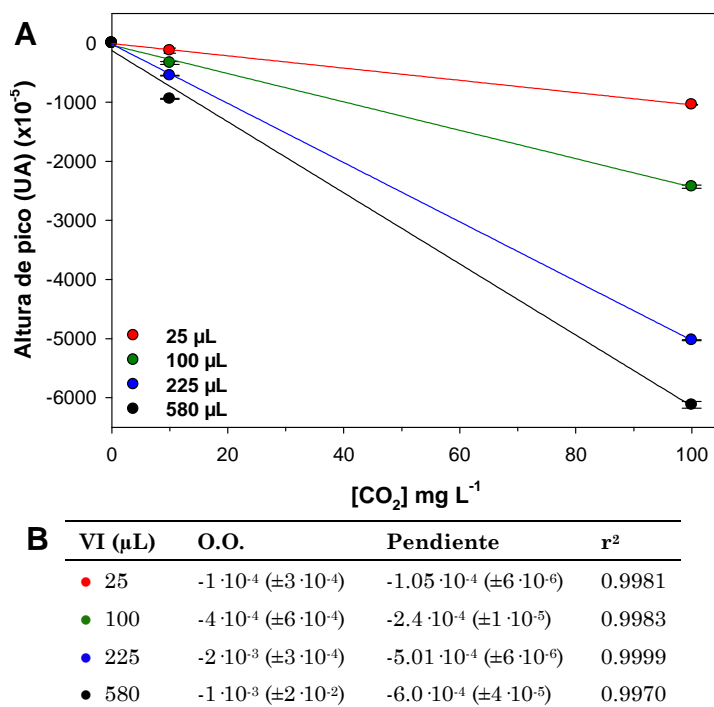


Figura 6.23. Optimización del volumen de inyección. **A)** representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Por último, se evaluó la influencia del caudal de cada canal (disolución portadora, donadora y aceptora) sobre las características analíticas de respuesta del sistema analítico. Se testaron caudales con valores comprendidos entre 100 y 500 µL min⁻¹.

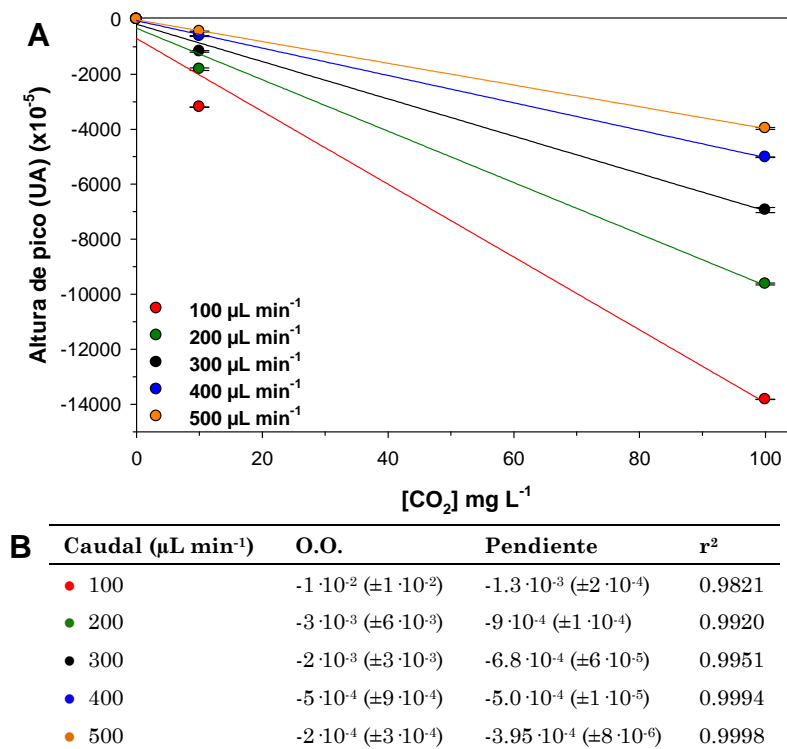


Figura 6.24. Optimización del caudal. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Los resultados obtenidos (Figura 6.24), mostraron que a mayor caudal, menor tiempo de análisis pero, también, menor altura de pico y, por tanto, menor sensibilidad. En este sentido, se decidió escoger un caudal de $400 \mu\text{L min}^{-1}$ para maximizar la sensibilidad sin comprometer la linealidad en el rango deseado.

6.6.2. Características analíticas del microsistema

La caracterización analítica del microanalizador optimizado para determinar DIC en forma de CO_2 en muestras de agua de mar, se llevó a cabo mediante la realización sucesiva de diferentes calibrados usando distintas disoluciones estándar de CO_2 comprendidas entre los 0 y los 150 mg L^{-1} . La figura 6.25 muestra el registro de la señal y la curva de calibración para uno de ellos. La ecuación obtenida ($n = 8$; 95 % confianza) fue $A = -4 \cdot 10^{-4} (\pm 4 \cdot 10^{-4}) - 4.89 \cdot 10^{-4} (\pm 6 \cdot 10^{-6}) [\text{CO}_2]$ con $r^2=0.9992$. El LD, calculado como tres veces la desviación estándar del blanco, fue 1.2 mg L^{-1} , mientras que el rango lineal de trabajo conseguido fue de 3 a $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ CO}_2$, observándose un margen de linealidad en los valores de concentración por encima de este límite determinado experimentalmente, que podría ser de utilidad para poder calcular, mediante extrapolación, la concentración de CO_2 de aquellas muestras que presentaran un valor de DIC mayor de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ CO}_2$.

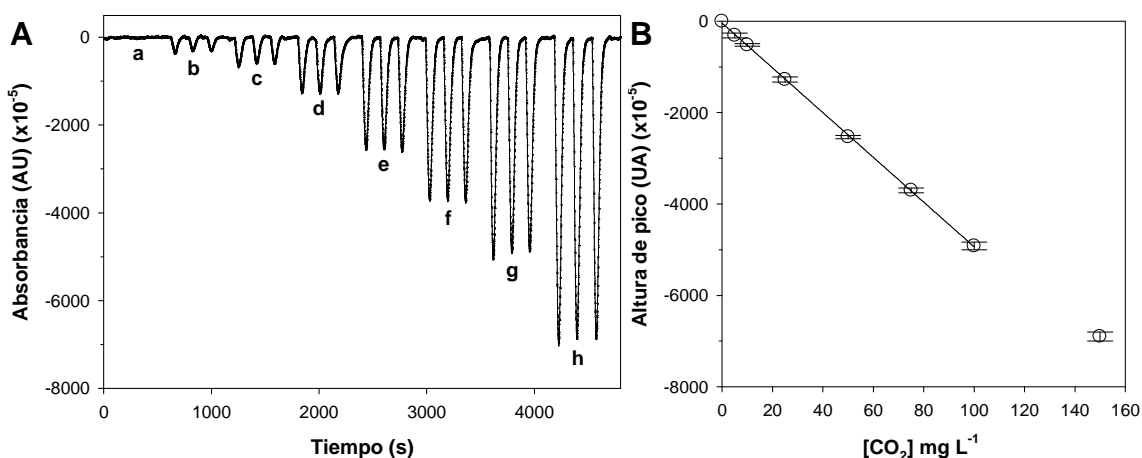


Figura 6.25. Registro de la señal (A) y curva de calibración (B) del microanalizador usando disoluciones estándar de Na_2CO_3 con concentraciones de CO_2 de 0 mg L^{-1} (a), 5 mg L^{-1} (b), 10 mg L^{-1} (c), 25 mg L^{-1} (d), 50 mg L^{-1} (e), 75 mg L^{-1} (f), 100 mg L^{-1} (g) y 150 mg L^{-1} (h).

6.6.3. Análisis de muestras reales

A falta de un estudio más amplio, que se prevé realizar en el futuro, se analizaron dos muestras de agua de mar tomadas en dos puntos diferentes de la costa del Maresme (Mataró, España). Los valores de DIC obtenidos ($n = 3$, 95 % confianza) fueron 86.1 ± 1.3 y $82.7 \pm 1.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ CO}_2$, en ambos casos, valores cercanos al rango normal de este parámetro en aguas marinas. Para obtener una visión global y

completa del estado de las aguas analizadas, se necesitaría realizar medidas periódicas en el mismo punto de toma de la muestra. De esta manera, se podría estimar la evolución, a escala local, del estado del agua de mar y tener una visión dinámica de la tendencia con respecto a la acidificación. Las experiencias preliminares realizadas solo pretendían dar una idea de la potencialidad del microanalizador presentado y detectar si la matriz podía afectar al funcionamiento del microsistema. En ningún caso la intención era hacer un estudio comparativo de los resultados obtenidos frente a los obtenidos por el método de referencia.

6.1. Conclusiones

En este capítulo se ha presentado, en primero lugar, un microanalizador espectrofotométrico de bajo coste para la determinación de dióxido de carbono en muestras de vino y cerveza, integrando una membrana de difusión gaseosa de PVDF. El microsistema analítico resultante es robusto y compacto y proporciona una rápida respuesta analítica con un consumo de reactivos y muestra reducidos, así como un mayor rango de trabajo y nivel de miniaturización, en comparación con otros analizadores de CO₂ reportados previamente.^{1,9} Además, el uso del concepto de llave-cerradura permitió la utilización, como sistema de detección, de un lector óptico de plataformas microfluídicas miniaturizado, donde el microanalizador podía ser insertado, consiguiendo un alineamiento perfecto entre la fuente de luz, la cámara de detección y el fotodetector. Esta aproximación hizo que el sistema analítico global fuera simple, robusto y compacto, proporcionando una muy buena precisión y repetitividad en las medidas realizadas. Asimismo, las características analíticas obtenidas permitirían, también, extender el uso del microanalizador para la monitorización on-line de procesos de fermentación en bodegas o compañías cerveceras.

En segundo lugar, para probar la versatilidad del concepto asociado al microanalizador miniaturizado, se adaptó la configuración de este para su aplicación en la monitorización y cuantificación del nivel de acidificación oceánica, mediante la determinación del carbono inorgánico disuelto (DIC) en forma de CO₂. En este caso, los resultados obtenidos mostraron una gran potencialidad del sistema analítico que debería ser explotada en mayor profundidad en un futuro por el GSB.

6.2. Referencias

1. Mataix, E. & Luque de Castro, M. D. Sequential determination of carbon dioxide and free sulfur dioxide in wine by flow-injection pervaporation with in series potentiometric-photometric detection. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 365, 377–380 (1999).
2. Liger-Belair, G., Polidori, G. & Zéninari, V. Unraveling the evolving nature of gaseous and dissolved carbon dioxide in champagne wines: A state-of-the-art review, from the bottle to the tasting glass. *Anal. Chim. Acta* 732, 1–15 (2012).
3. Clark, R. A., Hewson, L., Bealin-Kelly, F. & Hort, J. The interactions of CO₂, ethanol, hop acids and sweetener on flavour perception in a model beer. *Chemosens. Percept.* 4, 42–54 (2011).
4. International organisation of vine and wine. Compendium of international methods of wine and must analysis. (2012).
5. Official Journal of the European Union. C43. (2010).
6. AOAC International. Official Methods of Analysis. (2012).
7. Zosel, J., Oelßner, W., Decker, M., Gerlach, G. & Guth, U. The measurement of dissolved and gaseous carbon dioxide concentration. *Meas. Sci. Technol.* 22, 72001 (2011).
8. Severinghaus, J. W. & Freeman, A. Electrodes for blood pO₂ and pCO₂ determination. *J. Appl. Physiol.* 13, 515–520 (1958).
9. Atanassov, G. T., Lima, R. C., Mesquita, R. B. R., Rangel, A. O. S. S. & Tóth, I. V. Spectrophotometric determination of carbon dioxide and sulphur dioxide in wines by flow injection. *Analisis* 28, 77–82 (2000).
10. Lucena, R., Cárdenas, S., Gallego, M. & Valcárcel, M. Multipurpose chamber for the implementation of gas diffusion, dialysis, solid-phase extraction and precipitation/dissolution in continuous flow analyzers. *Anal. Chim. Acta* 509, 47–54 (2004).
11. Ljunggren, E. & Karlberg, B. Determination of total carbon dioxide in beer and soft drinks by gas diffusion and flow injection analysis. *J. Automat. Chem.* 17, 105–108 (1995).
12. Dasgupta, P. K., Eom, I. Y., Morris, K. J. & Li, J. Light emitting diode-based detectors: Absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell. *Anal. Chim. Acta* 500, 337–364 (2003).

13. Yang, F. B., Pan, J. Z., Zhang, T. & Fang, Q. A low-cost light-emitting diode induced fluorescence detector for capillary electrophoresis based on an orthogonal optical arrangement. *Talanta* 78, 1155–1158 (2009).
14. de Lima, K. M. G. A portable photometer based on LED for the determination of aromatic hydrocarbons in water. *Microchem. J.* 103, 62–67 (2012).
15. Pedro, S. G. et al. A ceramic microreactor for the synthesis of water soluble CdS and CdS/ZnS nanocrystals with on-line optical characterization. *Nanoscale* 4, 1328 (2012).
16. O'Toole, M., Lau, K. T., Shepherd, R., Slater, C. & Diamond, D. Determination of phosphate using a highly sensitive paired emitter-detector diode photometric flow detector. *Anal. Chim. Acta* 597, 290–294 (2007).
17. Oosterbroek, E. Modeling , Design and Realization of Microfluidic Components (tesis doctoral). Universiteit Twente (1996).
18. Ymbern, O. et al. Versatile lock and key assembly for optical measurements with microfluidic platforms and cartridges. *Anal. Chem.* 87, 1503–1508 (2015).
19. Ymbern, O. Development of centrifugal microfluidic platforms based on polymer microfabrication technology (tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2015).
20. Vries, J. J. d. in *Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle Principles and Applications Vol 1* 143–166 (International Atomic Energy Agency and United Nations Educational, 2000).
21. Faber, P. A., Cook, P. L. M., McKelvie, I. D. & Ellis, P. S. Development of a gas diffusion probe for the rapid measurement of pCO₂ in aquatic samples. *Anal. Chim. Acta* 691, 1–5 (2011).
22. Greenwood, N. N. & Earnshaw, A. *Chemistry of the elements*. (Butterworth-Heinemann, 1997).
23. Liao, H., Kadjo, A. F. & Dasgupta, P. K. Concurrent High-Sensitivity Conductometric Detection of Volatile Weak Acids in a Suppressed Anion Chromatography System. *Anal. Chem.* 87, 8342–8346 (2015).
24. Lu, Z., Dai, M., Xu, K., Chen, J. & Liao, Y. A high precision, fast response, and low power consumption in situ optical fiber chemical pCO₂ sensor. *Talanta* 76, 353–359 (2008).
25. Satiemperakul, S. et al. Determination of carbon dioxide in gaseous samples by gas diffusion-flow injection. *Talanta* 62, 631–636 (2004).

26. 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, 1014–22 (2014).
27. Gray, S. M., Ellis, P. S., Grace, M. R. & McKelvie, I. D. Underway determination of alkalinity in estuarine waters by reagent-injection gas-diffusion flow analysis. *Talanta* 77, 533–540 (2008).
28. Klotz, E., Doyle, R., Gross, E. & Mattson, B. The Equilibrium Constant for Bromothymol Blue: A General Chemistry. *J. Chem. Educ.* 88, 637–639 (2011).
29. Guo, Y., Zhao, C., Li, C. & Wu, Y. CO₂ sorption and reaction kinetic performance of K₂CO₃/AC in low temperature and CO₂ concentration. *Chem. Eng. J.* 260, 596–604 (2015).
30. Fleet, G. H. *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Taylor and Francis, 1993).
31. Robbin Martin, L. & Damschen, D. E. Aqueous oxidation of sulfur dioxide by hydrogen peroxide at low pH. *Atmos. Environ.* 15, 1615–1621 (1981).
32. Kunen, S. M., Lazrus, A. L., Kok, G. L. & Heikes, B. G. Aqueous Oxidation of SO₂ by hydrogen peroxide. *J. Geophys. Res.* 88, 3671–3674 (1983).
33. Albright, R. et al. Ocean acidification: Linking science to management solutions using the Great Barrier Reef as a case study. *J. Environ. Manage.* 182, 641–650 (2016).
34. Billé, R. et al. Taking action against ocean acidification: A review of management and policy options. *Environ. Manage.* 52, 761–779 (2013).
35. Hofmann, L. C. & Bischof, K. Ocean acidification effects on calcifying macroalgae. *Aquat. Biol.* 22, 261–279 (2014).
36. Skirrow, G. . & Whitfield, M. . The effect of increases in the atmospheric carbon dioxide content on the carbonate ion concentration of surface ocean water at 25 °C. *Limnol. Oceanogr.* 20, 103–108 (1975).
37. Millero, F. J. Thermodynamics of the carbon dioxide system in the ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 661–677 (1995).
38. Carroll, J. J., Slupsky, J. D. & Mather, A. E. The solubility of carbon dioxide in water.pdf. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 20, 1201–1209 (1991).
39. Chierici, M. & Fransson, A. Calcium carbonate saturation in the surface water of the Arctic Ocean: undersaturation in freshwater influenced shelves. *Biogeosciences Discuss.* 6, 4963–4991 (2009).
40. Mathis, J. T. et al. Ocean acidification risk assessment for Alaska’s fishery sector. *Prog. Oceanogr.* 136, 71–91 (2015).

41. National Research Council & Press, N. A. *Ocean Acidification: A National Strategy to Meet the Challenges of a Changing Ocean*. (The National Academies press, 2010).
42. Broadgate, W. et al. *La acidificación del océano. Resumen para responsables de políticas. Tercer simposio El Océano en un Mundo con Altos Niveles de CO₂* (2013).
43. Coffin, R. B., Montgomery, M. T., Boyd, T. J. & Masutani, S. M. Influence of ocean CO₂ sequestration on bacterial production. *Energy* 29, 1511–1520 (2004).
44. Leung, D. Y. C., Caramanna, G. & Maroto-Valer, M. M. An overview of current status of carbon dioxide capture and storage technologies. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 39, 426–443 (2014).
45. Martz, T. R., Daly, K. L., Byrne, R. H., Stillman, J. H. & Turk, D. Technology for ocean acidification research: Needs and availability. *Oceanography* 28, 40–47 (2015).
46. Emerson, S. & Hedges, J. in *Chemical oceanography and the marine carbon cycle* 101–133 (Cambridge University Press, 2008).
47. Ji, H., Sheng, G., Xin, H. & Sha, Y. Distribution of dissolved inorganic carbon (DIC) and its related parameters in seawater of the North Yellow Sea and off the Qingdao Coast in October, 2007. *J. Ocean Univ. China* 8, 366–376 (2009).
48. Zeebe, R. E. & Wolf-Gladrow, D. *CO₂ in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes*. (Elsevier Science, 2001).

Capítulo 7

Microsistema analítico automatizado para la determinación espectrofotométrica de fósforo en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs)

El fósforo es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta para controlar la calidad del agua en ecosistemas acuáticos.¹ El especial interés en su monitorización radica en el hecho de que es uno de los nutrientes limitantes, junto al nitrógeno, del crecimiento de algunas variedades de algas, plantas y bacterias, de manera que un exceso de fósforo disuelto en agua favorece la aparición del fenómeno de eutrofización.²⁻⁴ Este fenómeno, a grandes rasgos, se caracteriza por un excesivo desarrollo de la biomasa a nivel superficial, que se traduce en un rápido consumo del oxígeno presente en el medio que altera las cadenas tróficas y el orden del ecosistema, causando una gran cantidad de efectos indeseados.

El proceso (Figura 7.1) se inicia con el aporte excesivo de nutrientes (fósforo y nitrógeno) al cuerpo de agua procedentes, mayoritariamente, del uso de fertilizantes agrícolas y de industrias agropecuarias y de detergentes con fosfatos (1). Esto fomenta la proliferación descontrolada de biomasa en la superficie (2), cuya acumulación disminuye la zona fótica y el oxígeno, debido a la alta demanda de este y a la reducción de fotosíntesis (3). La muerte de la biomasa acumula

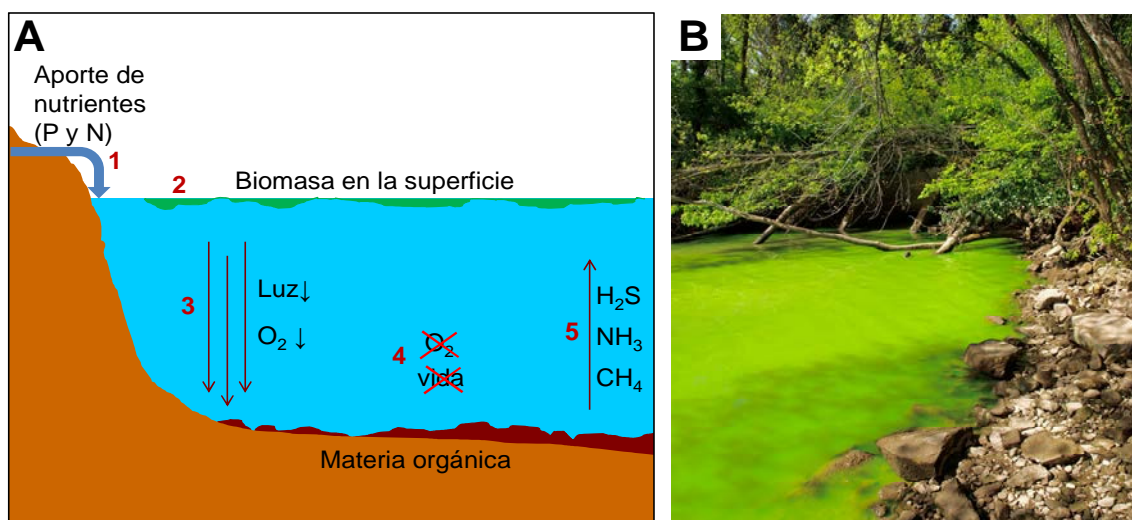


Figura 7.1. A) Esquema de las diferentes fases del proceso de eutrofización aguda: B) Imagen de un río con eutrofización (imagen cedida por Alexandr Trubetskoy).

materia orgánica en el medio, cuya oxidación mediante bacterias heterótrofas, provoca, debido a las condiciones anaeróbicas generadas, la disminución de la fauna (4). En el momento álgido del proceso, la descomposición de la materia orgánica, por bacterias anaeróbicas, da lugar a la aparición de distintos compuestos causantes de toxicidad y malas propiedades organolépticas del agua (5).

Entre los efectos indeseados causados por este proceso de degradación, destacan una drástica reducción de la diversidad de la fauna y flora acuáticas -causando la muerte de vegetales y peces-, la disminución de la transparencia del agua y de la zona fótica, la posibilidad de proliferación descontrolada de algas tóxicas, problemas de olor y sabor debido a los productos de la oxidación y fermentación de la materia orgánica, la interferencia en actividades recreacionales (natación, navegación de recreo, pesca, etc.) y el aumento en los costes de tratamiento del agua para sanearla o potabilizarla.^{3,5} Todos estos hechos causan una importante reducción de la calidad del agua, pudiéndose convertir en un riesgo para la salud humana. A pesar de haber existido fenómenos de eutrofización, de manera natural, a lo largo de los siglos, la eutrofización antropogénica debida al excesivo aporte de nutrientes, procedentes de actividades como la agricultura, la ganadería y la industria, y a las aguas residuales de las zonas residenciales, acelera el proceso de degradación del ecosistema y lo hace más agresivo. En general, niveles por encima de $0.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ son indicativos de una eutrofización severa.⁶

El fósforo se puede presentar en una gran variedad de formas en ecosistemas acuáticos, tanto disuelto como particulado (Figura 7.2), siendo la fracción de fósforo reactivo soluble (FRS), compuesta principalmente por ortofosfato (mezcla de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- al pH del agua), la que proporciona una estimación de la cantidad de fósforo más fácilmente biodisponible.¹

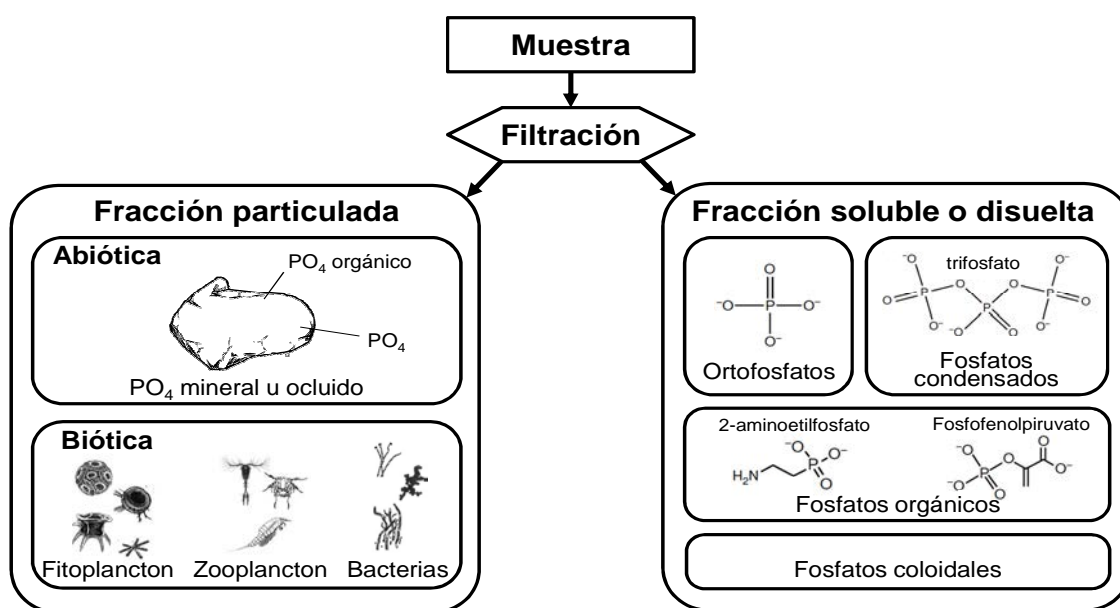


Figura 7.2. Diagrama con algunos ejemplos de las distintas formas en las que el fósforo se presenta en los ecosistemas acuáticos (modificado de Handbook of water analysis)¹.

Existen dos maneras de eliminar fósforo en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs): químicamente y biológicamente. En ambos casos, su eliminación se produce una vez que todas las especies de este se han convertido a ortofosfato mediante un proceso aeróbico inicial.⁷ El tratamiento químico consiste en añadir la cantidad estequiométrica necesaria de sales de hierro o aluminio (principalmente $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ o AlCl_3) para hacer precipitar el fósforo en forma de fosfato según la siguiente reacción:



Este precipitado es eliminado posteriormente junto al resto de lodos. Por su parte, el tratamiento biológico consiste en la eliminación del fósforo aprovechando la capacidad de la bacteria *Acinetobacter spp* de fijar fosfato en condiciones aerobias. Posteriormente, la bacteria es eliminada del agua con los lodos y puede ser reutilizada previo paso por un proceso de liberación de fosfato en condiciones anaeróbicas.⁷

Con el objetivo de minimizar el problema de la eutrofización y gestionar de manera más eficiente la dosificación de los reactivos químicos o biológicos necesarios para eliminar el fósforo, se requiere de la monitorización on-line del FRS durante los procesos de tratamiento de aguas en las EDARs, tanto urbanas como industriales, y en sus efluentes de salida. El propósito final es verificar que la concentración de fosfato presente en las aguas descargadas al medio natural no producirá eutrofización en las aguas receptoras. La concentración típica de fosfato en aguas residuales municipales se encuentra entre los 4 y los 25 mg L^{-1} P, mientras que la concentración legal de fosfato, en los efluentes de las EDARs, oscila entre los 0.1 mg L^{-1} P, en el caso de descarga en cuerpos acuáticos sensibles (como lagos o zonas estancadas) y los 2 mg L^{-1} P, en el caso de ríos u océano.^{6,8-10}

Para la determinación de ión fosfato, existen diferentes sistemas automatizados, basados en metodologías de flujo en continuo, que utilizan diferentes principios de detección, entre las que destacan la espectrofotometría UV-visible, la espectrometría atómica y las técnicas electroquímicas.^{1,11-15} Sin embargo, la determinación espectrofotométrica con azul de fosfomolibdeno (PMB) es considerado el método de referencia y, por ello, es el procedimiento analítico más utilizado.^{1,16} Este consiste en una primera reacción de complejación (Reacción 7.2) entre el ión fosfato y el molibdato, en medio ácido, para dar lugar al ácido 12-molibdofosfórico (12-MPA), que es reducido posteriormente (Reacción 7.3), mediante ácido ascórbico, al complejo coloreado de estructura desconocida PMB, que presenta una amplia banda de absorción entre los 550 y 1100 nm:¹⁶⁻¹⁹



Los sistemas automáticos basados en la reacción de PMB presentan diferentes ventajas, como son un tiempo de análisis corto, razonable consumo de reactivos y muestra y una buena reproducibilidad en las medidas. No obstante, la mayoría de estos sistemas tienen un tamaño y un peso considerables (no aptos para su uso en medidas a pie de campo), un rango de trabajo estrecho (hecho que limita su capacidad para determinar la amplia gama de concentraciones de fosfato que pueden encontrarse en las distintas etapas de una EDAR) y a menudo requieren personal de laboratorio especializado.^{18,20-23}

Con la finalidad de superar estas limitaciones, en este capítulo de la tesis se presenta un microsistema analítico autónomo y automatizado para la determinación espectrofotométrica del FRS, en forma de fosfato, en aguas residuales. El objetivo final consiste en disponer de un equipo que permita determinar, de la manera más eficiente, la dosis de reactivo químico o biológico necesario para eliminar el fósforo presente en el agua tratada, permitiendo así, el cumplimiento de la legislación en cuanto al contenido de fósforo presente en las aguas descargadas. El montaje experimental desarrollado incluirá un microanalizador fabricado en COC, un sistema de detección óptica portátil, un sistema de gestión de fluidos autónomo y automático, y un ordenador portátil. El microanalizador integrará la microfluídica y la celda de detección de flujo. El sistema de detección (§6.2), consistirá en un LED y en un fotodetector. El sistema de gestión de fluidos (§4.2.2 y §5.1.1) consistirá en microválvulas y microbombas programadas automáticamente para permitir procesos de autocalibración y funcionamiento en régimen autónomo. Estos elementos proporcionarán al sistema global las características necesarias para ser implementado en diferentes etapas de una EDAR o incluso en estaciones autónomas de análisis de calidad de agua en ríos o lagos. Para verificar su aplicabilidad se analizarán diferentes muestras reales procedentes de las distintas etapas de una EDAR urbana.

7.1. Materiales y reactivos

El microanalizador se construyó usando placas y láminas de COC suministradas por Topas Advanced Polymers (Florence, KY, EEUU) en diferentes grados y grosores: placas Topas 5013 de 500 μm y 1 mm de grosor y láminas Topas 8007 de 25 μm de grosor.

Todos los reactivos usados para la optimización y la caracterización del microsistema fueron de calidad analítica o superior. El nitrito de sodio (NaNO_2), el cloruro de amonio (NH_4Cl) y el carbonato de sodio (Na_2CO_3) se compraron a Panreac (Barcelona, España). El dihidrogenofosfato de sodio (NaH_2PO_4), el sulfato de sodio (Na_2SO_4), el cloruro de potasio (KCl) y el molibdato de amonio tetrahidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) se adquirieron en Fluka (Barcelona, España).

El cloruro de estaño (SnCl_2), el ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) y el ácido sulfúrico al 98 % (H_2SO_4) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). El nitrato de potasio (KNO_3) se compró en Merk (Alemania). El tartrato de antimonio y potasio ($\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) se adquirió en Acros Organics (Geel, Bélgica).

Todas las disoluciones fueron preparadas usando agua doblemente destilada o Milli-Q. Las disoluciones estándar de fosfato fueron preparadas mediante un proceso de dilución por multiconmutación, a partir de una disolución madre de 32 mg L^{-1} P de NaH_2PO_4 previamente desgasificada. Como disolución complejante se usó molibdato de amonio 5 mM en ácido sulfúrico 0.1 M y como disolución reductora, una de 60 mg L^{-1} de ácido ascórbico, aunque, también, se testaron disoluciones reductoras de cloruro de estaño y de ácido ascórbico con tartrato de antimonio y potasio, actuando como catalizador. Para el estudio de interferentes se prepararon disoluciones estándar de 3.2 mg L^{-1} P, fijando la del compuesto interferente en 200 y 500 mg L^{-1} Cl^- (NH_4Cl), 200 y 500 mg L^{-1} Cl^- (KCl), 50 y 100 mg L^{-1} NO_3^- (KNO_3), 300 y 600 mg L^{-1} CO_3^{2-} (Na_2CO_3), 250 y 500 mg L^{-1} SO_4^{2-} (Na_2SO_4), 0.1 y 10 mg L^{-1} NO_2^- (NaNO_2) y 30 y 100 mg L^{-1} SiO_3^{2-} (SiO_2).

7.2. Montaje experimental

El montaje experimental utilizado (Figura 7.3) está formado por tres partes principales: el microanalizador desarrollado, el sistema de gestión de fluidos automatizado y el sistema de detección miniaturizado. El sistema de gestión de fluidos se puede observar en el diagrama esquemático de la figura 7.3. Consistió en dos microbombas solenoides (Figura 7.3, BS1 y BS2) de 10 μL por pulso (P/N 120SP1210-5TP) (BiochemValve Inc., Montluçon Cedex, Francia), una microbomba peristáltica (Figura 7.3, BP) (Kamoer KP-S10DGC0, Shanghai, China) usando tubo de Tygon® de 0.19 mm de diámetro interno (Ismatec, Wertheim, Alemania) con un controlador de revoluciones hecho a medida (TMI, Barcelona, España) y tres microválvulas solenoides de tres vías (Figura 7.3, V_x) (161T031, NResearch, Suiza). Para conectar los distintos elementos fluídicos al microanalizador se usó tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno (Scharlab, S.L., Cambridge, Inglaterra). Para programar la actuación de las microválvulas y microbombas en el proceso de autocalibración mediante multiconmutación y para automatizar el proceso de medida sin requerir la intervención directa del usuario, se utilizó el controlador de dispositivos fluídicos Flowtest™ (Biotray, Francia), con su correspondiente software.

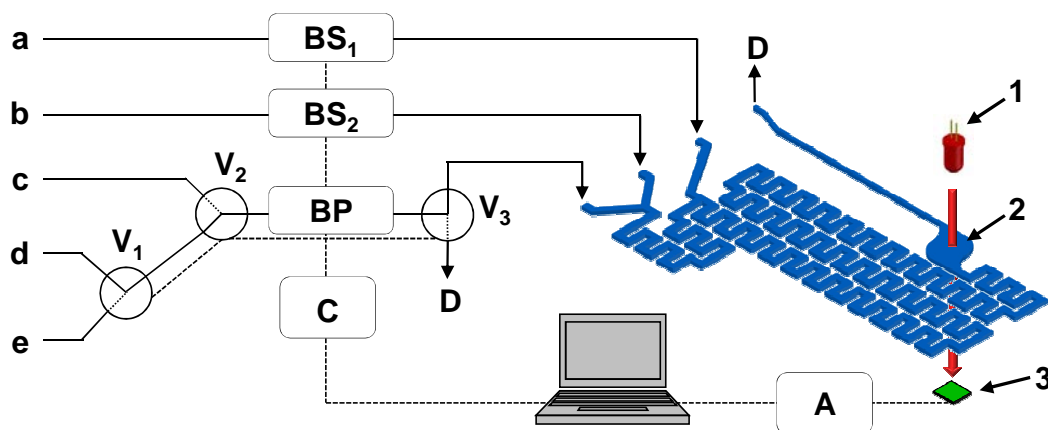


Figura 7.3. Diagrama esquemático de la microfluídica del microanalizador, el sistema de detección y el sistema de gestión de fluidos: (a) canal con la disolución reductora de 60 mM de ácido ascórbico; (b) disolución complejante de molibdato de amonio 5 mM con H_2SO_4 0.1 M; (c) muestra; (d) agua; (e) disolución madre; (D) desecho; (V_x) válvula solenoide de tres vías; (BP) microbomba peristáltica; (BS_x) microbomba solenoide; (C) Controlador de los diferentes elementos del sistema de flujo; (A) tarjeta de adquisición de datos; (1) LED a 660 nm; (2) cámara de detección; (3) fotodiodo. Las líneas sólidas son conexiones fluídicas y las líneas discontinuas son conexiones eléctricas.

Por su parte, el sistema de detección óptica (Figura 7.4) es idéntico al presentado en el capítulo anterior, desarrollado conjuntamente por el GSB y el GTF.^{24,25} A modo de recordatorio, este sistema consistía en un lector óptico compacto y robusto de plataformas microfluídicas, diseñado siguiendo el concepto de llave-cerradura. Estaba compuesto por una estructura de PMMA, que contenía una placa de circuito

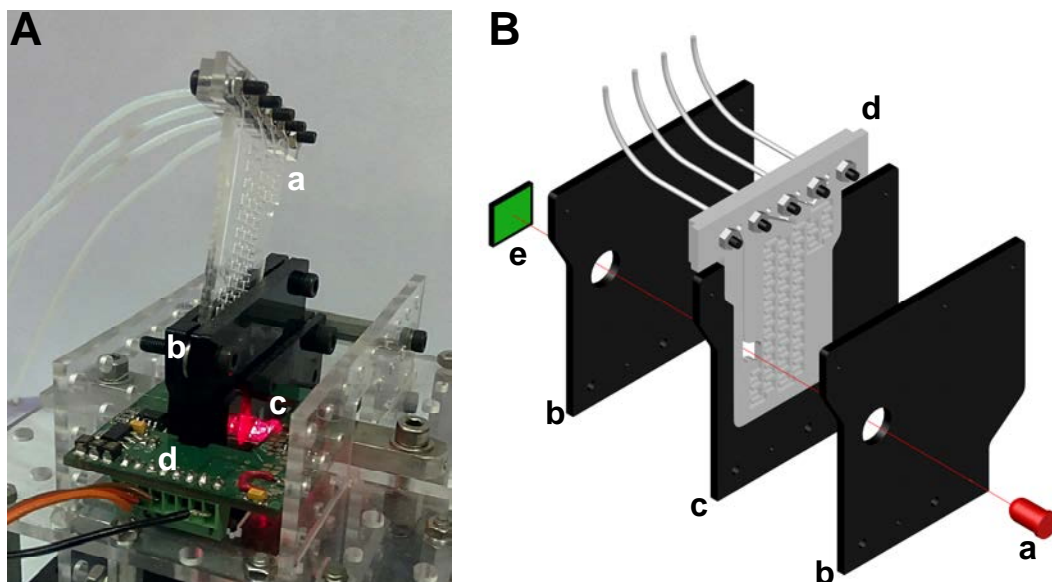


Figura 7.4. A) Imagen del microsistema fuera del alojamiento del sistema de detección: (a) microanalizador; (b) puerto de inserción con concepto de llave-cerradura; (c) LED a 660 nm; (d) PCB con la electrónica asociada al control y a la adquisición de la señal. B) Esquema del concepto llave-cerradura del sistema de detección: (a) LED a 660 nm; (b) máscara óptica con un agujero circular que solo deja pasar la luz a través de la celda de detección; (c) pieza actuando como "cerradura" del puerto de inserción; (d) microanalizador actuando como "llave"; (e) fotodiodo.

impreso (PCB) con los diferentes componentes electrónicos integrados para la detección óptica y un puerto de inserción con la forma complementaria del perímetro del microanalizador. De este modo se conseguía un alineamiento perfecto y reproducible entre la fuente de luz, la celda de flujo y el detector (Figura 7.4.B).

Por su parte, la estructura PCB integraba un LED como fuente de radiación, con un pico de emisión centrado a 660 nm (Kingbright, Taipei, Taiwán) (Figura 7.5.A), y un fotodiodo PIN Hamamatsu S1337-66BR, con 33 mm² de área efectiva, actuando como detector. La señal generada fue adquirida mediante una tarjeta de adquisición de datos (DAQ) NI USB-6211 de National Instruments (Austin, Texas, EEUU), que transfirió la señal de la PCB, vía USB, a un ordenador, donde fue procesada usando un amplificador lock-in digital con una frecuencia de adquisición de datos de 10 por segundo. El uso de la amplificación lock-in digital permitió, como ya se comentó anteriormente, incrementar la relación señal/ruido y trabajar en condiciones de luz ambiente, evitando así el efecto de luz parásita en las medidas, sin la necesidad de recurrir a amplificadores físicos.²⁶

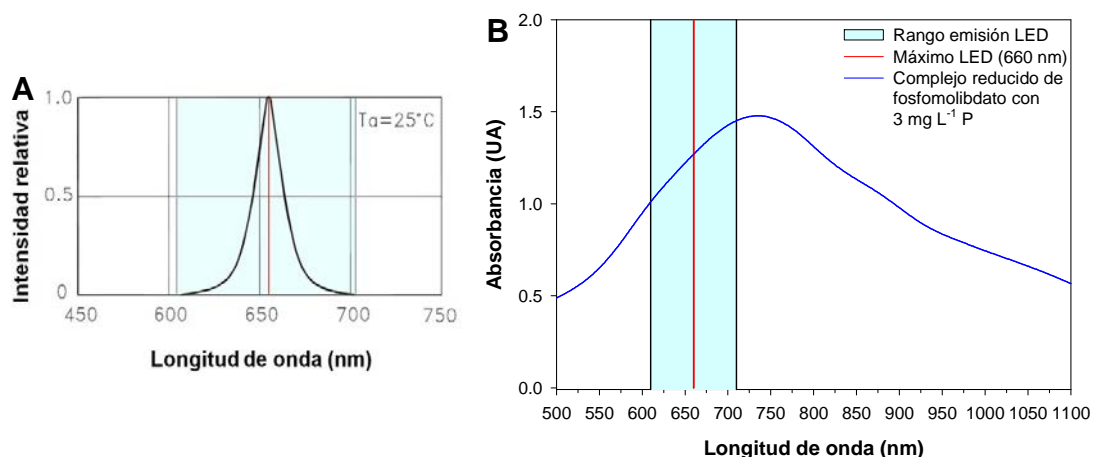


Figura 7.5. A) espectro de emisión del LED escogido. B) Absorbancia del complejo reducido de fosfomolibdato generado con 3 mg L⁻¹ de fósforo con el espectro de emisión del LED solapado.

Como se ha podido observar, para esta nueva aplicación, tan solo se tuvo que cambiar la pieza de encaje que actuaba como “cerradura” del puerto de inserción (Figura 7.4.B.c) y el LED, con respecto al sistema de detección usado en el capítulo anterior (Figura 6.2.C). Esto demuestra la gran versatilidad del sistema llave-cerradura desarrollado. En la figura 7.5.B se puede observar que, el máximo de absorbancia del complejo de PMB (731 nm) y el pico de emisión del LED (660 nm), no coinciden. No obstante, al presentar el complejo una banda de absorción tan amplia, la disminución en el valor de la absorbancia no resultó ser crítica. Además, este hecho facilitó la consecución de un rango de trabajo más amplio, al limitar la posibilidad de saturar la respuesta del fotodiodo.

7.3. Diseño y optimización de la plataforma microfluídica

La tecnología utilizada para fabricar el microanalizador fue la de polímeros, usando como sustrato COC. El diseño del microanalizador (Figura 7.6.A) estaba formado por tres capas estructurales, dos de ellas de 1 mm de grosor y una de 300 μm (todas ellas Topas 5013) y dos films sellantes de 25 μm (Topas 8007) previamente laminados sobre dos de las capas estructurales, de manera que una vez superpuestas y alineadas en la posición correcta, daban lugar a la estructura tridimensional requerida para la aplicación deseada. Las dimensiones del microanalizador fueron 30 x 50 x 2.5 mm, siendo más pequeño que una tarjeta de crédito. Su peso total fue de 3 g. La microfluídica en el interior del microanalizador presentaba 3 entradas y 1 salida de líquidos (Figura 7.3). A través de las dos primeras entradas, la disolución complejante (b) y la disolución portadora (d), donde se inyecta la muestra (c) o la disolución madre de fosfato (e), entran en el microsistema y convergen en un punto de confluencia en forma de Y, a partir del que se mezclan a lo largo de una pequeña sección de micromezclador en forma de serpentin. Esta mezcla da lugar a la formación del complejo 12-MPA a partir de la reacción, en medio ácido, entre el molibdato de amonio y todas las especies de fósforo inorgánico (H_3PO_4 hasta PO_4^{3-}) presentes en la disolución. Posteriormente, la disolución resultante se mezcla con la disolución reductora de ácido ascórbico (a), introducida a través de la tercera entrada, provocando la reducción del complejo 12-MPA a PMB, a lo largo de una sección más larga de micromezclador. Esto, da lugar a una creciente coloración azul cuya absorbancia, a 660 nm, es medida al llegar a la cámara de detección. Finalmente la mezcla es conducida al desecho a través de la única salida del microsistema. Las dimensiones de los microcanales fueron de 0.8 mm de ancho por 1 mm de alto antes de la cámara de detección y de 0.4 mm de

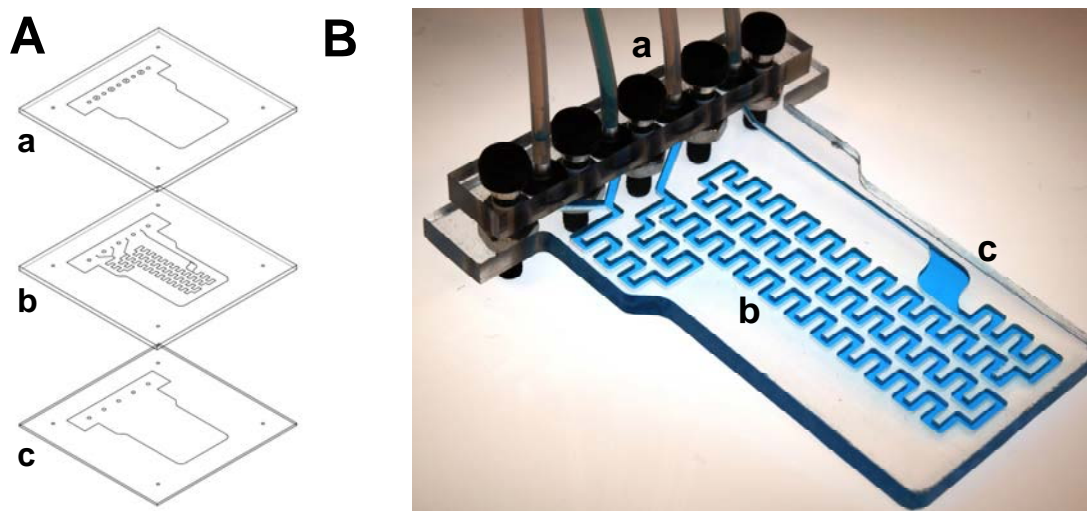


Figura 7.6. A) Diseño de las capas que componen el prototipo. B) Imagen del dispositivo final: (a) conexiones fluidicas; (b) microfluídica; (c) cámara de detección.

ancho por 1 mm de alto después de la cámara de detección. El diámetro de la cámara de detección fue de 4.5 mm y el camino óptico fue de 1 mm. El volumen muerto total del microsistema fue de 326 μL .

Finalmente, los conectores fluidicos fueron fijados sobre las entradas y salidas del microanalizador mediante un soporte y tornillos (Figura 7.6.B).

La configuración de la celda de detección óptica de flujo utilizada fue idéntica a la optimizada previamente (§6.3.2). En cuanto a la forma exterior del microanalizador, esta fue diseñada con la forma complementaria al puerto de inserción para ser acoplado en el sistema de detección.

A continuación, se procedió a optimizar tanto la configuración de los micromezcladores como las variables instrumentales, químicas e hidrodinámicas. El objetivo fue obtener un microanalizador robusto y de fácil uso, que pudiera trabajar de forma automática y autónoma, portátil, con un amplio rango de trabajo, buena selectividad, bajo consumo de reactivos y tiempo de vida elevado.

7.3.1. Optimización de los micromezcladores

A pesar de utilizar la configuración de la celda de flujo optimizada previamente, para evitar la acumulación de burbujas, el resto de las estructuras microfluidicas fueron diseñadas y optimizadas, tomando como referencia los estudios realizados previamente en el diseño de micromezcladores (§4.3.3.1). Se intentó minimizar el consumo de reactivos y potenciar la sensibilidad y selectividad del microanalizador. Así mismo, se intentó evitar la formación de precipitado azul del complejo PMB.

En primer lugar, el micromezclador donde se forma el complejo 12-MPA, a partir de la reacción entre el fosfato y el molibdato, fue diseñado con una longitud relativamente corta para minimizar el potencial efecto interferente del ión silicato. Este es el principal compuesto interferente, potencialmente presente, en el tipo de muestras a analizar.¹ La cinética de las reacciones favorece la formación de fosfomolibdato en lugar de silicomolibdato.^{1,27} Por este motivo, cuanto menor sea el tiempo de reacción previo a la reducción, menor será la interferencia positiva que pueda generar el silicato en el proceso de medida. Por el contrario, puesto que la reducción del 12-MPA a PMB tiene una cinética más lenta que la reacción anterior (Figura 7.7), la longitud del segundo micromezclador fue más grande que la del primero. La longitud final escogida fue un compromiso entre la sensibilidad (relacionada con tiempo de reacción) y la robustez del microsistema. Un incremento demasiado elevado de la longitud del micromezclador (elevado tiempo de reacción) conllevaría a una mayor formación del complejo coloreado de PMB, aumentando la señal, pero, a su vez, este producto acabaría precipitando y depositándose en las paredes del micromezclador o en la celda de detección. Este hecho provocaría una

deriva continua de la línea base. Así mismo, si la cantidad de precipitado fuera muy alta, aumentaría la turbidez y con ello el ruido de la señal, e incluso podría producirse la obturación de los microcanales. Para evitar estos problemas, los canales del micromezclador fueron diseñados con unas dimensiones mayores (0.8 mm de ancho por 1 mm de alto) a los usados previamente (0.4 mm de ancho por 0.3 mm de alto). Así mismo, el tiempo de residencia de la mezcla en el segundo micromezclador fue de 11 s. Aparentemente este tiempo de reacción quedaría lejos de los valores necesarios para obtener el máximo de absorbancia con el espectrofotómetro convencional (Figura 7.7). No obstante, se consiguió un rango lineal mayor, una sensibilidad adecuada para la aplicación estudiada y se evitaron los efectos indeseados asociados a la mencionada aparición de precipitado.

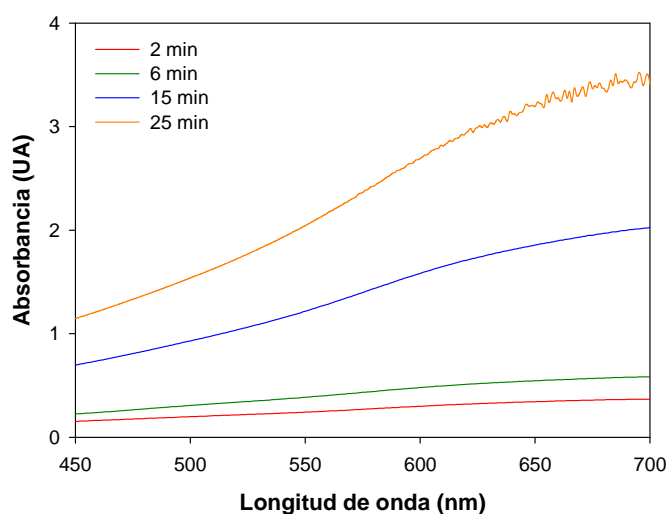


Figura 7.7. Absorbancia del complejo reducido de fosfomolibdato generado con 3.2 mg L^{-1} de fósforo a diferentes tiempos desde el inicio de la reacción de reducción con ácido ascórbico, medido con un espectrofotómetro comercial (Perkin Elmer Lambda 25) con un camino óptico de 1 cm.

7.3.2. Evaluación de variables instrumentales, químicas e hidrodinámicas

Se evaluó, siguiendo un proceso de optimización univariante, la influencia de las distintas variables y parámetros instrumentales, químicos e hidrodinámicos sobre la respuesta analítica del microanalizador. El objetivo fue alcanzar un compromiso entre la selectividad, la sensibilidad, la estabilidad de la línea base, el rango lineal de trabajo, el consumo de reactivos y muestra, la estabilidad de los reactivos, el tiempo de análisis y la formación de precipitado de PMB. Durante todo el proceso de optimización se utilizó un montaje experimental convencional de inyección manual, como el mostrado en la figura 6.1 del capítulo anterior, en lugar de uno automatizado y autónomo que es el que se implementó finalmente, una vez optimizados todos los parámetros.

En primer lugar, se testaron dos LED con longitudes de onda de emisión diferentes (660 y 700 nm, respectivamente), para verificar cual proporcionaba mejores

características analíticas, teniendo en cuenta que el complejo de PMB, presentaba una banda de absorción muy amplia entre 550 y 1100 nm.^{17,18} Para el estudio se utilizaron como condiciones iniciales arbitrarias una concentración de 5 mM de molibdato de amonio como disolución complejante, 60 mM de ácido ascórbico como disolución reductora (cada uno de estas dos disoluciones con 0.1 M de H₂SO₄), 225 μ L de volumen de inyección y 400 μ L min⁻¹ de caudal para cada canal.

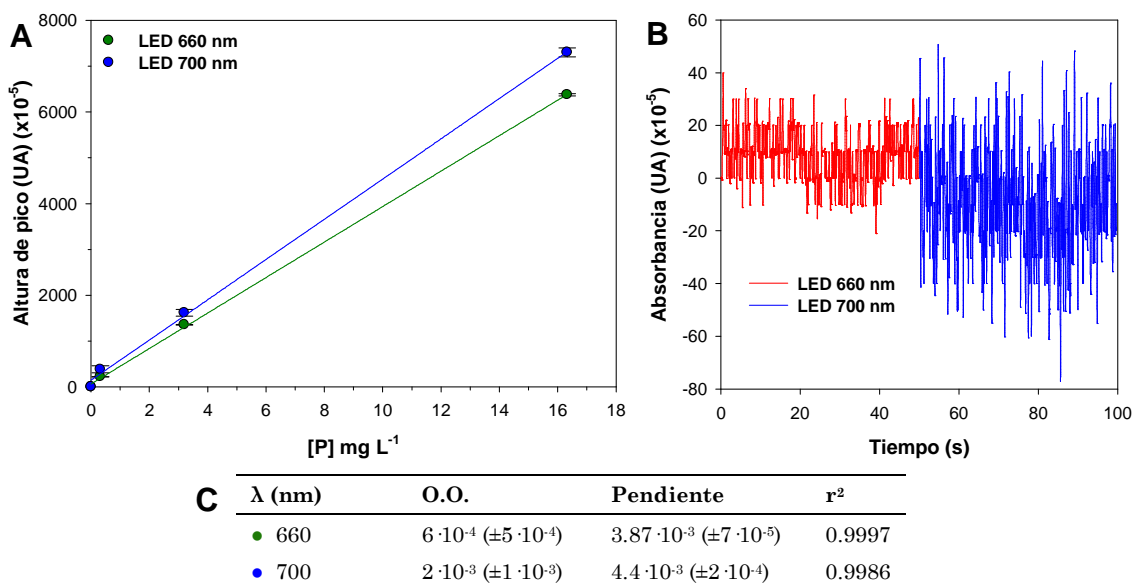


Figura 7.8. Optimización de la longitud de onda máxima de emisión del LED. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Registro de la señal con cada uno de los LED testados. **C)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Los resultados mostraron (Figura 7.8.A) que la sensibilidad aumentaba ligeramente a medida que la longitud de onda del emisor se acercaba al máximo de absorbancia del complejo coloreado (731 nm). Sin embargo, como se puede apreciar en la figura 7.8.B, el aumento de sensibilidad no compensó el aumento del ruido de la línea base, hecho que provocó que el LD fuese superior para el LED que proporcionaba una sensibilidad ligeramente mayor. A pesar de ajustar algunos parámetros instrumentales como la ganancia del detector, no se consiguió mejorar la relación señal/ruido para el LED de emisión a 700 nm. Por estos motivos se decidió escoger como óptimo el LED de 660 nm para proseguir con el proceso de optimización.

Para mejorar la sensibilidad del microsistema analítico se decidió estudiar la cinética de la reacción e intentar incrementar la velocidad de esta. Para ello se testaron distintos tipos de reductores y catalizadores. A partir de la información bibliográfica disponible,^{11,14,17,19,20,23,27-31} se probaron como disoluciones reductoras una de ácido ascórbico, otra de cloruro de estaño y una tercera combinando el ácido ascórbico con tartrato de antimonio y potasio, usándose este último como catalizador. Se establecieron, arbitrariamente, una concentración de 5 mM de

molibdato de amonio en ácido sulfúrico 0.1 M, un caudal de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$ por canal y un volumen de inyección de 250 μL . Las concentraciones de los compuestos reductores fueron relativamente bajas, usándose, ácido ascórbico 16 mM con 0.1 M de ácido sulfúrico, ácido ascórbico 16 mM + tartrato de antimonio y potasio 0.5 mM con 0.1 M de ácido sulfúrico y cloruro de estaño 15 mM.

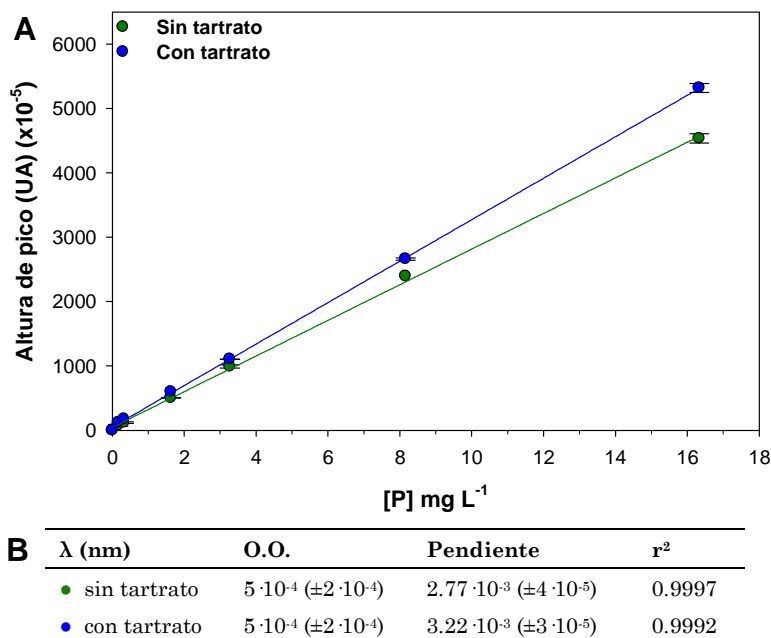


Figura 7.9. Optimización de la composición de la disolución reductora. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Tras los primeros ensayos, se desechó como agente reductor el cloruro de estaño debido a que, incluso con la disolución estándar de menor concentración de fosfato, aparecía una gran cantidad de precipitado azul en la plataforma microfluídica, cosa que impedía la correcta lectura de absorbancia. Cuando se utilizó ácido ascórbico con el catalizador de tartrato de antimonio y potasio, se experimentó un comportamiento similar, pero solamente a partir de disoluciones estándar de concentraciones altas por lo que se pudo obtener una curva de calibrado adecuada en todo el rango de trabajo deseado. Como se puede observar en los resultados obtenidos (Figura 7.9), la sensibilidad fue ligeramente mayor usando la disolución reductora con catalizador. No obstante, la disolución de ácido ascórbico con tartrato de antimonio y potasio se tornó azulada pasada 1 hora desde su preparación. Pasadas dos 2 horas, la coloración azul se hizo más intensa y a las 5 horas, el reactivo reductor estaba completamente azul. La inestabilidad del reactivo lo haría inviable para su uso en condiciones autónomas durante periodos de tiempo prolongados. Otra opción hubiera sido tener los dos reactivos separados (por un lado el ácido ascórbico y por otro el tartrato de antimonio y potasio), pero esto complicaría el montaje experimental sin aportar mejoras relevantes en términos de

sensibilidad. Finalmente, se decidió escoger como disolución reductora la formada únicamente por ácido ascórbico, en ácido sulfúrico.

El siguiente parámetro a evaluar fue la concentración de molibdato de amonio en la disolución complejante. Se prefijaron, arbitrariamente, una concentración de 60 mM de ácido ascórbico en ácido sulfúrico 0.1 M, como disolución reductora, un caudal de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$ para cada canal y un volumen de inyección de 250 μL . La concentración de molibdato de amonio se evaluó entre 2.5 y 15 mM, siempre en H_2SO_4 0.1 M. Los resultados mostraron (Figura 7.10) que a bajas concentraciones, la sensibilidad obtenida era menor. Sin embargo, a partir de 5 mM, un aumento en la concentración de molibdato de amonio no se traducían en un aumento significativo de la sensibilidad, aunque, a partir de 15 mM, si se observaba un incremento significativo en la aparición de precipitado azul de PMB. Por estos motivos se escogió como óptimo el valor de concentración de 5 mM de molibdato de amonio en H_2SO_4 0.1 M como disolución complejante.

A continuación se evaluó la concentración de ácido ascórbico en la disolución reductora. Se utilizó el parámetro optimizado de 5 mM de molibdato de amonio como disolución complejante y para el resto de parámetros se utilizaron los valores prefijados arbitrariamente. La concentración de ácido ascórbico se evaluó entre 5 y 120 mM, siempre en H_2SO_4 0.1 M. Los resultados obtenidos (Figura 7.11) mostraron que a concentraciones por debajo de 30 mM, las sensibilidades obtenidas eran menores. Sin embargo, a concentraciones mayores de 30 mM, el aumento de la concentración de reductor no suponía una mejora significativa en los valores de

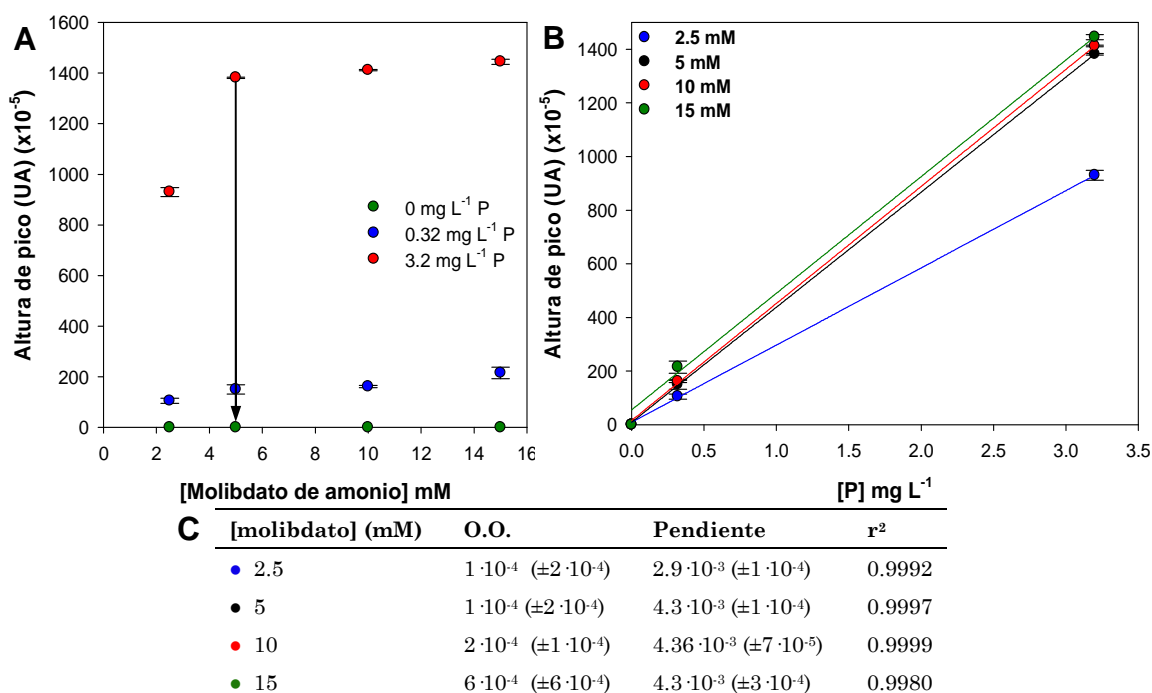


Figura 7.10. Optimización de la concentración de molibdato en la disolución complejante. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Curvas de calibración obtenidas para cada concentración testada. **C)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

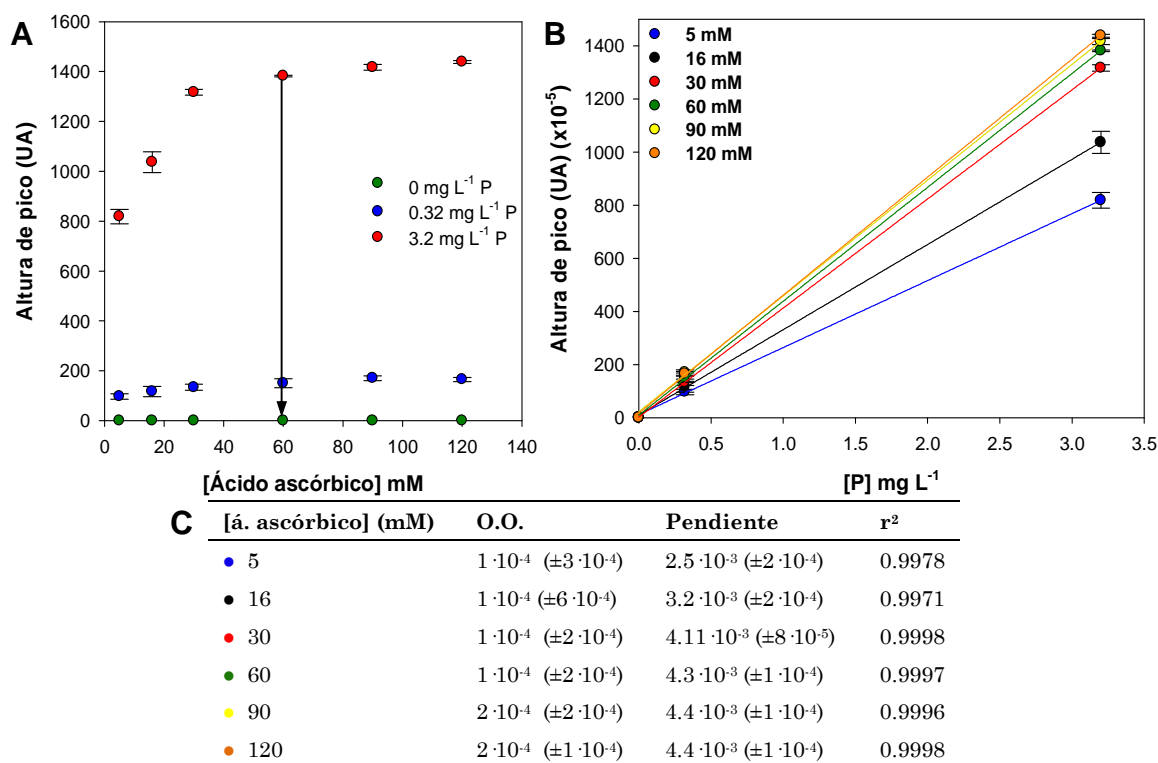


Figura 7.11. Optimización de la concentración de ácido ascórbico en la disolución reductora. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Curvas de calibración obtenidas para cada concentración testada. **C)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

sensibilidad obtenidos. Además, por encima de 90 mM aumentaba la precipitación de PMB y con ello la inestabilidad de la señal. Teniendo en cuenta la naturaleza inestable de las disoluciones de ácido ascórbico, que tienden a degradarse a temperaturas elevadas, a valores de pH extremos y por la exposición a la luz solar,³² se decidió escoger una concentración de ácido ascórbico de 60 mM en lugar de la de 30 mM. Aunque ambas proporcionan los mismos resultados, la de mayor concentración permitiría incrementar el tiempo de vida de la disolución de reactivo, ya que una degradación del 50 % del ácido ascórbico no provocaría una disminución significativa de la señal (Figura 7.11.A).

El siguiente parámetro a evaluar fue la influencia de la concentración de ácido sulfúrico, de las disoluciones complejante y reductora, en la señal obtenida. Se utilizaron los parámetros optimizados de 5 mM de molibdato de amonio como disolución complejante y 60 mM de ácido ascórbico como disolución reductora y para el resto de parámetros se utilizaron los valores prefijados anteriormente. La concentración de ácido sulfúrico se varió entre 0 y 0.5 M, siempre formando parte tanto de la disolución complejante como de la reductora. Los resultados obtenidos (Figura 7.12) mostraron un comportamiento extraño en la respuesta analítica del sistema en función de la concentración de protones. Intuitivamente, según la reacción 7.2, a menor pH, mayor formación del complejo y por tanto mayor altura de pico. Sin embargo, este no fue el comportamiento observado. Atendiendo a la

ecuación de la cinética global (Ecuación 7.1), esta mostró que la velocidad de la reacción de formación del PMB era directamente proporcional a la concentración de fosfato y molibdato e inversamente proporcional a la concentración de protones:³³

$$\frac{\delta[PMB]}{\delta t} = k \frac{[PO_4^{3-}][Mo^{6+}]^5}{[H^+]^9} \quad \text{(Ecuación 7.1)}$$

Por este motivo, en la Figura 7.12.A se puede observar que a medida que la concentración de ácido disminuía, las alturas de pico para una concentración de fosfato dada aumentaban, aumentando la sensibilidad, hasta llegar a un máximo correspondiente a un valor de concentración de protones de 0.05 M. A partir de este valor, concentraciones inferiores de ácido hacían disminuir las alturas de pico para una concentración de fosfato dada, debido probablemente a que no había suficiente medio ácido para que se diera la reacción de generación del complejo PMB por completo. Adicionalmente, a pH inferiores a 0.7 (concentraciones de ácido superiores a 0.2 M), el molibdato se reduce a un complejo de color azul directamente, antes de reaccionar con fosfato,¹ provocando una subida de la línea base y, por consiguiente, una drástica disminución de las alturas de pico. Por estos motivos se escogió como óptimo el valor de concentración de 0.05 M de ácido sulfúrico, tanto en la disolución complejante como en la reductora.

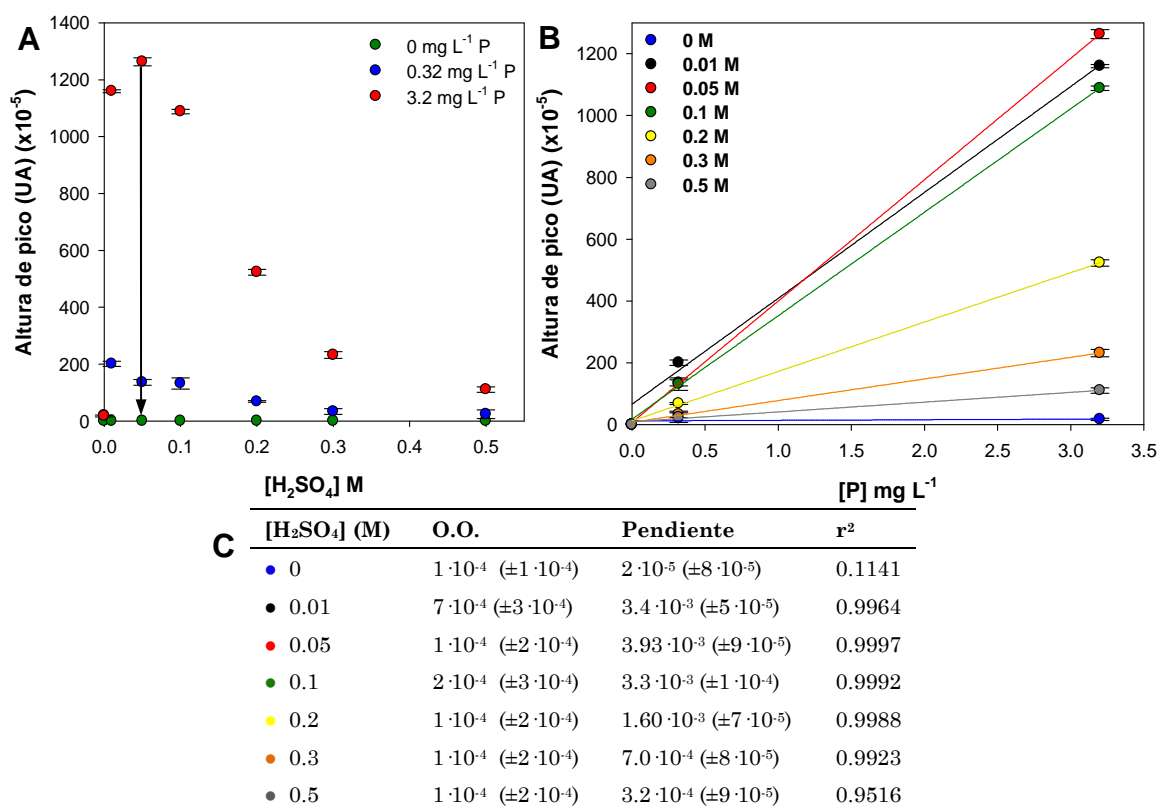


Figura 7.12. Optimización de la concentración de ácido sulfúrico en la disolución complejante. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Curvas de calibración obtenidas para cada concentración testada. **C)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Como se ha comentado anteriormente, el ácido ascórbico es un reactivo relativamente inestable. Según la bibliografía, cuanto más neutro es el pH de la disolución, menor degradación experimenta con el tiempo.³⁴ Por este motivo, se decidió eliminar el ácido sulfúrico de la disolución reductora de ácido ascórbico y trasladar todo el aporte de protones para la reacción al reactivo complejante de molibdato. Para verificar que este hecho no modificaba las características analíticas del sistema, se compararon las curvas de calibrado obtenidas usando disoluciones complejante y reductora con 0.05 M de H₂SO₄ cada una o usando una disolución complejante de molibdato con 0.1 M de H₂SO₄ y una disolución reductora de ácido ascórbico sin H₂SO₄.

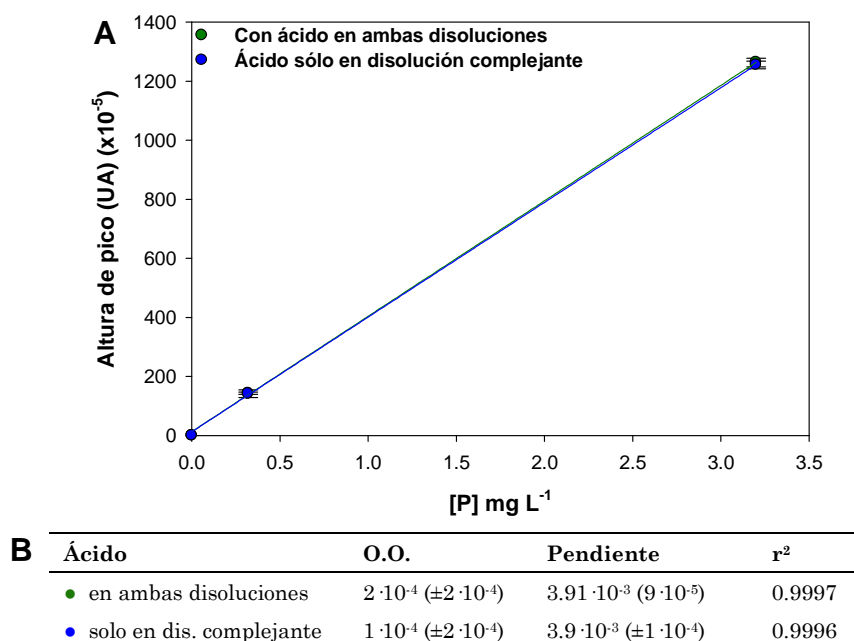


Figura 7.13. Optimización de la procedencia del aporte de H⁺ a la reacción. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Los resultados obtenidos (Figura 7.13) no mostraron diferencias significativas por lo que se decidió que la disolución complejante fuera la que aportara todos los H⁺.

En cuanto a la evaluación del caudal de cada uno de los canales (disolución portadora, complejante y reductora), se testaron valores entre 100 y 500 μL min⁻¹ usando los parámetros ya optimizados y un volumen de inyección de 250 μL.

Los resultados obtenidos (Figura 7.14) mostraron que cuanto menor era el caudal, mayor era la altura de pico para una concentración dada de fosfato y, por tanto, mayor era la sensibilidad, pero mayor era, también, el tiempo de análisis. Además, se observó que con los caudales más lentos (100 y 200 μL min⁻¹) aparecía precipitado azul de PMB tanto a lo largo de la plataforma microfluídica como, sobre todo, a la salida a desecho. Por este motivo, de entre los tres valores de caudal elegibles, se decidió escoger el de 400 μL min⁻¹ como óptimo a modo de compromiso entre la sensibilidad del microanalizador y el tiempo de análisis.

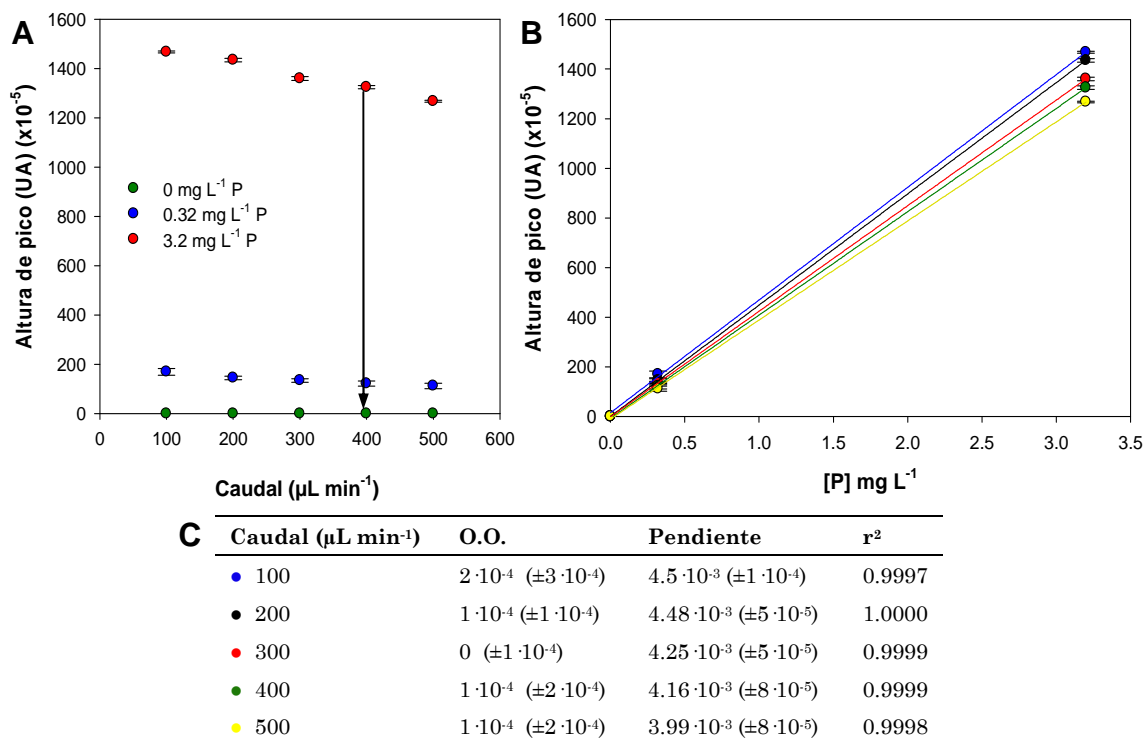


Figura 7.14. Optimización del caudal. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Curvas de calibración obtenidas para cada concentración testada. **C)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

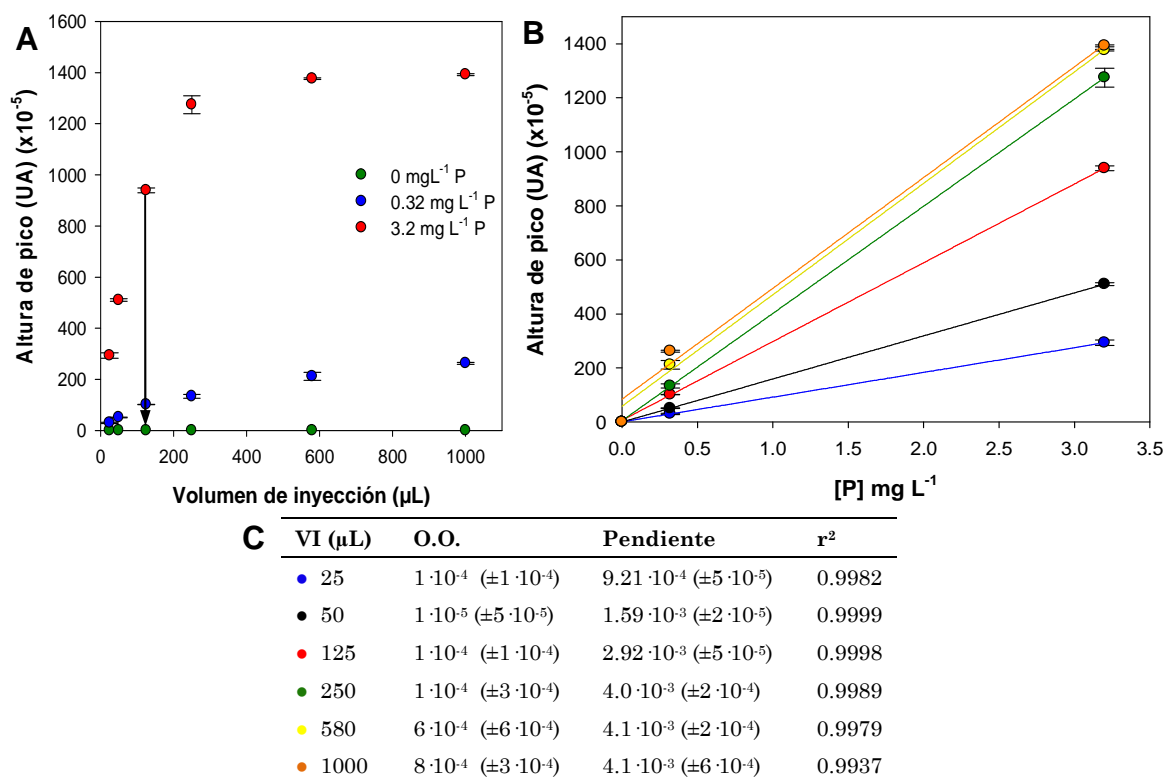


Figura 7.15. Optimización del volumen de inyección. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico. **B)** Curvas de calibración obtenidas para cada concentración testada. **C)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

Por lo que respecta a la evaluación del volumen de inyección, se testaron valores entre los 25 y los 1000 μL . Los resultados obtenidos (Figura 7.15) mostraron que por debajo de los 225 μL , una ligera disminución del volumen de inyección provocaba una gran disminución de las alturas de pico y, por tanto, de la sensibilidad. Sin embargo, valores de volumen de inyección por encima de 225 μL , no comportaban un incremento significativo de las alturas de pico ni de la sensibilidad. Según este razonamiento el valor óptimo a escoger, para dotar de robustez al proceso de medida, debía ser 225 μL . Sin embargo, una vez optimizados todos los parámetros, se realizó un calibrado intentando abarcar todo el rango de trabajo necesario (0 a 32 mg L^{-1} P) y se observó que la linealidad se perdía a partir de 15 mg L^{-1} P (Figura 7.16). Para evitar este problema se decidió escoger un volumen de inyección de 125 μL , el cual proporcionó una sensibilidad ligeramente menor pero, permitió alcanzar el rango lineal deseado.

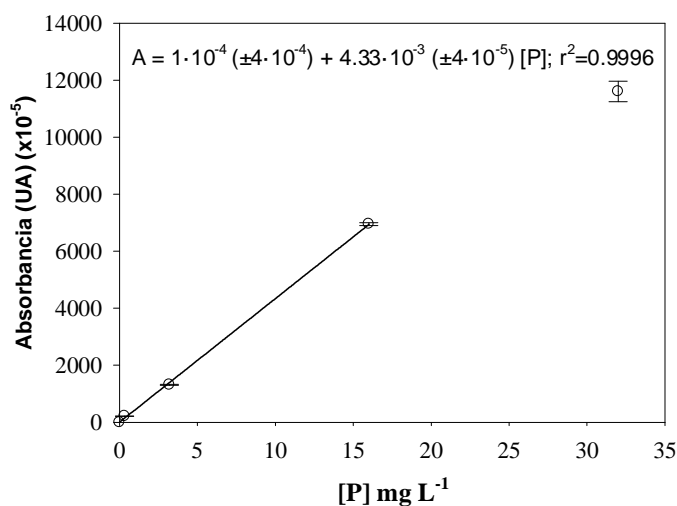


Figura 7.16. Curva de calibrado por triplicado ($n = 3$, 95 % confianza) empleando los valores optimizados de cada parámetro evaluado.

Finalmente, se evaluaron los posibles compuestos interferentes que podía presentar la reacción seleccionada. Estos eran principalmente el arseniato, el germanato y el silicato, ya que son capaces de formar complejos de molibdeno con similar longitud de onda de absorción que el compuesto azul de fosfomolibdeno.¹ Sin embargo, solo el silicato se encuentra de manera significativa en muestras de agua residual. También, en menor medida pueden ser compuestos interferentes los iones cloruro, nitrato, nitrito y algunos metales como el cobre (II) y el hierro (III).^{1,17} Sin embargo, estos metales no se esperan en el tipo de muestra a analizar. Para evaluar el efecto interferente de cada especie, se realizaron medidas sucesivas de disoluciones estándar de 3.2 mg L^{-1} de P con diferentes concentraciones de las diferentes especies y se compararon los valores obtenidos con el valor de altura de pico correspondiente a la disolución estándar de fosfato únicamente. De esta manera, se pudo obtener el porcentaje de interferencia y si esta era positiva o

negativa. Se prepararon disoluciones de cada compuesto a dos niveles de concentración: una baja, correspondiente a valores por debajo del límite marcado o recomendado por la legislación en aguas de consumo y una alta, correspondiente a valores muy por encima de los límites legales o recomendados.³⁵ Las concentraciones de interferentes testadas fueron de 200 y 500 mg L⁻¹ Cl⁻ (1) (KCl), de 200 y 500 mg L⁻¹ Cl⁻ (2) (NH₄Cl), 50 y 100 mg L⁻¹ NO₃⁻ (KNO₃), de 300 y 600 mg L⁻¹ de CO₃²⁻ (Na₂CO₃), de 250 y 500 mg L⁻¹ de SO₄²⁻ (Na₂SO₄), de 0.1 y 10 mg L⁻¹ NO₂⁻ (NaNO₂) y de 30 y 100 mg L⁻¹ SiO₃²⁻ (SiO₂).

De los resultados obtenidos (Figura 7.17) se pudo concluir que tan solo el ión silicato es interferente para el microanalizador desarrollado, a las concentraciones esperadas en las muestras a analizar. Gracias al diseño del micromezclador se consiguió minimizar su efecto interferente ya que, para una relación 1:10 (P:Si) a un nivel de concentración de 3.2 mg L⁻¹ P en forma de fosfato, la sobreestimación fue de un 11 %. Según la literatura,³⁶ alrededor del 70 % de las muestras de agua que son analizadas presentan una cantidad inferior a 10 mg L⁻¹ Si, por lo que, en este escenario, sería posible disminuir el efecto interferente a tan solo un 6 % de sobreestimación. De todos modos, si las muestras a analizar presentaran valores significativamente altos de silicato, se podría recurrir a la adición de agentes enmascarantes como ácido oxálico o tartárico, que eliminarían completamente su efecto interferente, como ha sido demostrado previamente en numerosos trabajos.^{1,11,16,17,37}

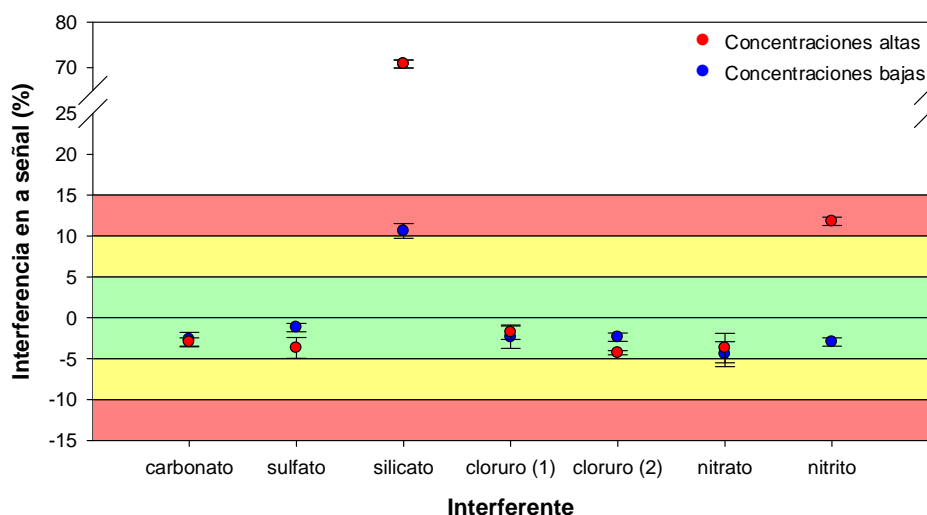


Figura 7.17. Estudio del efecto de los potenciales compuestos interferentes. Concentraciones bajas corresponden a valores por debajo del límite marcado o recomendado por la legislación en aguas de consumo mientras que concentraciones altas son valores muy por encima de los límites legales o recomendados.³⁵

7.4. Sistema de flujo automatizado

La automatización y la miniaturización de todo el sistema analítico, no solo del microanalizador, le confiere una gran autonomía y versatilidad para poder ser utilizado, en condiciones desatendidas, monitorizando la concentración de fósforo como FRS en diferentes etapas de una EDAR o, incluso, en cuerpos de agua amenazados. De esta manera, es posible reducir drásticamente los costes en términos de consumo de reactivos, equipamiento y personal especializado. Para conseguir dicho propósito se implementó el sistema de gestión de fluidos controlado por ordenador utilizado en anteriores capítulos (§4.2.4 y §5.1.3). A modo de recordatorio, este montaje experimental consistió en un híbrido entre sistemas de multiconmutación y multibomba que combinaba microválvulas y microbombas solenoides y una microbomba peristáltica, gestionados mediante un controlador de dispositivos fluidicos (Flowtest™). Este sistema de flujo, también permitía la modulación/modificación de los parámetros hidrodinámicos mediante programación, para adaptar las características analíticas (rango lineal de trabajo, límite de detección, sensibilidad, etc.) a condiciones especiales o excepcionales no previstas inicialmente, como una gran variación en la concentración esperada de fósforo. Utilizando una microválvula solenoide y una microbomba peristáltica, se realizó un proceso automatizado de calibración, preparando las diferentes disoluciones estándar por dilución por multiconmutación a partir de una única disolución madre concentrada. Parámetros técnicos como el tiempo de inyección (relacionado con el volumen de inyección en este tipo de sistemas), el tiempo mínimo de actuación de la microválvula y el sistema de impulsión utilizado, determinan la precisión de este proceso de dilución. De esta manera, recordando que el tiempo mínimo de actuación de la microválvula estaba establecido en 100 ms³⁸ y que el caudal optimizado era de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$, se escogió un tiempo de inyección de 20 s, correspondiente a un volumen de inyección de 133 μL (aproximado al de 125 μL optimizado). Con esta configuración se pudieron alcanzar factores de dilución de 200 veces la concentración de la disolución madre original.

La tabla 7.1 muestra las diferentes disoluciones estándar preparadas automáticamente y como se obtuvieron a partir de la disolución madre de 32 mg L⁻¹ P, escogida como LSRL. A modo de ejemplo, cuando se introduce una disolución estándar de 32 mg L⁻¹ P en el microanalizador, durante los 20 s del tiempo de inyección se introduce la disolución madre sin dilución alguna. Por el contrario, si se quiere medir una disolución estándar de 0.32 mg L⁻¹ P, durante los 20 s del tiempo de inyección, se llevan a cabo 2 ciclos en los que se introduce durante 0.1 s (posición “on” de la microválvula) la disolución madre y durante los 9.9 s restantes (posición “off” de la microválvula) se introduce agua.

Tabla 7.1. Secuencias de dilución por multiconmutación para generar las distintas disoluciones estándar necesarias para el proceso de autocalibración.

| Disolución estándar (mg L ⁻¹) | Tiempo de inyección total (s) | Tiempo en “on” (madre) (s) | Tiempo en “off”(H ₂ O) (s) | Nº Ciclos | Factor dilución |
|---|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------------|
| 32 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 20 | 0.1 | 0.1 | 200 | 2 |
| 8 | 20 | 0.1 | 0.3 | 40 | 4 |
| 3.2 | 20 | 0.1 | 0.9 | 20 | 10 |
| 1.6 | 20 | 0.1 | 1.9 | 10 | 20 |
| 0.8 | 20 | 0.1 | 3.9 | 5 | 40 |
| 0.32 | 20 | 0.1 | 9.9 | 2 | 100 |
| 0.16 | 20 | 0.1 | 19.9 | 1 | 200 |

7.5. Características analíticas del sistema

La caracterización analítica del microanalizador de FRS en forma de fosfato, en muestras de aguas residuales, se llevó a cabo mediante calibrados sucesivos realizados por dilución por multiconmutación, utilizando el programa de dilución automático, a partir de una disolución madre de 32 mg L⁻¹ P. La figura 7.18 muestra el registro de la señal y la curva de calibración para uno de los calibrados. La ecuación obtenida ($n = 9$; 95 % confianza) fue $A = 4 \cdot 10^{-4} (\pm 2 \cdot 10^{-4}) + 3.18 \cdot 10^{-3} (\pm 2 \cdot 10^{-5}) [P]$ con $r^2 = 0.9996$. El LD, calculado como tres veces la desviación estándar del blanco, fue 0.03 mg L⁻¹ P, mientras que el rango lineal de trabajo conseguido, calculando el LIRL como 10 veces la desviación estándar del blanco, fue de 0.09 a 32 mg L⁻¹ P.

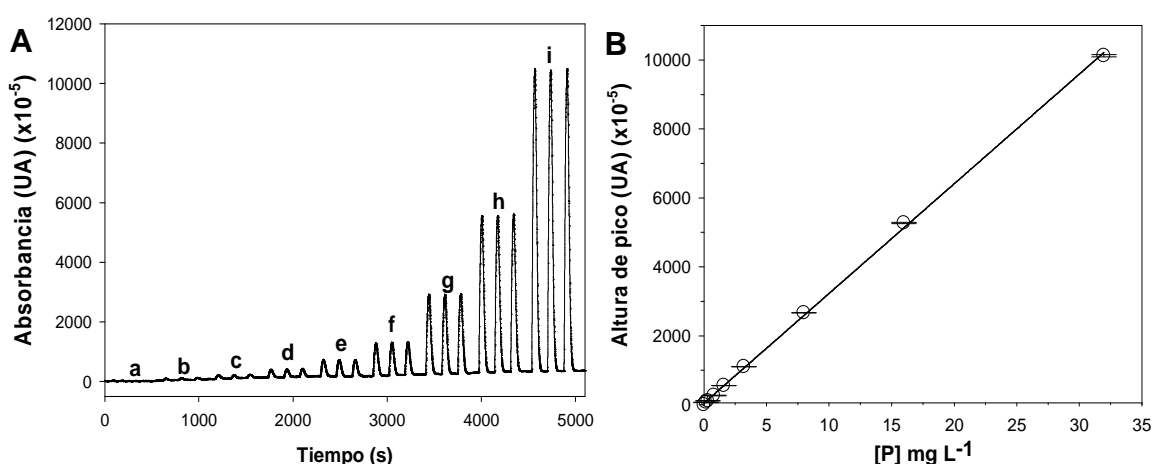


Figura 7.18. Registro de la señal (A) y curva de calibrado (B) correspondiente a un calibrado del microanalizador usando el programa de autocalibración partiendo de una disolución madre de NaH₂PO₄ de 32 mg L⁻¹ P. Las disoluciones estándar usadas fueron 0 mg L⁻¹ (a), 0.16 mg L⁻¹ (b), 0.32 mg L⁻¹ (c), 0.8 mg L⁻¹ (d), 1.6 mg L⁻¹ (e), 3.2 mg L⁻¹ (f), 8 mg L⁻¹ (g), 16 mg L⁻¹ (h) y 32 mg L⁻¹ (i).

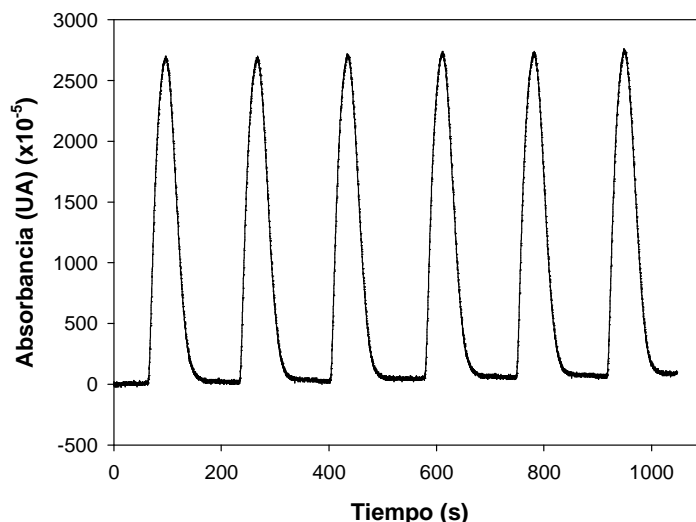


Figura 7.19. Gráfico mostrando el registro de 6 inyecciones de un patrón de $3.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ con el fin de calcular la repetitividad del microsistema.

La repetitividad del microanalizador fue testada mediante la inyección sucesiva de una disolución estándar de $3.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ (Figura 7.19). Los valores de CV obtenidos de las señales ($n = 6$; 95 % confianza) fueron inferiores al 1 %.

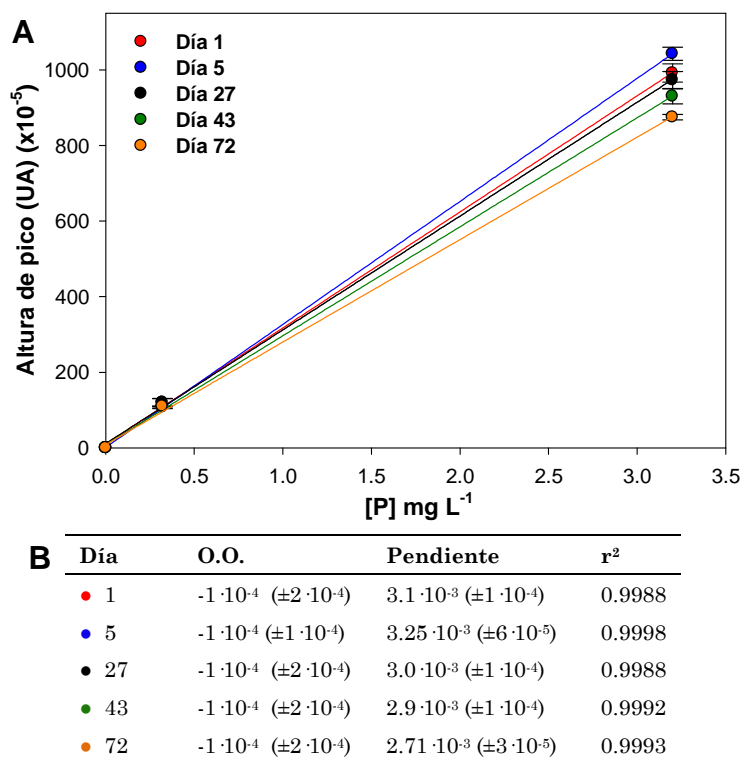


Figura 7.20. Estudio realizado a lo largo de tres meses usando los mismos reactivos y disoluciones estándar para evaluar la reproducibilidad del microsistema propuesto y la estabilidad de los reactivos. **A)** Representación gráfica de los valores de altura de pico para obtener la curva de calibración. **B)** Tabla con los parámetros de cada curva de calibración.

En cuanto a la reproducibilidad de los resultados, esta fue testada mediante diferentes calibrados llevados a cabo a lo largo de 3 meses, usando los mismos

reactivos y disolución madre (Figura 7.20). El valor promedio de pendiente obtenido fue de $2.99 \cdot 10^{-3}$ ($n = 5$) con un valor de CV inferior al 6 %, demostrando de esta manera no solo la buena reproducibilidad del sistema en días diferentes, sino también la buena estabilidad y notable durabilidad de los reactivos utilizados (3 meses de duración). Esto se traduce en una elevada autonomía del sistema analítico. Con las condiciones optimizadas, se consiguió una frecuencia de muestreo de 24 muestras a la hora.

Todos los resultados obtenidos mostraron la elevada confiabilidad y robustez que posee el sistema analítico global y su potencialidad para ser utilizado en el análisis de fósforo reactivo disuelto tanto en muestras de agua residual en EDARs como en muestras de agua natural de ríos o lagos.

7.6. Análisis de muestras reales

Se analizaron diferentes muestras de agua residual, procedentes de distintas etapas de una EDAR urbana situada en Guardamar del Segura (Alicante, España), usando el microanalizador desarrollado para determinar su contenido en FRS. El interés por determinar esta fracción de fósforo en la EDAR radica en que es un indicador para gestionar y optimizar la cantidad de reactivos necesarios en las etapas de eliminación del fósforo y, al ser la fracción más fácilmente biodisponible, constituye un claro indicador de la posibilidad de que se produzca el fenómeno de eutrofización en los cuerpos de agua receptores. Existen distintas fracciones de fósforo que se pueden analizar con el microanalizador, en función del pretratamiento que se le practica a la muestra (Figura 7.21). La fracción de fósforo reactivo soluble (FRS) comprende todas las especies de fósforo inorgánico en disolución después de someter la muestra a un proceso de filtración con un filtro de

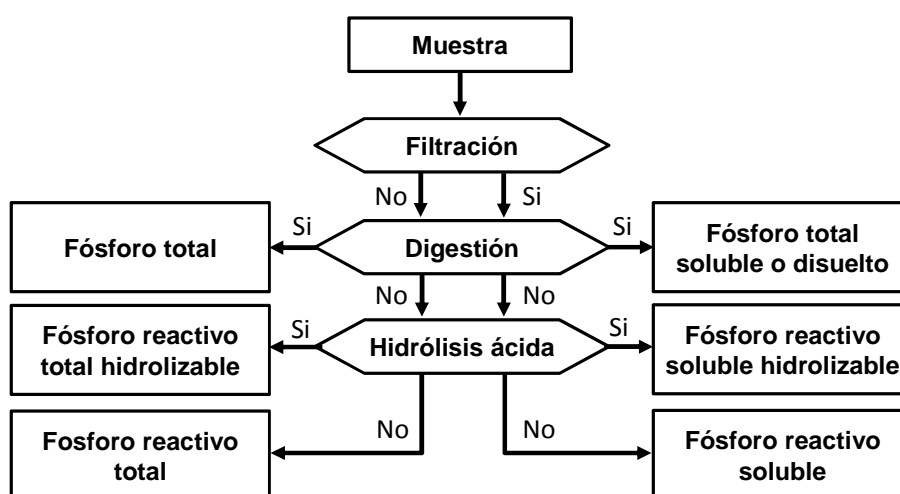


Figura 7.21. Diagrama con las distintas fracciones de fósforo que se pueden analizar en función del pretratamiento que se le practica a la muestra (modificado de Handbook of water analysis)¹.

0.45 μm de tamaño de poro. Así, se elimina el fósforo reactivo particulado (FRP). FRS y FRP conforman la fracción de fósforo reactivo total (FRT).^{1,39}

Es importante asegurar que la muestra a analizar no contiene FRP, con la finalidad de no generar alteraciones en los resultados obtenidos. En este trabajo, con el objetivo de simplificar el proceso de análisis, la etapa de filtración fue suprimida, asumiendo que un proceso de decantación del fósforo particulado durante 5 minutos, permitía una medida confiable del FRS, libre de otras fracciones de fósforo. Puesto que, como prácticamente todos los puntos potenciales de muestreo en una EDAR están ubicados o relacionados con depósitos o zonas en donde se puede llevar a cabo un proceso de decantación, este hecho no debería ser un problema para implementar el microanalizador en el análisis de rutina en EDARs.

Sin embargo, si se requiriera analizar otros tipos de fracciones de fósforo, se podrían introducir en el proceso de análisis, de una manera relativamente sencilla, diferentes etapas de hidrólisis ácida o digestión.^{1,11} Para verificar la hipótesis de que una decantación de 5 minutos antes de proceder al análisis de las muestras reales podía eliminar la mayor parte de la fracción particulada de fósforo, se realizó una prueba analizando una muestra decantada durante 5 minutos sin filtrar y otra filtrada con un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro. Los resultados obtenidos fueron similares, presentando una concentración de $5.7 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ ($n = 3$, 95 % confianza), la muestra filtrada y de $5.9 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ ($n = 3$, 95 % confianza), la muestra decantada. Esto confirmó que el proceso de decantación era suficiente para determinar solamente la fracción de FRS en ese tipo de aguas, a expensas de realizar un estudio con un conjunto superior de muestras.

Los resultados obtenidos del análisis de las diferentes muestras utilizando el microanalizador desarrollado fueron validados por comparación con los resultados obtenidos mediante ICP-OES, realizados en el Servei d'Anàlisi Química (SAQ) de la Universitat Autònoma de Barcelona. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Valores de concentración promedio en $\text{mg L}^{-1} \text{ P}$ ($n=3$, 95%) del análisis de fosfato en muestras de agua residual usando el microsistema propuesto.

| Muestra | Microsistema | ICP-OES | % error |
|---------|----------------|---------|---------|
| 1 | 15.2 ± 0.2 | 18.9 | 20 |
| 2 | 0.6 ± 0.2 | <0.5 | 20 |
| 3 | 23 ± 2 | 25.4 | 9 |
| 4 | 3.8 ± 0.3 | 4.04 | 6 |
| 5 | 19 ± 1 | 19.3 | 2 |
| 6 | 5.1 ± 0.5 | 4.95 | 3 |
| 7 | 32 ± 2 | 31.1 | 3 |

Como se puede observar, los resultados proporcionados por el microsistema analítico desarrollado no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con el método de contraste, según la prueba de t de Student apareada ($t_{\text{calc}} = 1.265$; $t_{\text{tab}} = 2.447$; $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$). Este hecho confirmó que el microanalizador propuesto es útil para la determinación de FRS en un amplio rango de concentraciones, permitiendo su monitorización a lo largo de las diferentes etapas del proceso de tratamiento de aguas residuales, donde esta puede variar considerablemente de una etapa a otra.

7.7. Conclusiones

En este capítulo se ha diseñado, desarrollado, caracterizado y aplicado al análisis de muestras reales un microanalizador para la determinación espectrofotométrica de fósforo reactivo soluble, en forma de ión fosfato, en aguas residuales. El microsistema analítico ha sido optimizado para maximizar su autonomía operacional y su robustez, exhibiendo unas buenas características analíticas. El microanalizador miniaturizado proporciona una respuesta rápida y precisa con un consumo de reactivos bajo y con un mayor rango de trabajo que el de los sistemas analíticos publicados hasta la fecha. Además, la integración del sistema de gestión de fluidos, basado en microválvulas y microbombas, incrementó el nivel de automatización y miniaturización de todo el sistema analítico, haciéndolo indicado para su funcionamiento autónomo en múltiples procesos.

Asimismo, el uso de un lector óptico compuesto por un LED y un fotodiodo como sistema de detección miniaturizado, donde el microanalizador puede ser insertado basándose en un concepto de llave-cerradura, también contribuyó a alcanzar dichas características.

De esta manera, las características analíticas del microanalizador cumplieron con los requisitos establecidos, pudiendo utilizarse tanto en estaciones autónomas remotas para seguir procesos de eutrofización, en cuerpos de agua sensibles, como en la monitorización on-line de iones fosfato en plantas de tratamiento de agua residual para determinar, de manera más eficiente, la dosis de reactivo químico o biológico necesaria para eliminar el fósforo del agua tratada. En este sentido, el siguiente paso consistiría en la implementación de una válvula inteligente de manera que cuando el sistema analítico detectara altos niveles de FRS en el efluente de la EDAR, este se recirculara y no fuera descargado a los cuerpos de agua, evitando así la hipernutrición del ecosistema que podría desencadenar episodios puntuales de eutrofización.

7.8. Referencias

1. Nollet, L. M. L. *Handbook of Water Analysis*. **16**, (Taylor & Francis Group, 2007).
2. Carpenter, S. R. *et al.* Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorus and Nitrogen. *Ecol. Appl.* **820**, 559–568 (1998).
3. Ansari, A. A., Gill, S. S., Lanza, G. R. & Rast, W. *Eutrophication: causes, consequences and control*. (Springer, 2011).
4. Huffman, L. G. Evaluating Eutrophication Control Alternatives for the Lower Neuse River, North Carolina. *PhD Thesis* (University of Virginia, 1988).
5. Tekile, A., Kim, I. & Kim, J. Mini-review on river eutrophication and bottom improvement techniques, with special emphasis on the Nakdong River. *J. Environ. Sci. (China)* **30**, 113–121 (2015).
6. Sperling, M. Von. *Wastewater characteristics, treatment and disposal. Biological Wastewater Treatment Series 1*, (IWA Publishing, 2007).
7. Carty, G., O’Leary, G. & Meaney, B. *Wastewater Treatment Manuals. Primary, secondary and tertiary treatment. Environmental Protection Agency* (Environmental Protection Agency, 1997).
8. Henze, M. & Comeau, Y. in *Biological Wastewater Treatment: Principles Modelling and Design*. 33–52 (IWA Publishing, 2008).
9. García, W. Basic wastewater characteristics. *Pipeline* **8**, 1–8 (1997).
10. Xiaolian, W., Yongzhen, P., Shuying, W., Jie, F. & Xuemei, C. Influence of wastewater composition on nitrogen and phosphorus removal and process control in A2O process. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **28**, 397–404 (2006).
11. Estela, J. M. & Cerdà, V. Flow analysis techniques for phosphorus: An overview. *Talanta* **66**, 307–331 (2005).
12. Bowden, M. & Diamond, D. The determination of phosphorus in a microfluidic manifold demonstrating long-term reagent lifetime and chemical stability utilising a colorimetric method. *Sensors Actuators, B Chem.* **90**, 170–174 (2003).
13. Villalba, M. M., McKeegan, K. J., Vaughan, D. H., Cardosi, M. F. & Davis, J. Bioelectroanalytical determination of phosphate: A review. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **59**, 1–8 (2009).
14. Legiret, F. E. *et al.* A high performance microfluidic analyser for phosphate measurements in marine waters using the vanadomolybdate method. *Talanta* **116**, 382–387 (2013).

15. Motomizu, S. & Li, Z. H. Trace and ultratrace analysis methods for the determination of phosphorus by flow-injection techniques. *Talanta* **66**, 332–340 (2005).
16. Nagul, E. A., McKelvie, I. D., Worsfold, P. & Koley, S. D. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Anal. Chim. Acta* **890**, 60–82 (2015).
17. Murphy, J. & Riley, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **27**, 31–36 (1962).
18. Fiedoruk, M., Mieczkowska, E., Koncki, R. & Tymecki, Ł. A bimodal optoelectronic flow-through detector for phosphate determination. *Talanta* **128**, 211–214 (2014).
19. Mckelvie, I. D., Peat, D. M. W. & Worsfold, P. J. Techniques for the Quantification and Speciation of Phosphorus in Natural-Waters. *Anal. Proc.* **32**, 437–445 (1995).
20. Daykin, R. N. C. & Haswell, S. J. Development of a micro flow injection manifold for the determination of orthophosphate. *Anal. Chim. Acta* **313**, 155–159 (1995).
21. Kronka, E. A. M., Reis, B. F., Korn, M. & Bergamin, F. H. Multicommutation in flow analysis. Part 5: Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. *Anal. Chim. Acta* **334**, 287–293 (1996).
22. Doku, G. N. & Haswell, S. J. Further studies into the development of a micro-FIA system based on electroosmotic flow for the determination of phosphate as orthophosphate. *Anal. Chim. Acta* **382**, 1–13 (1999).
23. Fernandes, R. N. & Reis, B. F. Flow system exploiting multicommutation to increase sample residence time for improved sensitivity. Simultaneous determination of ammonium and ortho-phosphate in natural water. *Talanta* **58**, 729–737 (2002).
24. Ymbern, O. *et al.* Versatile lock and key assembly for optical measurements with microfluidic platforms and cartridges. *Anal. Chem.* **87**, 1503–1508 (2015).
25. Ymbern, O. Development of centrifugal microfluidic platforms based on polymer microfabrication technology (tesis doctoral). (Universitat Autònoma de Barcelona, 2015).
26. Pedro, S. G. *et al.* A ceramic microreactor for the synthesis of water soluble CdS and CdS/ZnS nanocrystals with on-line optical characterization. *Nanoscale* **4**, 1328 (2012).

27. Grudpan, K. *et al.* Stopped-flow injection simultaneous determination of phosphate and silicate using molybdenum blue. *Talanta* **58**, 1319–1326 (2002).
28. Mas, F., Cladera, A. & Cerdà, V. New approach to sequential injection analysis: using the sample as carrier. *Analyst* **123**, 1541–1546 (1998).
29. Hiroshi, B. Fundamental Conditions and Reaction Mechanisms in Formation of Phosphomolybdenum Blue. **37**, 484–491 (1963).
30. Muñoz, a., Torres, F. M., Estela, J. M. & Cerda, V. Evaluation of spectrophotometric methods for determination of orthophosphates by sequential injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **350**, 21–29 (1997).
31. Mas-Torres, F., Estela, J. M., Miró, M., Cladera, A. & Cerdà, V. Sequential injection spectrophotometric determination of orthophosphate in beverages, wastewaters and urine samples by electrogeneration of molybdenum blue using tubular flow-through electrodes. *Anal. Chim. Acta* **510**, 61–68 (2004).
32. Demirhan, E., Akpınar, Z., Apar, D. K. & ÖZBEK, B. Ascorbic acid degradation kinetic for microwave dried basil, purslane and celery leaves. *Lat. Am. Appl. Res.* **45**, 113–118 (2015).
33. Daly, J. A. & Ertingshausen, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the ‘CentrifiChem’. *Clin. Chem.* **18**, 263–265 (1972).
34. Yuan, J.-P. & Chen, F. Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5078–5082 (1998).
35. World health organization (WHO). *Guidelines for drinking-water quality*. World health organization (2011).
36. Armijo Castro, F., San Martín, J. & Armijo Valenzuela, M. Contenido en sílice en algunas aguas minerales. *An. Bromatol.* 365–373 (1979).
37. Chalmers, R. A. & Sinclair, A. G. Analytical applications of B-heteropoly acids: Part II. *Anal Chim Acta* **34**, 412–418 (1966).
38. da Rocha, Z. M. *et al.* Compact and autonomous multiwavelength microanalyzer for in-line and in situ colorimetric determinations. *Lab Chip* **12**, 109 (2012).
39. Scherrenberg, S. M. Reaching ultra low phosphorus concentrations by filtration techniques (tesis doctoral). (Technische Universiteit Delft, 2011).

Capítulo 8

Conclusiones generales y perspectivas futuras

El trabajo realizado a lo largo de esta tesis ha dado como resultado al desarrollo de diferentes microanalizadores automatizados, utilizando la tecnología LTCC y de polímeros, para la determinación, mediante medidas potenciométricas y ópticas, de múltiples parámetros, cumpliendo los requisitos que demandaban las aplicaciones estudiadas.

Todos ellos presentan, como características analíticas comunes, una elevada selectividad, sensibilidad, repetitividad y reproducibilidad, junto a un alto nivel de integración, miniaturización y automatización. Este conjunto de características ha permitido dotar de portabilidad a los microsistemas analíticos, pudiendo llevar a cabo análisis, in situ y en tiempo real, de forma rápida y económica.

Al final de cada uno de los capítulos se han ido presentando las conclusiones específicas para cada microanalizador desarrollado. De manera general, se han diseñado, construido e integrado, en las plataformas de microfluídica, las operaciones unitarias del procedimiento analítico necesarias para la realización de este. Tras su optimización, se han satisfecho los requisitos de las aplicaciones analíticas estudiadas. Así, se han integrado los elementos de mezcla, de pretratamiento de la muestra y los sistemas de detección que requería cada aplicación. En alguno de los casos, la integración de estos elementos ha supuesto un hito en el desarrollo de microsistemas analíticos en el GSB. En este sentido, merece la pena destacar que se han integrado por primera vez, de manera monolítica en sistemas de flujo potenciométricos, membranas de difusión gaseosa utilizando la tecnología de polímeros, usando como sustrato COC. Otra novedad, relacionada con los microanalizadores con detección potenciométrica, se encuentra en el desarrollo de una plataforma de uso general, fabricada en COC, para la implementación de sensores potenciométricos, que incluye una nueva configuración para la integración del electrodo de referencia, basado en una nueva pasta serigrafiable de Ag/AgCl compatible con el sustrato, que minimiza los problemas de estabilidad y reproducibilidad de estos dispositivos encontrados hasta el momento. En cuanto a la detección óptica, esta tesis ha contribuido a explotar la potencialidad y versatilidad del lector de plataformas microfluídicas miniaturizado,

basado en el concepto de llave y cerradura, desarrollado conjuntamente con otros miembros del GSB.

Tratando de dar un paso más hacia la miniaturización y automatización real de los sistemas analíticos, objetivo prioritario en el grupo de investigación, se ha implementado un sistema de gestión de fluidos miniaturizado, automatizado, versátil y completamente reconfigurable que permite programar secuencias de autocalibración y análisis autónomo sin la necesidad de un operador.

Así, los microanalizadores desarrollados han sido aplicados al análisis de muestras tanto acuosas como biológicas (según la aplicación), desde aquellas que presentaban una matriz más simple, como agua potable, hasta aquellas con matriz altamente compleja como sangre, vino o aguas residuales de procedencia industrial, obteniendo resultados altamente satisfactorios.

Por último, el trabajo desarrollado en esta tesis ha permitido obtener todos los conocimientos y herramientas necesarias para desarrollar instrumentación analítica miniaturizada funcional, hecho que debe ser aprovechado en el futuro por el GSB para potenciar la aplicación de los microanalizadores a procesos reales, instalándolos y evaluando su funcionamiento en plantas de tratamiento de agua residuales, tanto urbanas como industriales, en la monitorización de procesos de fermentación de vino y cervezas, en sistemas de reciclado de agua en misiones espaciales reales o aplicándolos en el campo de la sanidad o cuidado del paciente.

En este sentido, gracias a los conocimientos adquiridos, actualmente se está trabajando, junto a la empresa Devicare, en el desarrollo de diversos dispositivos POC para el autocontrol, por parte del propio paciente, de distintos parámetros relacionados con enfermedades crónicas. Estos sistemas serían análogos en su funcionamiento a un glucómetro y permitirían determinar, mediante medidas potenciométricas, parámetros en sangre como Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , entre otros. Este campo es muy prometedor siendo un claro ejemplo de la posibilidad de realizar transferencia de conocimientos y resultados del mundo académico al de la empresa.

