

# NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA GESTIÓN DE FLUIDOS EN SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE ANÁLISIS

Memoria presentada por  
MARÍA DEL MAR BAEZA LABAT  
Para optar al grado de doctor en Química



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE QUÍMICA

Bellaterra, Marzo 2004

---

La presente tesis titulada “Nuevas estrategias para la gestión de fluidos en sistemas automatizados de análisis”, ha sido realizada en los laboratorios del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, por María del Mar Baeza Labat bajo la dirección del Dr. Julián Alonso Chamarro y del Dr. Jordi Bartrolí i Molins.

Bellaterra, 15 de Marzo de 2004

Julián Alonso Chamarro  
Profesor Titular

Jordi Bartrolí i Molins  
Catedrático de Universidad

---

**Grup de Sensors i Biosensors**  
Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona  
Edifici Cn. 08193 Bellaterra  
Telf: +34 93 581 18 36 Fax: +34 93 581 23 79

El trabajo descrito en la presente memoria se ha llevado a cabo gracias a la colaboración de las siguientes instituciones:

Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid

Por la concesión de una beca predoctoral para la realización de la tesis doctoral (1996-1999).

Proyecto: Deposición selectiva de membranas fotocurables asistidas y encapsulación automatizada de microsensores integrados. MAT94-0668-C03-03

Proyecto: Desarrollo de microsistemas analíticos integrados. Microvaloraciones y  $\mu$ FIA. MAT97-0720-C03-02



A Pau, Mar y Joan



## Agradecimientos

Por fin llegó el gran momento de escribir la última hoja de *la tesis*, y es que hay cosas que parece que nunca se vayan a terminar, pero todo tiene un principio y un final más o menos afortunado. La verdad es que dadas las circunstancias no hubiese podido terminar este laborioso trabajo sin la ayuda directa o indirecta de muchas personas.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores Julián Alonso y Jordi Bartrolí la confianza que pusieron en mí, hace ya mucho tiempo. Especialmente, a Julián, que además de director ha sido un amigo dispuesto a ayudarme y colaborar en este trabajo siempre que ha sido necesario y, además por partida doble.

A mis compañeros de laboratorio, a los que estuvieron y, a los que todavía están, gracias por su compañía, sus chistes y un largo etc. de grandes cosas. No quisiera olvidarme de nadie pero si así ocurre, no es con ninguna mala intención pero sí por las prisas del momento como siempre en mi caso. A los antiguos, Silvia M., Sonia, Cristina, Núria V., Silvia S., Eugeni, Marta, Joan, Meri, Hector, Xavier L.... y, a los que todavía están Oma, Núria, Mar, Mariona, Mavi, Aleix, Xavier, Bea, Arben, gracias a todos.

A todos *mis colegas* de l'EUPMA debo darles las gracias por su comprensión en mis continuas idas y venidas, Paco, Xavier, Angels, Adriana, Toni, Fela, Miguel Ángel, Raquel, Tere, Estela, Albert, Jose, Maria, Miquel y, especialmente a Eva por las cinco semanas que me han servido de una valiosísima prorroga.

A mi familia, he de agradecerle que me haya aguantado estoicamente durante todo este tiempo, soportándome tal como soy. Especialmente a Javier, Pau, Mar, Joan y a mamá, que han sobrellevado todos mis agobios y nervios con bastante resignación. A Rogelio debo agradecerle toda la ayuda que me ha prestado tantos fines de semana. A Javier le quiero agradecer que haya convertido todos mis deseos en los suyos propios y, que me haya apoyado en todo y mucho más.

Bueno, ya no me queda más tiempo. Besitos para todos y un fuerte abrazo.



## Presentación

En la presente Tesis se recogen cuatro trabajos experimentales, basados en distintas técnicas de gestión de fluidos. El contenido de la memoria está distribuido en 9 capítulos.

En el primer capítulo se ha realizado una introducción general a las distintas técnicas de flujo utilizadas. Se hace especial mención al concepto e instrumentación básica de cada técnica así como, a las distintas técnicas derivadas. También se explica la reacción modelo utilizada en los tres sistemas con detección espectrofotométrica y, algunas de las aplicaciones de esta reacción en sistemas de flujo.

El segundo capítulo recoge los objetivos del presente trabajo. En el tercer capítulo se ha realizado una descripción de los materiales y métodos comunes en los sistemas de flujo. Se ha realizado una descripción de la preparación de las distintas soluciones y reactivos utilizados. También de los métodos matemáticos usados en la caracterización de los sistemas de detección utilizados, la espectrofotometría y la potenciometría.

En los capítulos 4, 5, 6 y 7 se discuten los resultados más relevantes de los sistemas implementados. En el capítulo 4 se muestran los resultados obtenidos en el primer sistema estudiado. Se trata de un sistema r-FIA donde, se ha substituido la válvula de inyección por una microbureta automática. La viabilidad de la sustitución se ha evaluado mediante estudios sin reacción química, realizados con una solución colorante, y estudios con reacción química llevados acabo con la reacción modelo de Griess-Ilosvay.

En el capítulo 5 se aborda la descripción, desarrollo e implementación de un sistema autoadaptativo de análisis basado en la técnica SIA. El grado de inteligencia del sistema se ha conseguido mediante un programa informático, desarrollado en lenguaje C++, realizado para esta aplicación concreta. Éste gestiona todo el sistema instrumental, realiza la adquisición de datos, autocalibra el sistema automáticamente y, mediante un control *feedback* o por retroceso, modifica las condiciones de operación adaptando éstas a la muestra problema. Este sistema realiza el análisis de ion nitrito en dos intervalos de concentración distintos.

El capítulo 6 describe el desarrollo de un sistema SIA con detección potenciométrica, para la determinación de ion cadmio. Con el objeto de aumentar la selectividad y sensibilidad del

sistema, se ha integrado una etapa de preconcentración en línea. Se ha incorporado una columna de intercambio iónico, en la que se ha retenido el cadmio en forma de clorocomplejo. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad se han estudiado dos modos de detección distintos, normal y diferencial.

En el capítulo 7, se detalla toda la información relativa al diseño, desarrollo, implementación, evaluación y gestión, de un microsistema analítico elaborado íntegramente en esta Tesis. El elemento central es un microchip de silicio fabricado con tecnología IC y un programa informático de gestión que facilita una interfase idónea entre el usuario y el sistema. Se ha propuesto un modelo que describe el comportamiento de los fluidos en el microchip, y predice la respuesta analítica. Finalmente, se ha optimizado el sistema para el análisis ion nitrito en muestras con alta concentración.

En el capítulo 8, se enuncian las conclusiones más relevantes de todos los sistemas desarrollados en esta Tesis. También se indican algunas de las perspectivas futuras y posibles aplicaciones de la infraestructura desarrollada.

Finalmente, en el capítulo 9 se recogen todos programas informáticos desarrollados o utilizados, en cada uno de los sistemas experimentales, y una breve descripción sobre los mismos.

## **Índice**



## **ÍNDICE**

|  |      |
|--|------|
| Índice .....   | iii  |
| Resumen .....  | xi   |
| Abreviaturas y símbolos .....  | xvii |
| <br>   |      |
| 1 Introducción general .....   | 3    |
| 1.1 La Química Analítica .....                                       | 3    |
| 1.2 Automatización de métodos analíticos .....                       | 5    |
| 1.3 Análisis por inyección en flujo (FIA) .....                      | 8    |
| 1.3.1 Concepto e instrumentación .....                               | 9    |
| 1.3.2 Evaluación de la dispersión .....                              | 16   |
| 1.3.3 Técnicas derivadas del FIA .....                               | 19   |
| 1.4 Análisis por inyección secuencial (SIA) .....                    | 21   |
| 1.4.1 Concepto e instrumentación .....                               | 22   |
| 1.4.2 Aplicaciones y perspectivas del SIA .....                      | 28   |
| 1.5 Microsistemas de análisis .....                                  | 32   |
| 1.5.1 Sistemas de gestión de fluidos miniaturizados .....            | 34   |
| 1.5.1.1 Técnicas de fabricación .....                                | 34   |
| 1.5.1.2 Materiales .....   | 36   |
| 1.5.2 Aplicaciones de los microsistemas totales de análisis .....    | 39   |
| 1.5.3 Sistemas comerciales y tendencias futuras .....                | 45   |
| 1.6 Reacción modelo .....  | 46   |
| 1.6.1 Potencial peligrosidad del ion nitrito .....                   | 46   |
| 1.6.2 Métodos para la determinación de ion nitrito .....             | 48   |
| 1.7 Bibliografía .....   | 51   |
| <br>   |      |
| 2 Objetivos .....  | 67   |
| <br>   |      |
| 3 Materiales y métodos .....   | 71   |
| 3.1 Introducción .....   | 71   |
| 3.2 Reactivos y soluciones .....                                     | 72   |
| 3.2.1 Análisis de ion nitrito .....                                  | 72   |
| 3.2.2 Determinación de ion cadmio .....                              | 73   |
| 3.3 Parámetros de caracterización de los sistemas de detección ..... | 74   |
| 3.3.1 Detección espectrofotométrica .....                            | 74   |
| 3.3.1.1 Límite de detección .....                                    | 74   |
| 3.3.1.2 Repetitividad y reproducibilidad .....                       | 76   |

|  |     |
|--|-----|
| 3.3.2 Detección potenciométrica.....   | 77  |
| 3.3.2.1 Caracterización de los electrodos selectivos de iones integrados en sistemas de flujo..... | 79  |
| 3.3.2.2 Características de respuesta de los electrodos selectivos de iones .....                   | 80  |
| 3.4 Bibliografía.....  | 85  |
| <br>4 Determinación de ion nitrito mediante r-FIA. Aplicación al análisis de ozono.....            | 89  |
| 4.1 Introducción.....  | 89  |
| 4.2 Descripción del sistema .....  | 93  |
| 4.2.1 Instrumentación .....  | 93  |
| 4.2.2 Programa de gestión de análisis por FIA y r-FIA .....  | 95  |
| 4.3 Estudio de la respuesta sin reacción química .....   | 96  |
| 4.4 Estudio de la repuesta con reacción química.....   | 99  |
| 4.4.1 Validación de la microbureta como sistema de inyección .....                                 | 99  |
| 4.4.1.1 Optimización.....  | 99  |
| 4.4.1.2 Comparación de la respuesta en los dos modos de inyección.....                             | 100 |
| 4.4.2 Sistema r-FIA adaptativo con microbureta .....   | 103 |
| 4.4.2.1 Estudio volumen óptimo de reactivo para concentraciones altas .....                        | 107 |
| 4.4.2.2 Estudio volumen óptimo de reactivo para concentraciones bajas .....                        | 108 |
| 4.4.3 Caracterización del sistema en los dos intervalos de aplicación.....                         | 109 |
| 4.4.3.1 Límites de detección .....   | 110 |
| 4.4.3.2 Repetitividad y reproducibilidad.....  | 111 |
| 4.5 Implementación del análisis de ozono.....  | 112 |
| 4.5.1 Soluciones estándar de ozono .....   | 112 |
| 4.5.2 Optimización de la etapa de difusión .....   | 113 |
| 4.5.2.1 Estudio de la concentración de ion nitrito en el aceptor.....                              | 114 |
| 4.5.2.2 Efecto del caudal en la etapa de difusión.....   | 117 |
| 4.5.2.3 Rendimiento de la etapa de difusión .....  | 118 |
| 4.5.3 Caracterización del sistema .....  | 120 |
| 4.5.3.1 Límite de detección y repetitividad.....   | 120 |
| 4.5.3.2 Estabilidad estándares de ozono .....  | 121 |
| 4.5.3.3 Reproducibilidad.....  | 122 |
| 4.5.4 Análisis de agua dopada con ozono .....  | 122 |
| 4.6 Conclusiones.....  | 123 |
| 4.7 Bibliografía.....  | 126 |
| <br>5 Análisis autoadapativo por inyección secuencial .....  | 131 |
| 5.1 Introducción.....  | 131 |
| 5.2 Descripción del sistema .....  | 133 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.2.1 Instrumentación .....   | 133 |
| 5.2.2 Programa de gestión de análisis por SIA.....  | 135 |
| 5.3 Estudio de la respuesta sin reacción química .....  | 139 |
| 5.3.1 Estudios previos.....   | 139 |
| 5.3.1.1 Precisión y exactitud .....   | 140 |
| 5.3.1.2 Estudio de la influencia del caudal en el volumen aspirado .....  | 142 |
| 5.3.2 Estudio de la respuesta sin reacción química .....  | 143 |
| 5.3.2.1 Estudio de la relación colorante-muestra y las condiciones de operación .....   | 145 |
| 5.3.2.2 Optimización de la separación de interfas.....  | 147 |
| 5.4 Determinación de ion nitrito .....  | 153 |
| 5.4.1 Caracterización de interfas en la secuencia muestra/reactivo/muestra .....  | 154 |
| 5.4.1.1 Efecto del índice de refracción.....  | 156 |
| 5.4.1.2 Efecto del portador en la respuesta .....   | 157 |
| 5.4.2 Caracterización de interfas en la secuencia reactivo/muestra/reactivo.....  | 159 |
| 5.4.2.1 Efecto del índice de refracción.....  | 160 |
| 5.5 Optimización del sistema en dos intervalos de concentración .....   | 160 |
| 5.5.1 Intervalo 0,0-3,0 ppm de ion nitrito.....   | 161 |
| 5.5.1.1 Relación reactivo/muestra/reactivo 25/150/25.....   | 161 |
| 5.5.1.2 Relación reactivo/muestra/reactivo 50/150/50.....   | 163 |
| 5.5.2 Intervalo 0,0-20,0 ppm de ion nitrito.....  | 164 |
| 5.5.2.1 Relación reactivo/muestra/reactivo 25/50/25.....  | 164 |
| 5.5.2.2 Relación reactivo/muestra/reactivo 12,5/25/12,5 .....   | 165 |
| 5.5.3 Comparación de calibrados .....   | 166 |
| 5.5.4 Caracterización .....   | 168 |
| 5.6 Desarrollo del sistema autoadaptativo .....   | 172 |
| 5.6.1 Programa de gestión .....   | 173 |
| 5.6.2 Validación con muestras sintéticas o patrón. ....   | 177 |
| 5.7 Validación del sistema con muestras reales.....   | 178 |
| 5.7.1 Cinética de inhibición.....   | 178 |
| 5.7.2 Respirometría.....  | 184 |
| 5.8 Conclusiones .....  | 186 |
| 5.9 Bibliografía .....  | 187 |
| 6 Desarrollo de un sistema SIA de alta sensibilidad para la determinación de ion cadmio, con etapa de preconcentración en línea ..... | 191 |
| 6.1 Introducción .....  | 191 |
| 6.2 Descripción del sistema SIA .....   | 198 |
| 6.2.1 Instrumentación .....   | 198 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.2.2 Construcción de electrodos tubulares selectivos a ion cadmio .....                           | 201 |
| 6.2.2.1 Preparación de la membrana sensora .....   | 201 |
| 6.2.2.2 Proceso de construcción de los electrodos selectivos de configuración<br>tubular .....     | 201 |
| 6.2.3 Columnas de preconcentración .....   | 203 |
| 6.2.4 Procedimientos de análisis .....   | 204 |
| 6.2.4.1 Calibración .....  | 205 |
| 6.2.4.2 Efecto del pH .....  | 205 |
| 6.2.4.3 Preconcentración .....   | 206 |
| 6.3 Evaluación de las características hidrodinámicas .....   | 207 |
| 6.3.1 Calibración del sistema .....  | 208 |
| 6.3.2 Volumen mínimo aspirado .....  | 212 |
| 6.4 Desarrollo de un sistema SIA para el análisis de ion cadmio con dos modos de<br>detección..... | 213 |
| 6.4.1 Optimización del sistema SIA con modo de detección normal.....                               | 217 |
| 6.4.1.1 Coeficientes de selectividad potenciométricos .....  | 219 |
| 6.4.1.2 Evaluación de la influencia del pH en el valor de potencial .....                          | 220 |
| 6.4.1.3 Evaluación de la influencia del pH en la solución portadora.....                           | 221 |
| 6.4.2 Optimización del sistema SIA con modo de detección diferencial.....                          | 223 |
| 6.4.3 Caracterización de los dos modos de detección .....  | 227 |
| 6.4.3.1 Modo de detección normal.....  | 227 |
| 6.4.3.2 Detección diferencial .....  | 229 |
| 6.4.4 Comparación de los dos modos de detección.....   | 231 |
| 6.5 Incorporación de una etapa de preconcentración en línea.....                                   | 232 |
| 6.5.1 Descripción sistema experimental con etapa de preconcentración .....                         | 233 |
| 6.5.2 Estudio de la reacción de complejación en discontinuo.....                                   | 234 |
| 6.5.3 Etapa de preconcentración en línea .....   | 237 |
| 6.5.3.1 Reacción en discontinuo con preconcentración en línea .....                                | 237 |
| 6.5.3.2 Reacción y preconcentración en línea.....  | 240 |
| 6.5.3.3 Estudio de la etapa de detección en el sistema con modo de detección<br>diferencial.....   | 247 |
| 6.5.4 Caracterización de los modos de detección con preconcentración en línea....                  | 251 |
| 6.5.5 Comparación de los sistemas de detección .....   | 255 |
| 6.6 Caracterización de la etapa de preconcentración en línea.....                                  | 257 |
| 6.7 Análisis de muestras reales.....   | 260 |
| 6.7.1 Evaluación del grado de interferencia .....  | 260 |
| 6.7.2 Determinación de ion cadmio en muestras reales .....   | 261 |
| 6.8 Conclusiones.....  | 264 |
| 6.9 Bibliografía.....  | 265 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 7       | Desarrollo de sistemas de gestión de fluidos miniaturizados. Modelización y aplicación al análisis de ion nitrito ..... | 273 |
| 7.1     | Introducción .....  | 273 |
| 7.1.1   | Elementos básicos para la gestión de microfluidos .....   | 274 |
| 7.1.1.1 | Elementos activos .....   | 274 |
| 7.1.1.2 | Grado de mezcla a Reynolds bajos .....  | 278 |
| 7.1.2   | Ventajas e inconvenientes de los microsistemas .....  | 282 |
| 7.2     | Introducción experimental .....   | 283 |
| 7.3     | Descripción del sistema .....   | 284 |
| 7.3.1   | Diseño del sistema .....  | 285 |
| 7.3.1.1 | Diseño y construcción del microchip .....   | 287 |
| 7.3.1.2 | Diseño y construcción del soporte del microchip .....   | 289 |
| 7.3.1.3 | Sistema de detección .....  | 290 |
| 7.3.2   | Descripción del programa de gestión .....   | 292 |
| 7.4     | Caracterización del sistema sin reacción química .....  | 297 |
| 7.4.1   | Sistema de detección .....  | 298 |
| 7.4.1.1 | Calibrado comparativo en escala micro/macro .....   | 298 |
| 7.4.1.2 | Secuencias preliminares .....   | 300 |
| 7.4.2   | Caracterización hidrodinámica del sistema .....   | 301 |
| 7.4.3   | Determinación del volumen útil .....  | 309 |
| 7.5     | Modelización del sistema microfluídico .....  | 311 |
| 7.5.1   | Estudio experimental .....  | 315 |
| 7.5.1.1 | Preparación del colorante azoico .....  | 315 |
| 7.5.1.2 | Determinación de $C_0$ .....  | 316 |
| 7.5.1.3 | Determinación de la difusividad .....   | 319 |
| 7.6     | Estudio de la reacción en línea en el microchip .....   | 327 |
| 7.6.1   | Estudio de variables .....  | 329 |
| 7.6.2   | Optimización .....  | 332 |
| 7.7     | Ánalisis de muestras reales .....   | 336 |
| 7.7.1   | Condiciones .....   | 336 |
| 7.7.2   | Resultados .....  | 338 |
| 7.7.3   | Ánalisis estadístico .....  | 340 |
| 7.7.4   | Caracterización del microsistema .....  | 342 |
| 7.8     | Conclusiones .....  | 343 |
| 7.9     | Bibliografía .....  | 345 |
| 8       | Conclusiones generales .....  | 351 |

|  |     |
|--|-----|
| 9 Apéndices .....  | 359 |
| 9.1 Programa en BASIC para la inyección con microbureta en un sistema FIA .....                        | 359 |
| 9.2 Programa en C para la gestión del análisis de ion nitrito en un sistema SIA<br>autoadaptativo..... | 363 |
| 9.3 Programa en BASIC para la gestión del sistema de análisis SIA de ion cadmio....                    | 391 |
| 9.4 Programa en Visual-BASIC para la gestión integrada del sistema a escala<br>microchip.....          | 397 |

## **Resumen**



---

## ***Resumen***

---

La técnica de análisis por inyección en flujo (Flow Injection Analysis, FIA) y la técnica de análisis por inyección secuencial (Sequential Injection Analysis, SIA) han sido ampliamente utilizadas en la automatización de procesos de análisis rutinarios. La creciente demanda de información química útil para la monitorización y el control de procesos químicos, ha favorecido la expansión de estas metodologías con una tendencia clara hacia la miniaturización de la instrumentación. La presente tesis esta dirigida a la implementación de nuevos elementos de gestión de fluidos y procedimientos de flujo continuo que incrementen la capacidad de funcionamiento automático y autónomo de los analizadores de flujo continuo así como su portabilidad. El trabajo desarrollado se podría desglosar en cuatro apartados donde se han abordado distintas estrategias y nuevas tecnologías de fabricación de sistemas de gestión de fluidos de aplicación en diferentes técnicas de flujo continuo. A continuación se realiza un breve resumen de las características principales de cada uno de los sistemas implementados.

En un primer apartado se describe la implementación de un sistema FIA reverso monocanal, en el que ha sido substituida la válvula de seis vías por una microbureta como sistema de inyección. Se han realizado estudios comparativos de la respuesta de ambos sistemas en ausencia de reacción química y utilizando la reacción modelo de ion nitrito (Griess-Ilosvay). En esta reacción se forma un colorante azoico que es determinado espectrofotométricamente a 555 nm. No se han encontrado diferencias significativas entre ambos sistemas de inyección. Con esta modificación se aporta versatilidad y elasticidad a

la técnica FIA, confiriéndole además capacidad adaptativa. Paralelamente, el uso de la variante de flujo reverso minimiza el consumo de reactivos y la generación de residuos. Aprovechando la versatilidad de la instrumentación desarrollada se han optimizado las condiciones de operación para analizar ion nitrito en dos intervalos de concentración distintos modificando el volumen de reactivo inyectado. Los intervalos de concentración establecidos son 0,0-0,1 ppm y 0,0-3,0 ppm de ion nitrito, con unos límites de detección de 0,009 y 0,024 ppm respectivamente, y una repetitividad de 1,35% y 0,52% calculada como la RSD (%) de 10 inyecciones sucesivas de un patrón dentro del intervalo lineal de cada zona.

Finalmente, el sistema r-FIA se ha adaptado para la determinación de ozono en aguas. Se ha incorporado una etapa de difusión gaseosa que permite el paso de ozono desde el canal dador hasta el canal aceptor por el que circula ion nitrito. De esta manera se obtiene una disminución de absorbancia en el análisis de ion nitrito proporcional a la concentración de ozono en el canal dador. Se ha estudiado el efecto de la concentración de ion nitrito en el canal aceptor y el caudal de difusión. La concentración de ion nitrito óptima se ha fijado en 0,250 ppm y el caudal en 1,5 ml/min. La eficacia del proceso de difusión del ozono es del 2,2%. Este hecho afecta a la sensibilidad media que es baja (0,0092( $\pm$ 0,0012) UA/ppm) aunque el límite de detección equiparable (0,044 ppm) al de otros métodos propuestos (0,03 ppm). En contrapartida, se ha aumentado la zona lineal de respuesta respecto al método estándar en una década de concentración. Este hecho resulta especialmente útil en sistemas de monitorización en continuo. Para terminar se ha estudiado la estabilidad de las soluciones de ozono, la repetitividad y la reproducibilidad del método.

El segundo apartado se centra en la técnica SIA y se puede dividir en tres etapas. En la primera se ha desarrollado la infraestructura básica para la gestión y control de este tipo de sistemas. Se ha elaborado un programa informático en lenguaje C++ que permite el control de todos los elementos del sistema así como, la adquisición de datos. Inicialmente, se han caracterizado los procesos hidrodinámicos que se verifican en el sistema de flujo sin reacción química. Utilizando un colorante, se han definido la influencia de diferentes factores sobre la separación de interfases muestra-portador. En la segunda parte, se han estudiado estos mismos procesos con reacción química utilizando como reacción modelo la de determinación de ion nitrito (Griess-Ilosvay). Aprovechando la versatilidad, robustez y mayor grado de autoadaptación de la técnica SIA, se ha optimizado el sistema para analizar ion nitrito en dos intervalos de concentración. Se ha estudiado la respuesta para distintas relaciones de volúmenes de muestra y reactivo. Con el objeto de eliminar el efecto Schlieren se ha realizado el estudio de interfases correspondientes a distintas secuencias muestra/reactivo/muestra y reactivo/muestra/reactivo. El sistema analítico propuesto es simple y robusto, y permite, con mínimos cambios en el programa de operación, la

determinación de ion nitrito en dos intervalos de concentración. Los dos intervalos son 0,0-3,0 ppm y 0,0-20,0 ppm, con límites de detección respectivamente de 0,048 ppm y 0,4 ppm. La tercera parte ha consistido en la elaboración de un programa informático de control que permite un control con retroalimentación del sistema y la realización de una etapa previa de calibración. De este modo, el programa adquiere cierto grado de inteligencia y puede autocalibrarse y monitorizar la concentración de ion nitrito, seleccionando, de forma automática, el intervalo de trabajo a utilizar para obtener un máximo de sensibilidad. Finalmente, se ha evaluado la infraestructura instrumental desarrollada aplicándola al análisis de muestras reales de concentración muy diversa. Los resultados obtenidos son satisfactorios tanto para las muestras de cinética inhibitoria (0-1500 ppm) como para las muestras de respirometría (0-20 ppm). La frecuencia de muestreo ha sido  $12\text{ h}^{-1}$ .

En el tercer apartado se engloba el desarrollo dos sistemas SIA para el análisis de ion cadmio, con y sin etapa de preconcentración en línea. En ambos se han implementado dos modos de detección potenciométrica diferente. El primer sistema utiliza como detector un electrodo tubular de membrana cristalina homogénea ( $\text{CdS}/\text{Ag}_2\text{S}$ , 1:10) y un electrodo convencional de referencia (modo de detección normal). El segundo utiliza dos electrodos tubulares integrados secuencialmente y separados por una distancia definida. De este modo cada electrodo actúa alternativamente como indicador y referencia respecto del otro (modo de detección diferencial). Los dos sistemas han sido optimizados con el objetivo de aumentar la sensibilidad. Los límites de detección de ambos sistemas son, respectivamente,  $5,9 \cdot 10^{-6}\text{ M}$  (detección normal) y  $4,7 \cdot 10^{-6}\text{ M}$  (detección diferencial) siendo la sensibilidad de  $25,3(\pm 0,6)$  y  $39(\pm 3)$  mV/década para cada uno de ellos. La preconcentración en línea se ha realizado con una microcolumna de intercambio iónico. El catión cadmio ha sido retenido en forma de clorocomplejo  $\text{CdCl}_4^{2-}$  usando una resina de intercambio aniónico. Las concentraciones óptimas de reactivo y eluyente fueron determinadas previamente por estudios en discontinuo e implementadas después en el sistema de flujo. Los mejores resultados se han obtenido utilizando como reactivo una disolución de  $\text{NaCl}$  3M y  $\text{HCl}$  0,03 M. Los complejos retenidos fueron eluidos con una solución de  $\text{NaNO}_3$  1,5M y detectados posteriormente con electrodos tubulares sensibles a cadmio en los dos modos de detección. El tiempo de preconcentración y las condiciones de operación han sido estudiados y optimizados con el objetivo de minimizar el ruido en la señal e incrementar la selectividad del sistema. Con el procedimiento descrito se han eliminado las interferencias debidas a  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . El sistema propuesto permite, preconcentrando 2,6 ml de muestra, la determinación de cadmio en un amplio intervalo de concentración,  $2,5 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-3}\text{ M}$  para el modo normal y  $2,5 \cdot 10^{-7}$ - $2,5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$  para el modo diferencial con límites de detección de  $1,5 \cdot 10^{-7}\text{ M}$  y  $1,8 \cdot 10^{-7}\text{ M}$ , respectivamente. El factor de preconcentración obtenido fue de 39

y 26 para el sistema con detección normal y diferencial. Para la validación del sistema desarrollado se analizaron muestras reales procedentes de un suelo contaminado con metales pesados en proceso de remediación. Los resultados obtenidos se compararon con los suministrados por el método de referencia confirmándose que no existían diferencias significativas entre ambos.

En el último apartado se describe el diseño y desarrollo de la infraestructura básica para la implementación de sistemas microfluídicos. Se han diseñado y construido cuatro microsistemas de gestión de fluidos utilizando la tecnología microelectrónica de silicio. Se ha desarrollado la infraestructura instrumental básica para el control de la gestión de fluidos en el microchip, así como el programa de control en lenguaje Visual-BASIC, que gestiona todos los elementos y la adquisición de datos. Éste permite la utilización del sistema por cualquier usuario, sin conocimientos de informática, mediante un sistema de ventanas desplegables. La entrada/salida de fluidos en el microchip se realiza mediante la actuación combinada de válvulas solenoides y una microbureta automática. Inicialmente se realizaron estudios sobre la respuesta del sistema en procesos sin reacción química utilizando una solución de colorante. Después de verificar el funcionamiento correcto de todo el equipo se ha realizado la modelización del sistema microfluídico, estudiando la señal analítica en función del caudal y del volumen de inyección. Se ha podido comprobar que el modelo que describe mejor el comportamiento de los fluidos en el microchip es un reactor continuo de tanque agitado con retardo. Después de la caracterización y modelización del microchip se ha implementado la determinación de ion nitrito en línea. Para ello se ha recurrido al concepto de multiconmutación que permite mezclar previamente muestra y reactivo en la entrada al microchip. Se ha estudiado del tiempo de conmutación de las válvulas, es decir del volumen de las fracciones de muestra y reactivo intercaladas, sobre la respuesta del detector. En todas condiciones evaluadas se han obtenido respuestas análogas a las predichas por el modelo. Se fijan como óptimas las relaciones de conmutación muestra/reactivo de 150/450 y 400/200 ms con un tiempo de aspiración total de 10 s a un caudal de 4,166  $\mu$ l/s. La primera relación permite el análisis en un intervalo lineal más amplio, 0-250 ppm, pero con un límite de detección superior (0,35 ppm) y menor sensibilidad (0,0041( $\pm$ 0,0004) UA/ppm). En la segunda relación, el intervalo lineal es menor, 0-50 ppm, pero tanto el límite de detección (0,17 ppm) como la sensibilidad (0,0091( $\pm$ 0,0003) UA/ppm) mejoran notablemente. Finalmente, se ha realizado la validación del microsistema analizando muestras reales con alta concentración de ion nitrito, entre 0-1500 ppm, procedentes de un estudio de inhibición cinética en una EDAR piloto. Los resultados obtenidos han permitido corroborar el modelo de inhibición a ion nitrito con una gran exactitud. Los análisis se han realizado usando las dos relaciones optimizadas no encontrándose diferencias significativas entre ellas.

## **Abreviaturas**



---

## *Abreviaturas*

---

|                                  |   |             |   |
|----------------------------------|---|-------------|---|
| <b>§</b>                         | Apartado  | <b>MEMS</b> | <i>Micro Electro Mechanical Systems</i>     |
| <b>ADN</b>                       | Ácido desoxirribonucleico                                     | <b>MSFA</b> | <i>MonoSegmented Flow Analysis</i>          |
| <b>BI</b>                        | <i>Bead Injection</i>   | <b>MsST</b> | <i>Meso-System Technology</i>               |
| <b>C</b>                         | Concentración después del proceso de dispersión               | <b>mV</b>   | milivoltios                                 |
| <b>C<sub>0</sub></b>             | Concentración inicial sin dispersión                          | <b>n</b>    | Índice de refracción                        |
| <b>C<sub>máx</sub></b>           | Concentración correspondiente a la máxima altura              | <b>N</b>    | Número de etapas de mezcla                  |
| <b>CMOS</b>                      | Óxido de Metal Semiconducto Complementario                    | <b>NED</b>  | Diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina |
| <b>CNM</b>                       | Centro Nacional de Microelectrónica                           | <b>OUR</b>  | <i>Oxygen Uptake Rate</i>                   |
| <b>COC</b>                       | <i>Cyclic Olefin Copolymers</i>                               | <b>PC</b>   | Policarbonato                               |
| <b>C<sub>r</sub></b>             | Concentración del reactivo después del proceso de dispersión  | <b>PDMS</b> | Poli(dimetilsiloxano)                       |
| <b>C<sub>r</sub><sup>0</sup></b> | Concentración inicial del reactivo, sin dispersión            | <b>PE</b>   | Polietileno                                 |
| <b>C<sub>s</sub></b>             | Concentración de la muestra después del proceso de dispersión | <b>PEEK</b> | <i>Polyetheretherketone</i>                 |
| <b>C<sub>0</sub></b>             | Concentración inicial de la muestra, sin dispersión           | <b>PET</b>  | <i>Polyethyleneterephthalate</i>            |

|                                      |  |                                      |   |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| <b>D</b>                             | Dispersión   | <b>PMMA</b>                          | <i>Polimethyl methacrylato</i>                              |
| <b>DG</b>                            | Difusión gaseosa   | <b>PS</b>                            | Poliestireno  |
| <b>DG-FIA</b>                        | Ánálisis por inyección en flujo con difusión gaseosa               | <b>PTFE</b>                          | Politetraflururo de etileno                                 |
| <b>DG-r-FIA</b>                      | Ánálisis por inyección en flujo inverso con difusión gaseosa       | <b>PVC</b>                           | Cloruro de polivinilo                                       |
| <b>DTR</b>                           | Distribución de tiempo de residencia                               | <b>PVDF</b>                          | <i>Polyvinylidene difluoride</i>                            |
| <b><math>\epsilon</math></b>         | Coeficiente de absorbividad molar                                  | <b>Q</b>                             | Caudal  |
| <b>EAA</b>                           | Espectroscopia atómica de absorción                                | <b>r-FIA</b>                         | Ánálisis por inyección en flujo reverso                     |
| <b>EAAS</b>                          | Espectroscopia atómica de absorción con atomización electrotérmica | <b>rpm</b>                           | Velocidad de giro de la bomba                               |
| <b>EDAR</b>                          | Estación depuradora de aguas residuales                            | <b>RSD</b>                           | <i>Relative Standard Deviation</i>                          |
| <b>ESI</b>                           | Electrodo selectivo de iones                                       | <b>SCI</b>                           | <i>Sequential Injection Chromatography</i> ,                |
| <b>F<sub>cal</sub></b>               | Estadístico F calculado  | <b>SMI</b>                           | <i>Simultaneous Multiple Injection</i>                      |
| <b>FDA</b>                           | <i>Franz diffusion cell</i>  | <b>s<sub>n-1</sub></b>               | Desviación típica de la media                               |
| <b>FEP</b>                           | Poli(tetrafluoroetileno-co-hexafluoropropileno)                    | <b>SIA</b>                           | Ánálisis por inyección secuencial                           |
| <b>FIA</b>                           | Ánálisis por inyección en flujo                                    | <b>t<sub>95%</sub></b>               | Tiempo de respuesta   |
| <b>FP</b>                            | Factor de preconcentración   | <b>t<sub>n-1</sub><sup>95%</sup></b> | t-Student para n-1 grados de libertad y un 95% de confianza |
| <b>F<sub>tab</sub></b>               | Estadístico F tabulado   | <b>t<sub>cal</sub></b>               | Estadístico t calculado                                     |
| <b>GSB</b>                           | Grup de Sensors i Biosensors                                       | <b>t<sub>tab</sub></b>               | Estadístico t tabulado                                      |
| <b>H</b>                             | Altura de pico con dispersión                                      | <b>UA</b>                            | Unidades de absorbancia                                     |
| <b>H<sub>0</sub></b>                 | Altura de pico sin dispersión                                      | <b>UV-vis</b>                        | Ultravioleta-visible  |
| <b>HDPE</b>                          | Polietileno de alta densidad                                       | <b>V</b>                             | Potencial correspondiente a la muestra                      |
| <b>H<sub>máx</sub></b>               | Altura en el máximo del pico                                       | <b>V<sub>0</sub></b>                 | Potencial correspondiente al blanco                         |
| <b>I<sub>D</sub></b>                 | Punto de isodispersión   | <b>V<sub>iny</sub></b>               | Volumen de inyección  |
| <b>I<sub>n-1</sub><sup>95%</sup></b> | Intervalo de confianza al 95%                                      | <b>V<sub>mic</sub></b>               | Volumen inyección microbureta                               |
| <b>LB</b>                            | Línea base   | <b>V<sub>r</sub></b>                 | Volumen de reactivo   |
| <b>LD</b>                            | Límite de detección  | <b>V<sub>s</sub></b>                 | Volumen de muestra  |
| <b>LD<sub>ap</sub></b>               | Límite de detección aparente                                       | <b>VS1</b>                           | Válvula selectora 1   |
| <b>LED</b>                           | <i>Light Emitting Diode</i>  | <b>VS2</b>                           | Válvula selectora 2   |
| <b>LIRL</b>                          | Límite inferior de respuesta lineal                                | <b>VS3</b>                           | Válvula solenoide de 3 vías                                 |
| <b>LOV</b>                           | <i>Lab-on-Valve</i>  | <b>V<sub>vál</sub></b>               | Volumen inyección válvula                                   |
| <b>LSRL</b>                          | Límite superior de respuesta lineal                                | <b>W<sub>o</sub></b>                 | Anchura de solapamiento                                     |
| <b>LSS</b>                           | <i>Liquid Static gas Static</i>                                    | <b>W<sub>r</sub></b>                 | Anchura del pico de reactivo                                |
| <b>LTCC</b>                          | <i>Low-Temperature Co-fired Ceramic</i>                            | <b>W<sub>s</sub></b>                 | Anchura del pico de muestra                                 |
| <b>MDD</b>                           | Modo de detección diferencial                                      | <b>ZF</b>                            | <i>Zone Fluidics</i>  |
| <b>MDN</b>                           | Modo de detección normal   | <b>µTAS</b>                          | <i>Micro-Total Analysis Systems</i>                         |

# **Introducción general**



# Capítulo 1

---

## ***Introducción general***

---

### **1.1 La Química Analítica**

Todo el mundo acepta hoy en día que la información es uno de los pilares de la *sociedad del bienestar*. La información permite actuar de una manera rápida y provechosa en ámbitos diversos como el económico, el social, el político, el cultural, y sobre todo, en el científico y tecnológico.

La química analítica se ha convertido en la ciencia de la caracterización y de la medida de los sistemas materiales, e incluye en ésta cualquier tipo de información del orden que sea sobre la forma química, la teoría de la medida y el dominio de los instrumentos de medida. Actualmente el objetivo de la química analítica es la obtención de más información, cualitativa, cuantitativa o estructural y de mejor calidad, acerca de sustancias o sistemas naturales, utilizando para ello recursos y tiempo mínimos.

Un abordaje integral de la química analítica implica la necesidad de incorporar correctamente el desarrollo alcanzado en todos los campos de la química básica, instrumentación e información, en un esquema que considera todos los aspectos de la

obtención e interpretación de datos, y tiene en cuenta los efectos de las medidas químicas [de la Guardia, 1999].

Los problemas tecnológicos e industriales, así como los ambientales, los biomédicos o los sociales, son considerados como desafíos cuya solución por los químicos analíticos involucra la selección de las herramientas óptimas o el desarrollo de las estrategias adecuadas. De los campos más diversos, (biomédico, ambiental, industrial, etc.) emana una demanda social de información analítica, cada vez más estricta. Día a día aparecen nuevos objetos de análisis, aumenta la necesidad de determinar cada vez concentraciones más bajas, con mayor exactitud y precisión en los resultados, y ésta información se precisa en un tiempo cada vez más breve y a un coste cada vez menor.

La química analítica actual, para dar respuesta a esta demanda social, ha de disponer de instrumentación que permita llevar a cabo medidas *in situ*, presentar una elevada selectividad para eliminar los efectos de matriz, fácil de manipular, que se pueda aplicar a más de un tipo de muestra y que permita de forma simple la modificación y la adaptación de los métodos analíticos. Con esta finalidad, se dispone de reacciones analíticas clásicas generadoras de información cuantitativa y/o cualitativa, con una limitada selectividad. Con el objeto de poder efectuar una determinación libre de interferencias, se han tenido que desarrollar procedimientos más complejos que a menudo, incorporan procesos previos de separación. Las técnicas instrumentales de análisis, básicamente espectroscópicas y electroquímicas, orientadas inicialmente hacia la etapa de detección, han de aumentar su selectividad a costa de medir propiedades físicas de interés analítico más selectivas basadas en instrumentos complejos y capaces de realizar separaciones (cromatografía, electroforesis capilar).

La investigación en las últimas décadas ha incidido simultáneamente en dos líneas tecnológicas, aparentemente opuestas: el diseño de grandes equipos, muy versátiles en cuanto a trabajo analítico pero que requieren un elevado mantenimiento y mano de obra especializada, y que además han de trabajar en ambientes controlados; y por otro lado, la miniaturización de sistemas analíticos que permitan su utilización *in situ* para obtener información continua en tiempo real. En los últimos diez años los sistemas analíticos miniaturizados han despertado un enorme interés en la comunidad analítica lo que se ha plasmado en un importante esfuerzo investigador [Manz et al., 1990]. Los estudios desarrollados incluyen desde las técnicas de microfabricación, materiales, operación, control, sistemas de detección hasta numerosas aplicaciones dentro de áreas diversas como la química, la medicina o la ingeniería. Otra de las líneas prioritarias de investigación actual dentro de la química analítica, en contraposición o como complemento, tanto de los grandes equipos sofisticados como de los sistemas miniaturizados son los sensores

químicos. Los sensores químicos, son considerados como un tipo especial de sistema analítico integrado (*Integrated Analytical Systems*, IAS) [Alegret, 2003], que ofrecen ciertas ventajas potenciales en cuanto a la simplificación, miniaturización, automatización, etc., del procedimiento analítico. Teóricamente, éste se reduce a dos únicas etapas: una de reconocimiento y otra de transducción. En este ámbito también se han aprovechado los avances tecnológicos de la miniaturización y la transmisión de información que han proporcionado materiales y unos conceptos innovadores para la construcción de microsensores químicos [Suzuki, 2000], con la ventaja adicional de que el tratamiento de señal puede ser integrado en el mismo chip sensor.

## 1.2 Automatización de métodos analíticos

Dentro de la química analítica y para cubrir la creciente demanda de información medioambiental, la monitorización, entendida como el conjunto de metodologías analíticas que permiten extraer información de sistemas en evolución, está experimentando un crecimiento espectacular, donde se refleja y aprovecha la enorme evolución que, a nivel tecnológico, se ha producido en el área de la instrumentación analítica [Namiesnik, 2000]. La última frontera de la monitorización ambiental es la obtención de la información de los sistemas naturales o procesos industriales de forma continua, *in situ* y en tiempo real. El camino a recorrer para conseguir este objetivo aún es largo pero ya se pueden observar los primeros desarrollos que confirman esta tendencia.

En su aplicación más clásica, la monitorización ambiental, se realiza mediante el muestreo puntual y posterior medida en el laboratorio. Cuando se hace necesario realizar de forma rutinaria un gran número de medidas, la automatización puede reducir drásticamente tanto el tiempo de análisis como el coste de personal. Resuelto el problema del análisis de rutina de grandes series de muestras, los avances realizados en el área de la automatización han abierto la posibilidad de diseñar equipos dotados de funcionamiento autónomo para obtener información sobre un determinado analito de forma continua en tiempo real, o con un poco de retardo.

En este objetivo confluyen nuevos conceptos como los microsistemas de análisis integrados y los sensores químicos, desarrollados paralelamente, en los que domina la idea de integración y portabilidad de equipos. Los sensores además mejoran la selectividad del sistema y simplifican por tanto los procedimientos analíticos clásicos. Todas las estrategias marcan el camino hacia el diseño de instrumentos portátiles y robustos, capaces de operar en campo y de proporcionar información en tiempo real.

La conjunción de los avances obtenidos hasta ahora, tanto en la simplificación del procedimiento como en la automatización de éste, ha permitido dotar a la monitorización

de las primeras herramientas para obtener información en tiempo casi real. Este hecho está contribuyendo a la implantación de otra forma de entender la monitorización ambiental, más cercana al objetivo final deseado, donde se valora la importancia de tener información continuada de la evolución de los sistemas naturales o procesos.

La continuación lógica de este proceso es incorporar todos los avances conseguidos en el ámbito de la miniaturización y el procesado de señales. Todo ello permitiría en futuros desarrollos, la introducción de cierto grado de inteligencia en los sistemas analíticos. Esto significa, en general, que los sistemas serán, en cierta manera expertos. De este modo, un analizador inteligente tendrá la capacidad de autocalibrarse, evaluarse, autooptimizarse [Betteridge et al., 1986; Rius et al., 1995] y en definitiva, autoadaptarse a situaciones experimentales cambiantes.

En la actualidad en campos tan diferentes como la biotecnología, el medio ambiente o los procesos químicos industriales, existe una demanda creciente de información química obtenida en tiempo real *in situ* o *on-line*. Este hecho ha acelerado la investigación y desarrollo de métodos automáticos de análisis. Disponer de información de los parámetros clave de cualquier proceso es algo necesario, ya sea para el seguimiento de su funcionamiento, como para la modelización y control del mismo. Este trabajo, una vez establecida la metodología a aplicar, es siempre rutinario y lento y puede ser automatizado con el objetivo de reducir costes y minimizar recursos humanos implicados.

Los requisitos exigibles a los analizadores para una adecuada monitorización *on-line* incluyen una elevada capacidad de muestreo, rapidez de análisis, robustez en el sentido de resistir interferencias contenidas en matrices complejas, diseño simple, fácil mantenimiento y capacidad de ser automatizados en todas las etapas del procedimiento, desde el muestreo a la medida pasando por la calibración periódica. Todo ello combinado con una mínima inversión y unos costes de operación reducidos [Andrew et al., 1994].

Las metodologías de automatización que mayor potencialidad tiene para cumplir los requisitos descritos en el párrafo anterior son sin duda las de flujo continuo. Partiendo del análisis por inyección en flujo propuesto por Ruzicka y Hansen, la evolución constante del concepto original ha permitido establecer otras variantes y técnicas que complementan a su predecesora. Las técnicas de flujo constituyen hoy un cuerpo de doctrina dentro de la química analítica, y son utilizadas para mejorar la resolución y características operacionales de numerosas metodologías analíticas y técnicas instrumentales de medida. Ejemplos del variado abanico de técnicas de flujo desarrolladas son el flujo segmentado, el flujo continuo, el flujo intermitente, flujo detenido (*stopped-flow*) y el microflujo (*chips*). En éstos últimos, los tamaños de canal son mucho menores (0,1-300  $\mu\text{m}$ ) que en los

sistemas de flujo convencionales. Los sistemas de microflujo operan generalmente en régimen laminar (Reynolds bajos), y los procesos de mezcla y reacción están gobernadas por la difusión, que en estas condiciones es muy reproducible [Christian, 2003].

El desarrollo de las técnicas quimiométricas ha tenido un gran crecimiento y expansión, y su aplicación a las técnicas de flujo ha permitido potenciar las posibilidades de éstas. Las facetas donde inciden las técnicas quimiométricas son dos, la primera es el desarrollo del sistema y la segunda el tratamiento de la información adquirida. No obstante, la aportación más importante hasta el momento de las técnicas quimiométricas ha sido el uso del diseño experimental para sustituir la optimización univariante en el proceso de desarrollo y optimización de los sistemas de flujo [Karlberg y Torgrip, 2003].

Las técnicas de flujo han sido utilizadas para automatizar, de un modo asequible, infinidad de operaciones químicas y análisis, incluyendo valoraciones, y son especialmente útiles en la determinación de medidas de velocidad de reacción, en reacciones catalizadas química o biológicamente. Los sistemas de flujo son utilizados para tratar, condicionar y preparar soluciones antes de la medida, incluyendo el filtrado o separación de partículas, ajuste de pH, dilución de la concentración y separaciones. Las técnicas de flujo son también una herramienta excelente para la gestión de disoluciones mediante la técnica de conmutación [Zagatto et al., 1999].

Adicionalmente, distintos tipos de procesos de separación, como la cromatografía, la electroforesis capilar (EC) y la electrocromatografía capilar, se ha ido incorporando en el análisis en flujo. Un tipo de electroforesis que combina las prestaciones de EC y FIA es el análisis por electroinyección que se utiliza para reacciones químicas y medidas por vía húmeda [Andreev y Christian, 2001]. Otras operaciones básicas de separación importantes incorporadas en sistemas de flujo incluyen la difusión de gases, diálisis y la extracción con solventes. Las columnas empaquetadas con resinas u otros materiales permiten realizar en flujo procesos de precipitación, adsorción o extracción en fase sólida, llevar a cabo reacciones selectivas vía receptores adecuados, agentes complejantes, etc.

Por lo tanto, las metodologías de flujo aportan al análisis por vía húmeda la posibilidad de automatizar fácilmente y a bajo coste numerosas determinaciones. Además estas técnicas son rápidas, precisas y tienen un coste de mantenimiento reducido, utilizan pequeños volúmenes de muestra y presentan bajos consumos de reactivo, uno de los factores importantes en la llamada química verde. Adicionalmente estas metodologías minimizan el error de operación, pueden realizar análisis múltiples y además son miniaturizables.

La aceptación en la comunidad científica de los sistemas de flujo como técnica analítica es un hecho constatado. Las metodologías de flujo representan hoy en día un gran abanico de

herramientas para solventar de un modo eficaz la automatización de procesos de análisis de un modo universal, ya que integra todas las posibles operaciones unitarias y técnicas de detección base de la química analítica actual. El impacto de esta técnica ha sido tan importante que ya ha sido incluida como materia de estudio para las nuevas generaciones de químicos analíticos [Christian, 1995; Kellner et al., 1998].

### 1.3 Análisis por inyección en flujo

En las últimas décadas y dentro de las técnicas de flujo continuo, el FIA ha recibido una atención creciente. Inicialmente diseñada para automatizar análisis de rutina que exigen una frecuencia de muestreo alta [Ruzicka y Hansen, 1975], se ha implantado también como una técnica muy eficiente para mejorar los métodos de la química en disolución respecto al procesamiento y manipulación de la muestra. Como resultado un gran número de métodos analíticos tanto clásicos como de nuevo desarrollo han sido implementados con gran rapidez y simplicidad en sistemas de flujo [Ruzicka y Hansen, 1986]. Adicionalmente, la capacidad del FIA para controlar, de forma altamente reproducible, el volumen de muestra utilizado, su grado de mezcla con los reactivos, y los tiempos de reacción, ha permitido diseñar nuevos métodos analíticos no viables en condiciones estáticas. Como ejemplos encontramos el caso de productos o reactivos no estables en el tiempo o dar una solución definitiva a los problemas instrumentales existentes en los métodos cinéticos basados en el uso de reactivos enzimáticos. En este último caso, esta técnica de flujo permite, de una forma simple, que la señal analítica medida (variación de señal por unidad de tiempo) sea obtenida con una gran reproducibilidad. Es de destacar, la enorme disminución en los volúmenes de reactivo y muestra necesarios, junto con la alta reproducibilidad y repetitividad que aportan las técnicas de flujo. Paradójicamente, la alta versatilidad de estos sistemas ha sido una desventaja para su introducción comercial [Newman, 1996; [www.globalfia.com](http://www.globalfia.com)]. Este contrasentido se explica si se tiene en cuenta que dada su simplicidad instrumental, el coste de la adaptación de las condiciones operacionales a cada problema concreto puede superar la inversión inicial en la compra del equipo. Dado que las empresas comercializadoras nunca disponen de un servicio técnico con capacidad para dar una atención personalizada y dada su nula vocación de vender formación, la penetración de esta técnica está siendo inusualmente lenta.

Todas estas características hacen de la metodología FIA una herramienta esencial para la realización de análisis en tiempo real y para la monitorización [Andrew et al., 1994; Cerdà et al., 1999]. Hoy en día, el FIA ha sido ampliamente aceptado como medio fiable en el análisis de procesos (*Process Analytical Chemistry*, PAC) [van der Linden, 1984]. Recientemente se ha comenzado a explorar también el uso de esta técnica de flujo en analizadores portátiles de campo.

Esta progresión no se ha detenido, abriéndose cada día nuevas áreas de investigación y desarrollo. Una muestra de esta efervescencia es la continua aparición de nuevas técnicas de flujo, como el análisis por inyección secuencial (SIA), o la implantación de nuevos conceptos como los microsistemas de análisis totales ( $\mu$ TAS). Estos dispositivos permiten dar respuesta a la demanda cada vez mayor de sistemas de flujo miniaturizados de mayor robustez y simplicidad. El SIA ha permitido aumentar la versatilidad y capacidad autoadaptativa de los sistemas de flujo convencionales y el  $\mu$ TAS ha impulsado el desarrollo de toda la infraestructura necesaria para lograr la integración a escala micro de todas etapas del proceso analítico.

### 1.3.1 Concepto e instrumentación

La técnica FIA está basada en la inyección de una porción de la muestra líquida a analizar en una disolución portadora o de reactivo que fluye de forma continua. La muestra insertada en el flujo ocupa una zona que es trasladada hacia un detector que continuamente suministra una lectura de absorbancia, un potencial eléctrico u otro parámetro [Ruzicka y Hansen, 1975]. En su movimiento hacia el detector ocurre un fenómeno de dilución en las interfases delantera y trasera de la zona de muestra. Simultáneamente es posible mezclar este canal con otros canales auxiliares por los que fluyen soluciones con reactivos específicos que permitan la consecución de una reacción química determinada. El conjunto de los procesos de difusión junto con la reacción química es lo que se conoce por el concepto de dispersión [Valcárcel y Luque de Castro, 1984].

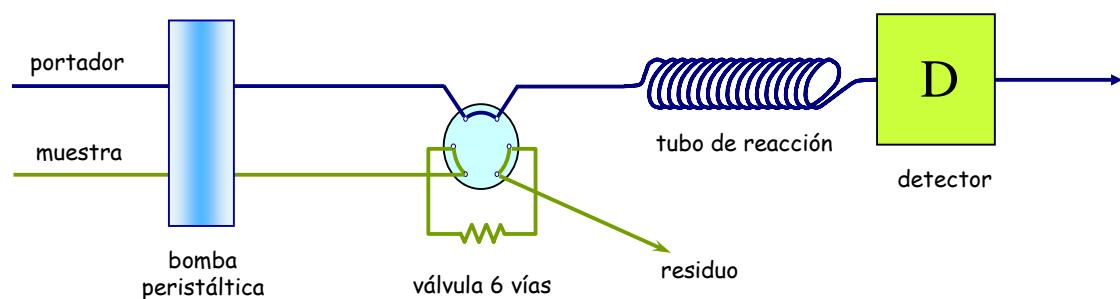
Las características principales de un sistema de análisis por inyección en flujo continuo son: la introducción de un volumen fijo y constante de muestra, *volumen de inyección*; la dispersión controlada de éste y, un tiempo de residencia de la muestra en el sistema constante y reproducible.

Mediante la geometría e hidrodinámica del sistema se controla la dispersión de la muestra, verificándose una mezcla incompleta pero reproducible de ésta que da lugar a un gradiente de concentración variable a lo largo del sistema. Desde la inyección de la muestra, y hasta el momento de la detección, no llega a establecerse ni el equilibrio físico (homogeneización de la porción de muestra inyectada) ni el equilibrio químico (reacción completa). Esto no es un problema ya que las condiciones experimentales (tiempo de residencia, temperatura, dispersión) se mantienen idénticas e invariables para muestras y soluciones patrón. La concentración de la muestra es evaluada frente a patrones adecuados, inyectados previamente del mismo modo que la muestra.

En la figura 1.1 se muestra el sistema FIA más sencillo. Está constituido por una bomba peristáltica que impulsa un reactivo o solución portadora a un caudal constante, una

válvula de inyección, situada después de la bomba, que permite la introducción de un volumen fijo y constante de muestra en el canal portador y, finalmente un bucle de mezcla o tubo de reacción entre la válvula de inyección y el sistema de detección. En este sistema, la muestra insertada se dispersa en la disolución de reactivo formándose, en las zonas de contacto (interfase delantera y trasera), un compuesto que puede ser medido al llegar al detector. También puede realizarse la inyección de reactivo en una canal portador de muestra. A esta variante se la denomina FIA reverso (*reverse FIA, r-FIA*). La inyección de reactivo presenta numerosas ventajas para la monitorización de parámetros de interés medioambiental, por ejemplo en aguas superficiales. En este caso, y ya que existe exceso de muestra, el r-FIA consigue la reducción del consumo de reactivo/os y simplifica la automatización del analizador.

La cinética de las reacciones tiene frecuentemente una gran influencia sobre la sensibilidad analítica. Si la cinética de la reacción entre la muestra y el reactivo es lenta, puede ser deseable incrementar el tiempo de residencia. En sistemas FIA convencionales, esto se puede realizar deteniendo el flujo mientras la mezcla muestra/reactivo está en el tubo de reacción, lo que se conoce como flujo detenido o *stopped-flow*. Este procedimiento, al minimizar la dispersión, no reduce la sensibilidad. Esto no es necesario en r-FIA, ya que el incremento de la dispersión que resulta de un mayor tiempo de residencia sin detener el flujo tenderá a incrementar la concentración de la muestra en la zona de reactivo. La extensión de la reacción puede incrementarse inyectando volúmenes grandes de reactivo, lo que aumentará la concentración del mismo y la velocidad de la reacción.



**Figura 1.1** Esquema básico de un sistema FIA convencional.

La instrumentación básica de un sistema FIA, se compone de los elementos de propulsión, inyección de la muestra, distribución, detección y registro o evolución según sea el grado de automatización del sistema. Las características básicas de estos elementos se comentan a continuación.

El sistema de impulsión de líquidos más utilizado son las bombas peristálticas, aunque esta función también puede realizarse con bombas de pistón y microburetas automáticas [Armas et al. 2002]. La utilización de uno u otro sistema de propulsión es función de la

técnica de flujo implementada. Las bombas peristálticas no pueden ser utilizadas cuando la resistencia hidrodinámica del sistema, debido al uso de tubos de conducción de pequeño diámetro o a la inserción de columnas empaquetadas, es grande. En estos casos se puede recurrir a bombas de alta presión análogas a las utilizadas en cromatografía, pero se pierde flexibilidad y aumenta el coste del sistema. En lo que respecta a la microbureta, se diferencia de la bomba peristáltica en la forma de propulsión del líquido continuo y en la no existencia de pulsaciones. Mientras que el propio principio de funcionamiento de las bombas peristálticas provoca un movimiento pulsante del líquido, esto no se observa en el caso de las buretas si se trabaja con motores paso a paso adecuados. Además, el émbolo y el cuerpo de la jeringa son rígidos y no se deforman durante un uso prolongado.

La utilización de las bombas peristálticas presenta diversas ventajas: (a) un ciclo de muestra más corto, ya que no es necesaria la fase de aspiración; (b) el sistema es más fácil de configurar y simple de diseñar, inicializar y operar; y (c) son más fáciles de manejar y más accesibles en los laboratorios.

En general, cuando la frecuencia de análisis pierde importancia frente a la estabilidad a largo plazo del sistema, la utilización de microbureta es la mejor opción [Ivaska y Ruzicka, 1993]. Un claro ejemplo de esta situación se da en el área de la monitorización y control de procesos.

El dispositivo de inyección de la muestra ha evolucionado desde el comienzo de la técnica en 1975. El análisis por inyección en flujo siempre ha estado marcado por el modo de introducir la muestra. La inyección de muestra, que inicialmente se realizó de forma manual, con una jeringa con aguja, ha evolucionado hasta la utilización en la actualidad de inyectores automáticos de múltiples funciones como el inyector proporcional desarrollado por Reis et al. [1993], constituido por secciones independientes, cada una de ellas equivalente a tres válvulas solenoides. Una variante operacional de este inyector es la inyección múltiple simultánea (SMI) utilizada en análisis en flujo monosegmentado (MSFA) para eliminar el efecto Schlieren en muestras con alta salinidad [Brito y Raimundo, 1998].

Con el desarrollo de sistemas más automatizados y robustos se han implementado métodos diferentes de inyección de muestra y de gestión de fluidos. Los dispositivos de inyección de muestra más utilizados son las válvulas de inyección de 6 vías. Estas permiten la inserción de un volumen de muestra constante (definido por las dimensiones de un bucle) en un canal portador líquido. Estos dispositivos han sido motorizados permitiendo el control de la inyección por ordenador [Ruzicka y Hansen, 1988].

También han sido utilizadas válvulas solenoides de tres vías que, por conmutación, permiten la medida del volumen de muestra o reactivo en sincronización con los movimientos de la bomba peristáltica [Reis et al., 1994; Martelli et al., 1995; Araújo et al., 1995a; Zagatto et al., 1999]. Este tipo de inyección hace necesario el control por ordenador de la conmutación de las válvulas y de la velocidad de giro de la bomba, con la consiguiente necesidad de un programa informático o *software* específico para cada aplicación. La ventaja que presenta es que, en función de la posición de conmutación de las válvulas, reactivo y muestra pueden ser aspirados secuencialmente por la bomba peristáltica. El volumen de cada uno de ellos viene definido por la velocidad de giro de la bomba y los tiempos de conmutación, lo que permite introducir volúmenes variables sin modificaciones físicas del sistema.

Las principales ventajas de la multiconmutación respecto a la técnica FIA clásica son: la miniaturización de los sistemas de flujo, la reducción del consumo de reactivo y muestra, incremento de reproducibilidad, flexibilidad, simplicidad y bajo consumo de energía y, la expansión de las posibilidades del análisis en flujo, al facilitar la implementación de distintos métodos de gradiente. Sin embargo, presenta tres desventajas, la primera es la restricción en los volúmenes insertados, ya que en el caso de las micro-inserciones puede provocar alteraciones no reproducibles en la dispersión debidas a los pulsos de la bomba, la segunda es la necesidad de trabajar en modo aspiración, y, la última es la escasez comercial de interfaces electrónicas y programas para el control reproducible de las válvulas. A pesar de estas desventajas la multiconmutación ha sido utilizada como sistema de inserción de muestra y se ha aplicado también en la realización de valoraciones espectrofotométricas y potenciométricas en flujo [Catalá Icardo et al., 2002].

La microbureta automática es otro de los sistemas de inyección que es posible utilizar. Aunque no existen aplicaciones de este modo de inyección en la bibliografía para esta aplicación concreta, si se ha utilizado en procesos de valoración en continuo [Alerm y Bartrolí, 1992; 1996]. El uso de este modo de inyección confiere autoadaptabilidad al sistema ya que es posible variar el volumen de inyección sin una modificación física del sistema, como ocurre con las válvulas de seis vías. Por tanto, la utilización de este sistema de inserción de muestra es una alternativa a la inyección convencional y aporta una instrumentación que facilita el desarrollo de sistemas automatizados.

Recientemente ha sido propuesto un sistema de inyección alternativo que consiste en el control de la velocidad de giro de dos bombas peristálticas mediante ordenador y de un conmutador situado en el punto de confluencia. El funcionamiento de las bombas está definido de modo que el caudal total siempre permanece constante y el volumen de inyección se determinan por el tiempo de funcionamiento de la bomba. Este sistema

permite realizar dilución de la muestra en línea e implementar el método de la adición estándar [Novis et al., 1999].

El entramado de tubos a través de los que circulan los líquidos o sistema distribuidor, normalmente se construye con tubos de teflón (PTFE) o polipropileno, de diámetros internos diversos del orden del milímetro. La confluencia y la división del flujo se pueden conseguir utilizando conexiones en configuraciones sencillas, por ejemplo en forma de T, normalmente de metacrilato.

Respecto al sistema detector existe un amplio abanico de sistemas de detección utilizable. Prácticamente, cualquier técnica instrumental de medida puede ser incorporada en sistemas de flujo. Mayoritariamente, se han utilizado los métodos de espectroscopía molecular (UV-visible, UV, IR, luminiscencia), espectroscopía atómica (absorción, emisión y fluorescencia) y también los métodos electroquímicos (amperometría, potenciometría, etc.) [Trojanowicz, 2000]. De todos ellos, los más habituales han sido los espectroscópicos, aunque la detección potenciométrica con electrodos selectivos de iones (ESI) se ha implementado con buenos resultados. Estos últimos dispositivos suministran respuesta en un amplio intervalo de concentración lo que los hace especialmente adecuados como detectores para sistemas de monitorización en continuo. Adicionalmente, su integración en sistemas de flujo permite minimizar algunos problemas que presentan cuando son utilizados en modo discontinuo [Frenzel, 1988].

Un problema constante que se plantea en todas las técnicas de inyección en flujo es el derivado de las diferencias físicas (índice de refracción, fuerza iónica, viscosidad, turbidez, etc.), que pueden existir entre la disolución de muestra y la disolución portadora donde es insertada. Cuando existen estas diferencias se producen alteraciones anómalas de la señal de los detectores no relacionadas directamente con la propiedad que suministra información analítica útil. El problema es inherente a la técnica FIA y es debido a las peculiares características de ésta. La solución de muestra inyectada, en su recorrido hacia el detector, no llega a mezclarse totalmente con el reactivo generando un gradiente de mezcla, tanto en las propiedades útiles analíticamente como en las no útiles.

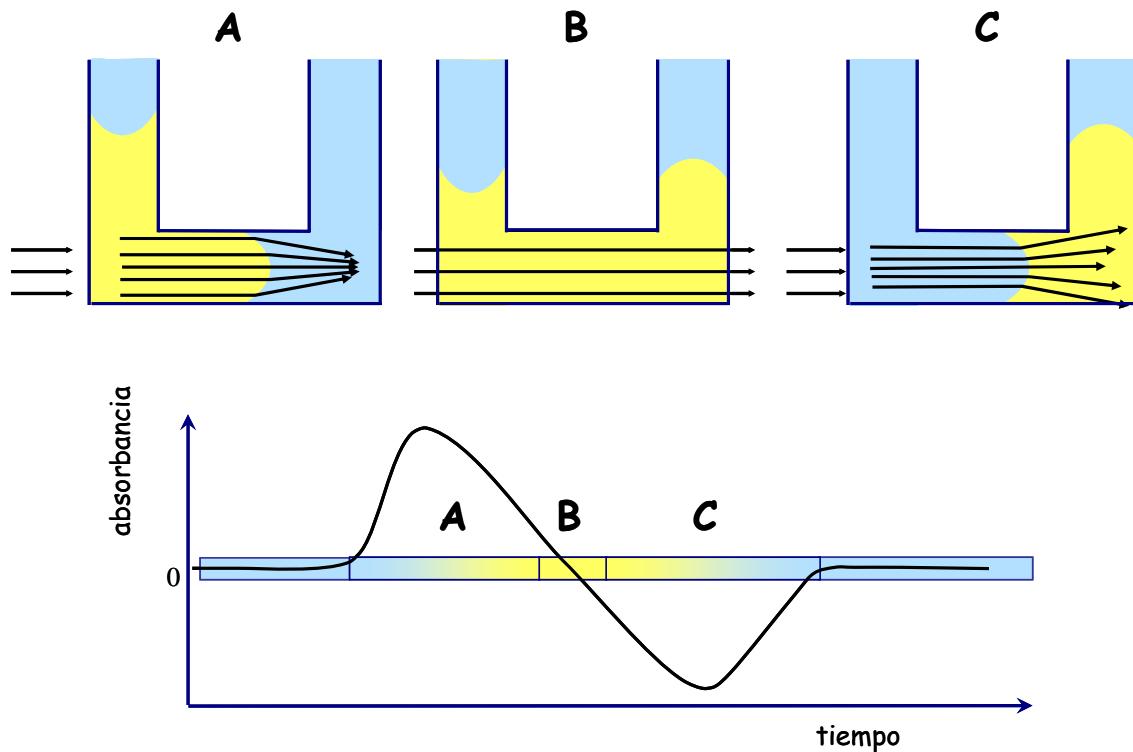
Para el caso concreto de sistemas con detección óptica, si las disoluciones muestra-reactivo no tienen un índice de refracción parecido, la luz es dispersada al pasar la zona de muestra por el detector, produciendo una absorción mayor o menor de la real. Este efecto se conoce con el nombre de Schlieren [Betteridge et al., 1978; Rothman et al., 1975; Zagatto et al., 1990]. Si una solución con alto índice de refracción ( $n$ ) es inyectada en una disolución portadora de agua, cuando ésta alcanza el detector se han formado, de acuerdo con las

condiciones de flujo laminar, una serie de líneas parabólicas que conforman un gradiente de índices de refracción entre la disolución portadora y la de muestra.

El sistema puede entenderse como una serie de lentes líquidas que focalizan o divergen la luz en una dirección y magnitud que dependen, de las características de la parábola, el aspecto de ésta respecto de la luz incidente, la dirección del gradiente de índices de refracción y su magnitud.

Asumiendo que la luz de la fuente es ligeramente divergente, el efecto de la parábola, cuando  $n_{muestra} > n_{portador}$  tiende a provocar la focalización sobre el detector y consecuentemente un incremento de la absorción. Por el contrario, si el gradiente se invierte en cuanto a índices de refracción, el efecto es el contrario.

Estas situaciones se dan cuando una muestra de índice de refracción diferente del portador pasa por el detector (figura 1.2). En sistemas de flujo complejos donde se explotan diferentes interfases simultáneamente, este tipo de señales suelen provocar interferencias en la señal analítica que dificultan su correcta interpretación. Por este motivo, en la mayor parte de las ocasiones, se hace necesaria su eliminación.



**Figura 1.2** Efecto Schlieren en las técnicas de flujo. (a) Secuencia de muestra-reactivo en un sistema FIA, (b) la muestra llega al detector, (c) el reactivo llega al detector y la respuesta obtenida.

Este fenómeno se puede evitar favoreciendo una adecuada mezcla entre ambas soluciones. Para evitar que ello conlleve una dilución innecesaria, se ha propuesto la inserción de

muestra en un canal que posteriormente se mezclará en un punto de confluencia con un canal auxiliar, por el que circulará la solución de reactivo. Este procedimiento, de gran utilidad para sistemas FIA convencionales no es aplicable si se implementan otras técnicas de flujo con menor grado de mezcla. Su implementación en sistemas de análisis por inyección secuencial (SIA), aunque factible, reduce drásticamente el potencial innovador de estas técnicas, al limitar el aprovechamiento de la información que es posible obtener de las interfases muestra-reactivo. Otras estrategias utilizadas en sistemas FIA han sido la compensación de la salinidad en el portador [McKelvie et al., 1997], la utilización de inyección múltiple simultánea en un sistema de flujo monosegmentado [Brito y Raimundo, 1998], o matemáticamente mediante la sustracción de la respuesta obtenida para un blanco en las mismas condiciones que la muestra [Martínez Calatayud et al., 1998].

La aplicación de la detección potenciométrica en sistema de flujo, permite eliminar el efecto Schlieren, asociado normalmente a los sistemas con detección espectrofotométrica. La integración de ESI en sistemas gestión de fluidos presenta además, una serie de ventajas frente al análisis potenciométrico discreto. El flujo continuo de disolución portadora que esta en contacto con el detector tiene un efecto acondicionador y regenerador de la membrana sensora, lo que provoca mejoras en la estabilidad del potencial del electrodo, mejor reproducibilidad de la señal y una reducción del tiempo de respuesta debido a una disminución en el grosor de la capa de difusión. Adicionalmente, se evita la contaminación de la muestra con la propia membrana sensora y con las soluciones internas del electrodo de referencia. Los efectos de deriva del potencial en función del tiempo, presentes en distinto grado en todos los electrodos, son compensados ya que las alturas de pico se miden en referencia a un valor de línea base registrada en cada análisis antes de la inyección de la muestra [Ramon, 2003].

A pesar de las ventajas, la detección potenciométrica en sistemas de flujo presenta el inconveniente de los potenciales de corriente. Cuando una disolución fluye a través de un tubo, entre los extremos de éste aparece una diferencia de potencial debido a un potencial electrocinético. El valor de éste depende de factores como el caudal, el diámetro del tubo, la conductividad de la disolución, la distancia entre los extremos, etc. Este potencial aumenta proporcionalmente a la velocidad de flujo, cuanto más pequeña es la sección transversal del tubo, cuanto más largo es el tubo y cuanto más baja es la conductividad. Cuando desaparece el movimiento del líquido, desaparece el potencial. Este hecho provoca la aparición de fluctuaciones periódicas de potencial que pueden llegar a valores de decenas de milivoltios, como consecuencia de las variaciones de caudal inherentes al principio de funcionamiento pulsante del sistema de impulsión mediante bombas peristálticas [Mascini y Palleshi, 1978; Horvai y Pungor, 1980].

Una manera de solucionar estos problemas es añadir un electrolito inerte a la muestra, antes de que llegue al detector. De esta manera se consigue incrementar la conductividad de la disolución y reducir así los potenciales de corriente a un nivel aceptablemente bajo. Con el objetivo de minimizar el problema originado por la bomba peristáltica, la inserción de un electrodo de toma de tierra justo antes del detector [Alonso et al., 1984] suprime sustancialmente las fluctuaciones de potencial de corriente originadas por el flujo pulsante de ésta.

La detección potenciométrica ha sido ampliamente utilizada en sistemas de gestión de fluidos basados principalmente en la técnica FIA [Couto y Montenegro, 2000], aunque poco implementada en otros sistema de gestión de fluidos como la técnica SIA. Las razones pueden ser diversas, como por ejemplo el problema adicional producido por el flujo discontinuo inherente a la técnica SIA o, la utilización de otras técnicas instrumentales más selectivas en estos sistemas.

### 1.3.2 Evaluación de la dispersión

En la figura 1.3 se muestra la señal transitoria típica obtenida en un sistema FIA. Recibe el nombre de fiagrama y sus características principales son:

- El tiempo de residencia,  $T$  es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta el valor máximo de señal.
- El tiempo de aparición o retraso,  $t$ , es el tiempo transcurrido entre el momento de la inyección y la aparición de señal.
- El tiempo de señal  $t_b$ , es el tiempo que tarda la muestra en pasar por el detector.
- El tiempo de retorno,  $T'$ , comprendido entre el valor del máximo de la señal y el momento de retorno a la línea base.

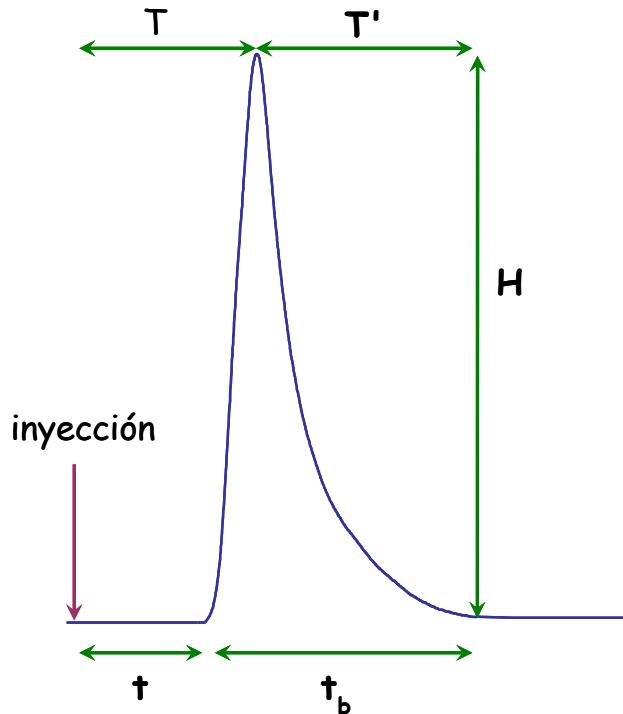
La altura de pico respecto a la línea base ( $H$ ) es frecuentemente la medida analítica utilizada y relaciona la respuesta del detector (absorbancia, potencial o intensidad de corriente) con la concentración del analito. Si la relación señal frente a concentración es lineal se puede derivar la siguiente expresión:

$$H = k \cdot C \quad \text{ecuación 1.1}$$

donde,  $k$  es una constante de proporcionalidad.

La altura y la forma del pico dependen del proceso de dispersión de la muestra en el portador dentro del sistema de flujo. Este proceso es función de características hidrodinámicas del sistema, como la longitud y la geometría del tubo de mezcla, del caudal

y del volumen de muestra, parámetros importantes y fáciles de controlar. La señal obtenida en r-FIA es análoga a la obtenida en el FIA convencional (figura 1.3).



**Figura 1.3** Características de la señal transitoria obtenida en un sistema FIA convencional.

La dispersión es una medida directa de la dilución que ha sufrido el *boleo* de muestra inyectado cuando pasa por el detector [Valcárcel y Luque de Castro, 1984]. Se define como la relación matemática de concentraciones de la muestra antes ( $C_0$ ) y después ( $C$ ) de que haya tenido lugar el proceso de transporte en un determinado sistema FIA, es decir el inverso del factor de dilución:

$$D = \frac{C_0}{C} \quad \text{ecuación 1.2}$$

Este parámetro permite describir el grado de dilución que ha sufrido cualquier punto del boleo de muestra insertado. A cada punto del pico FIA le corresponde un coeficiente de dispersión. Cuando la señal alcanza su máximo ( $H$ ), el valor de la dispersión es mínimo y viene dado por:

$$D_{\max} = \frac{C_0}{C_{\max}} \quad \text{ecuación 1.3}$$

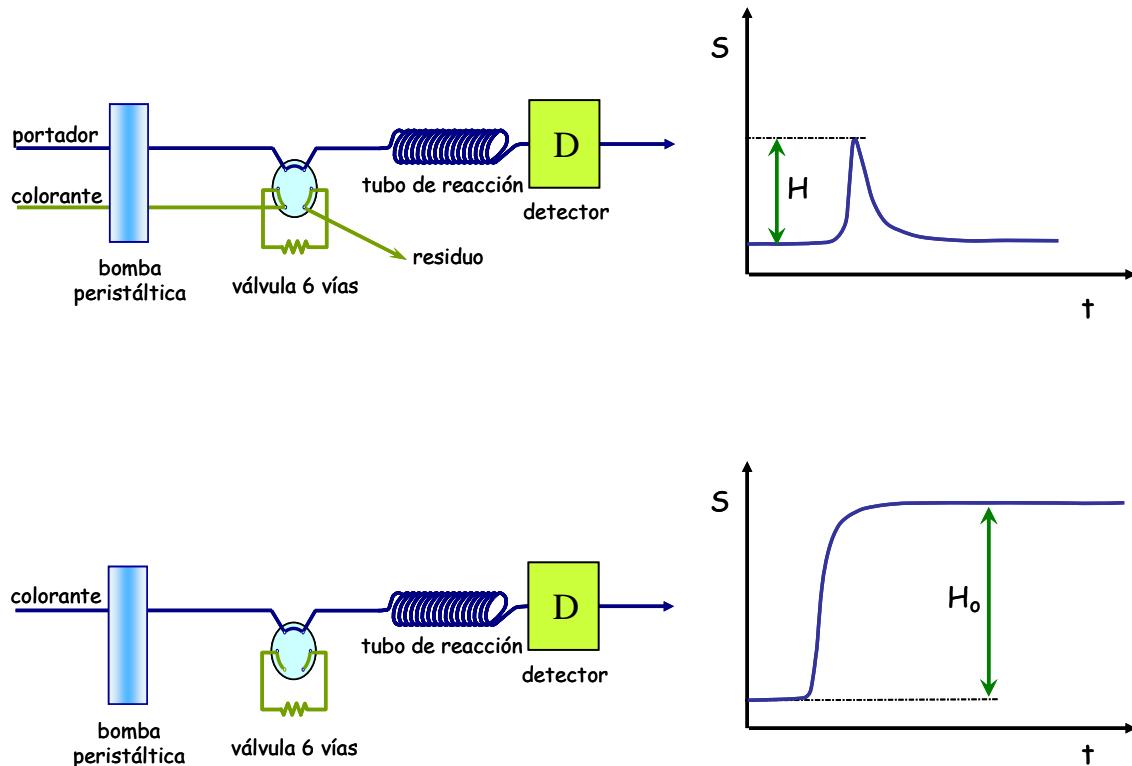
Asumiendo que existe una relación conocida entre la señal detectada (milivoltios, absorbancia, intensidad de fluorescencia, etc.), el registro de la misma (altura en cm o mm)

y la concentración de la muestra o de su producto de reacción, C, (ecuación 1.1), el coeficiente de dispersión puede determinarse mediante la relación de alturas de la señal obtenida sin que exista dispersión y de la señal registrada en el fiagrama ordinario. De esta manera,

$$D_{\max} = \frac{k_0 \cdot H_0}{k_1 \cdot H_{\max}} \approx \frac{H_0}{H_{\max}} \quad \text{ecuación 1.4}$$

donde,  $k_0$  y  $k_1$  son las constantes de proporcionalidad que normalmente tienen el mismo valor ( $k_0$  y  $k_1$ ), ya que dentro del intervalo de concentraciones considerado no varía la relación entre la concentración y la altura de la señal. Por tanto, el coeficiente de dispersión puede considerarse como una relación de alturas (o señales).

En la figura 1.4 se explica el procedimiento experimental para la determinación de  $D_{\max}$  en un sistema FIA sencillo. En primer lugar, figura 1.4 (a), se inyecta el colorante en un canal portador y del fiagrama se obtiene una altura de pico,  $H$ . Se substituye el portador por la disolución de colorante que llena completamente el sistema, obteniéndose una señal constante con el tiempo, de la que se deduce la altura  $H_0$  que corresponde a la muestra sin diluir (figura 1.4 (b)).



**Figura 1.4** Determinación del coeficiente de dispersión, (a) H y (b)  $H_0$ .

De la definición se deduce que el coeficiente de dispersión es siempre un número superior a la unidad. Desde el punto de vista cualitativo cuanto mayor sea la dispersión (mayor dilución) más ensanchamiento de pico y menor altura de éste. En trabajos ordinarios,  $D_{\text{máx}}$  oscila entre 1 y 15. El coeficiente de dispersión es función de las condiciones hidrodinámicas y geométricas del sistema. Si aumenta el volumen inyectado disminuye la dispersión; si aumenta la longitud del tubo de reacción, la dispersión aumenta; y, si el caudal aumenta, la dispersión disminuye [Ruzicka y Hansen, 1980]. En resumen, cuanto mayor es la dispersión, menor es la altura de los picos (menor sensibilidad analítica) y mayor es el tiempo de retorno (menor capacidad de muestreo).

Cuando la señal analítica ( $H$ ) no está relacionada linealmente con la concentración (ecuación 1.1), la dispersión no puede evaluarse como la relación directa de las señales analíticas antes y después de la dispersión (ecuación 1.4). En la detección potenciométrica utilizando ESI, la respuesta es proporcional al logaritmo de la concentración del analito, según la ecuación de Nernst (§ 3.3.2). En este caso, la dispersión se calcula mediante la ecuación 1.5, [Alonso et al., 1984].

$$\log D = \frac{H_0 - H_{\text{máx}}}{S} \quad \text{ecuación 1.5}$$

donde,  $S$  es el valor experimental de la pendiente de la curva de calibración del detector (ESI), estimada inmediatamente antes de determinar la dispersión;  $H_0$  y  $H$  son respectivamente las alturas sin y dispersión en el sistema expresadas en mV.

### 1.3.3 Técnicas derivadas del FIA

Una de las características más importantes de la técnica FIA es su enorme versatilidad. Muestra de ello es la facilidad con que se pueden integrar dispositivos que realicen un pretratamiento de la muestra inyectada. El objetivo final de estos tratamientos es normalmente aumentar la selectividad y la sensibilidad del análisis. Las estrategias utilizadas son diversas e incluyen diálisis, difusión de gases, extracción con solventes, extracción en fase sólida, uso de reactores tubulares, etc., [Trojanowicz, 2000]. Como ejemplos prácticos de la utilización de estos tratamientos se podrían citar los esquemas de reacción con la presencia de columnas de destilación o extracción [Motomizu y Kobayashi, 1992], las cámaras de difusión en las que el analito contenido en una corriente portadora se difunde a través de una membrana hacia una corriente aceptora de reactivo [Kubán 1992; Tryzell y Karlberg, 1995], los lechos empaquetados con material sólido para realizar la conversión del analito presente en la muestra inyectada en un producto que posteriormente será detectado [Ukeda et al., 1995; Solé, 2000], los reactores en fase sólida [Luque de Castro, 1992], las columnas para la concentración/separación de analitos de características

tan diversas como tensoactivos iónicos y no iónicos [Martínez, 2002], metales pesados (Cadmio (II) [Couto et al., 1998] o Plomo (II) [Fonseca, 2003]) o ion fosfato [Ramon, 2003].

Dentro de la técnica FIA se ha producido también un desarrollo paralelo de técnicas asociadas como el flujo detenido, la técnica *sandwich* o las técnicas de gradiente [Hansen, 1995]. La técnica de flujo detenido presenta numerosas ventajas respecto a la metodología de flujo continuo. Los métodos basados en el flujo detenido pueden eliminar el ruido de fondo, aportar capacidad de diferenciación cinética y aumentar la sensibilidad. La ventaja directa es que los tiempos de reacción pueden ser aumentados sin necesidad de variar la longitud del tubo de mezcla o el caudal, que es el modo de operar en continuo. Además, permite la optimización de la relación de muestra y reactivo para obtener respuestas lineales con alta sensibilidad, disminuyendo el consumo de reactivo respecto al método en continuo. Sin embargo, y pese a todas estas ventajas, esta técnica no ha sido muy utilizada. De las 12000 referencias de análisis en flujo existentes en el año 2002, sólo 68 corresponden a flujo detenido [[www.flowinjection.com](http://www.flowinjection.com)]. Una de las razones que dificultan su uso es la necesidad de tener un control integrado del sistema, que asegure tiempos y períodos de parada reproducibles [Christian y Ruzicka, 1992], y la drástica disminución de la velocidad de muestreo.

La técnica *sandwich* se basa en la inserción de la muestra entre dos reactivos diferentes de modo que para volúmenes elevados de muestra y en condiciones de operación óptimas puede realizarse un análisis biparamétrico de la muestra obteniéndose dos señales separadas. Cada una de ellas corresponde a una interfase y da información sobre un analito distinto. Basado en este principio existen publicaciones recientes de análisis simultáneo de una muestra en dos intervalos de concentración diferentes. Esta determinación se realiza insertando una muestra entre dos secciones de disolución del mismo reactivo pero de distinta concentración. En función de la concentración de analito en la muestra, la información analítica se obtendrá de una u otra interfase. Aplicaciones de esta técnica son la determinación de Cromo (VI) en dos intervalos de concentración [Alonso et al., 1992] y el análisis de ion cloruro en aguas en un intervalo amplio de concentración [Araújo et al., 1992]. También se ha aplicado en la determinación simultánea de dos especies, como por ejemplo glucosa y glicerol mediante su degradación enzimática para formar un mismo producto coloreado que es detectado a la misma longitud de onda [Montesinos et al., 1991], o la determinación simultánea de especies catiónicas en agua [Araújo et al., 1995b]. Esta técnica también ha sido aplicada en técnicas de inmunoensayo como por ejemplo la determinación de inmunoglobulina G [Brandes et al., 1993; Yao y Ogawa, 2000].

Las técnicas de gradiente se basan en la explotación de los gradientes de concentración definidos por el proceso de dispersión a lo largo del bolo de muestra. Los gradientes de flujo han sido utilizados con propósitos diversos como determinaciones simultáneas, valoraciones o determinación de parámetros físico-químicos tales como la constante de Michaelis-Menten (por cambios en la concentración de substrato en el sistema) y caracterización de gradientes de concentración con el objetivo de establecer la relación de substrato que afecta a la reacción enzimática [Marcos et al., 1995].

#### **1.4 Análisis por inyección secuencial (SIA)**

El análisis por inyección secuencial (SIA) fue propuesto Ruzicka y Marshall en 1989 en los laboratorios del Centro para Procesos en Química Analítica (CPAC), de la universidad de Washington [Ruzicka y Marshall, 1990]. En ese momento el análisis por inyección en flujo (FIA) era la técnica más popular en la automatización de procedimientos analíticos. A pesar de ello, había dos inconvenientes destacables que limitaban el uso extensivo de la técnica FIA en la monitorización y control de procesos: el primero era la limitada versatilidad de la técnica, ya que los sistemas FIA son sistemas dedicados y por tanto es necesario un sistema para cada aplicación analítica y, segundo el elevado mantenimiento de las bombas peristálticas. Estas desventajas impulsaron el desarrollo de una técnica alternativa más simple, robusta y automática para la gestión de fluidos.

Como sistemas de impulsión alternativos para los sistemas FIA se han propuesto distintas opciones. Una sería el uso de bombas de alta presión o bombas de flujo sinusoidal. No obstante, el coste de las primeras para sistemas multicanales las hace inviables. Las segundas basadas en microburetas que utilizan un mecanismo circular de alta precisión para producir flujos sin pulsos, no son accesibles comercialmente.

La técnica SIA permite solventar estas limitaciones de la técnica FIA. Está basada en los mismos principios esenciales que su predecesora pero ofrece un mayor número de ventajas como son: una simplicidad instrumental aceptable, la comodidad y eficacia con la que las variables hidrodinámicas pueden ser controladas; un alto grado de flexibilidad; un menor consumo de reactivos; y un mantenimiento reducido. Estas ventajas han permitido la integración del SIA en laboratorios de investigación e industriales de análisis [Cladera et al., 1995]. Esta técnica no sólo aporta soluciones a los problemas de impulsión robusta, sino que permite avanzar en la tendencia hacia la miniaturización y capacidad de autoadaptación de los sistemas de flujo [Araújo et al., 1998].

Desde su implantación, la técnica SIA ha demostrado ser un instrumento versátil y de gran alcance para la automatización de procesos de análisis. Como muestra de su potencialidad, ésta técnica, combinada gran número de sistemas de detección (métodos electroquímicos,

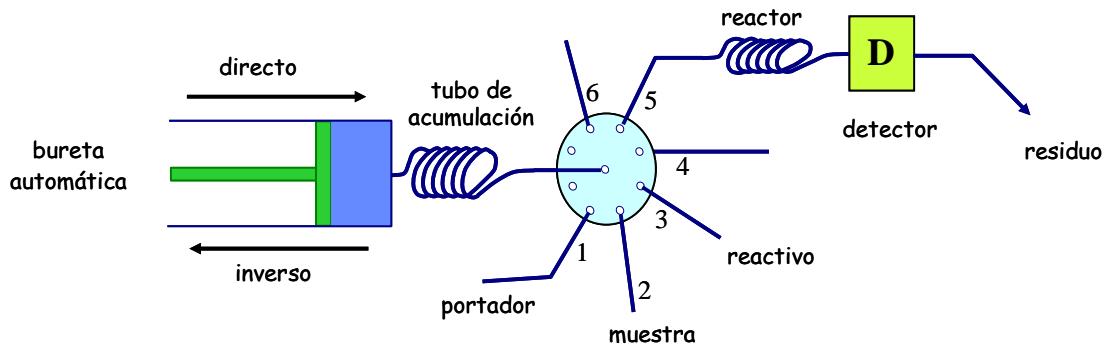
espectroscopia UV-visible o espectroscopia de luminiscencia), ha sido utilizada en áreas tan diversas como la supervisión de bioprocesos, el análisis medioambiental, el inmunoensayo, el análisis de alimentos y bebidas, el análisis farmacéutico o el análisis industrial [Lenehan et al., 2002].

#### 1.4.1 Concepto e instrumentación

Un avance lógico en el desarrollo de la metodología de inyección en flujo debe estar basado en el concepto de dispersión y penetración mutua de las zonas de muestra y reactivo. El fundamento del análisis por inyección secuencial se basa en la mezcla a través de la difusión y el flujo inverso de la muestra con uno o varios reactivos. La metodología SIA presenta numerosas ventajas gracias a la integración de dos elementos básicos: un sistema de aspiración-impulsión de fluidos, normalmente una microbureta, y una válvula selectora de seis o más canales. Mediante estos componentes puede realizarse la inserción secuencial de volúmenes prefijados de muestra y reactivo/os en el sistema. Simultáneamente, la microbureta es el elemento propulsor que gestiona los diferentes fluidos en el sistema. Las operaciones básicas comunes a todos los analizadores automáticos como son la inyección de muestra o reactivo, la mezcla de reactivo y muestra, el lavado y acondicionamiento del detector, pueden realizarse con un analizador de inyección secuencial.

Los analizadores SIA automáticos permiten ejecutar un número de movimientos de pistón preprogramados, sincronizados con las posiciones y movimientos de una válvula de selección multicanal. La técnica secuencial de inyección en flujo está basada en la medida de volúmenes exactos de solución portadora, de muestra y de reactivo, aspirados secuencialmente mediante una microbureta a través de una válvula selectora y reservados en un tubo de acumulación. Esta microbureta necesita un control preciso para ejecutar movimientos de impulsión o aspiración, parada o puesta en marcha de forma reproducible [Ruzicka, 1992; Christian, 1992]. El SIA es por tanto, en comparación con los procesos de análisis discontinuos o *batch*, la técnica que permite robotizar las metodologías de flujo continuo.

Los elementos principales de un sistema de inyección secuencial en flujo se muestran en la figura 1.5. Éstos son un tubo de acumulación, una microbureta automática, una válvula de selección multicanal, un tubo de reacción o reactor, un detector y un ordenador con un programa informático de gestión que permita el control integrado de todos los elementos y la adquisición de datos. El sistema de impulsión/aspiración de líquidos es una microbureta, que, en este caso, tiene dos funciones combinadas: (a) la medida precisa de volúmenes de reactivo y muestra, y (b) la impulsión/aspiración de líquidos en el sistema.



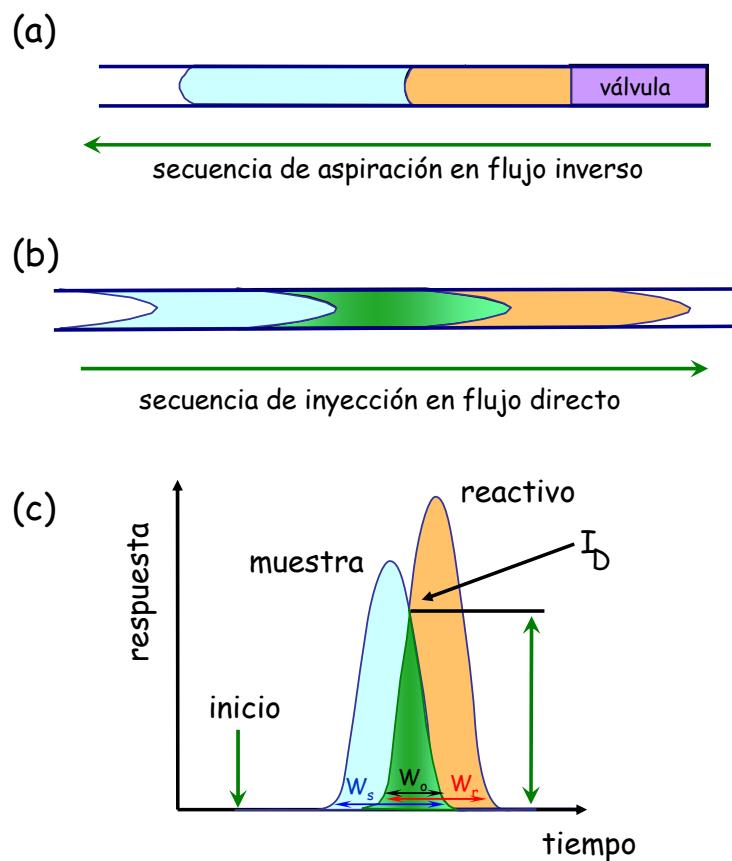
**Figura 1.5** Componentes básicos de un sistema de análisis por inyección en flujo.

Las características operacionales de los elementos que configuran un sistema SIA son las siguientes: válvula eléctrica selectora de seis/ocho vías, con dos sentidos de giro; microbureta de velocidad variable y lineal, equipable con jeringas de diferente volumen; un tubo de acumulación y un reactor de material inerte (tubos de teflón, PTFE). Como elementos de detección se pueden implementar, como en el FIA, técnicas instrumentales diversas, espectrofotométricas o electroquímicas y, finalmente un ordenador que gestiona todos los componentes con un programa diseñado para cada aplicación [Ruzicka y Marshall, 1990].

Como sistema propulsor también se han utilizado bombas peristálticas, aunque la microbureta es inherentemente más precisa que éstas. La desventaja de la microbureta es que ha de ser recargada con la solución de portador al comienzo de cada ciclo de medida, convirtiéndose en una operación adicional que disminuye la frecuencia de análisis. Otra desventaja del uso de microbureta es la limitación del volumen de carga, directamente relacionado con el volumen de la jeringa usada. Como ventaja, la rigidez del émbolo de la microbureta, evita su deformación con el uso continuado frente al desgaste de los tubos de bomba peristáltica. Este desgaste limita la capacidad de aspirar disoluciones de forma altamente reproducible durante períodos de uso continuado [Ivaska y Ruzicka, 1993; Gómez et al., 1995]. Recientemente, la empresa GlobalFIA ha desarrollado una bomba pistón de desplazamiento positivo (MilliGAT pump) diseñada específicamente para su utilización en FIA/SIA. Permite trabajar sin flujo pulsante a caudales del orden de  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  a  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , sin necesidad de emplear jeringas, válvulas de tres vías y sistemas de eliminación de pulsos. Alternativamente, Liu y Dasgupta [1992; 1994] y Vieira et al. [2001] respectivamente han utilizado flujo electroosmótico y flujo basado en la gravedad. No obstante, la mayoría de investigadores ha empleado la microbureta o las bombas peristálticas.

En la figura 1.6 se muestran las etapas de operación necesarias en la realización de un análisis por inyección secuencial. La primera etapa del proceso (a) es la aspiración de

muestra y reactivo hacia el tubo de acumulación a través de la válvula selectora, obteniéndose una secuencia de zonas bien definidas. A continuación la válvula selectora cambia de posición y se comunica con el detector, y en una segunda etapa (b), la secuencia acumulada de muestra/reactivo es impulsada hacia el detector en sentido de flujo directo. Durante este movimiento, el flujo crea un gradiente complejo de concentración. Las zonas de muestra y reactivo, forzadas por la dispersión axial y radial, se encuentran mutuamente interpenetradas, formando una región en la que el analito se está transformando en una especie detectable. La señal transitoria suministrada por el detector se muestra en el área sombreada (c).



**Figura 1.6** Etapas básicas en un sistema de análisis por inyección secuencial. (a) Secuencia de las zonas aspiradas de muestra y reactivo hacia el tubo de acumulación, (b) perfil de concentración de producto que llega al detector y (c) respuesta obtenida por el solapamiento de zonas.

De forma detallada, un ciclo completo de análisis por inyección secuencial, consiste en las siguientes operaciones (figura 1.6 (a) y (b)):

- 1) aspiración del portador con la válvula de selección en posición 1, el pistón de la microbureta hace una aspiración grande en sentido inverso,
- 2) aspiración de la muestra con la válvula en posición 2, el pistón hace una aspiración corta en sentido inverso,

- 3) aspiración del reactivo con la válvula en posición 3, el pistón realiza una aspiración pequeña en sentido inverso,
- 4) el pistón se mueve en sentido directo con la válvula en posición 5, y mediante un movimiento de pistón controlado, la zona de muestra y reactivo es enviada al detector a través del reactor impulsada por la solución portadora y de lavado.

Adicionalmente, si se realiza una determinación de flujo detenido deben realizarse los siguientes pasos:

- 5) la zona de muestra y reactivo se detienen en el detector para registrar la respuesta cinética,
- 6) después de transcurrido un tiempo predeterminado, la muestra y reactivo son impulsados por el portador a través del canal de flujo mediante un movimiento de pistón. Cuando la cinética de la reacción es rápida, el paso 5 puede ser omitido.

Si son necesarios dos o más reactivos pueden utilizarse canales adicionales de la válvula selectora para su introducción. Análogamente, el sistema puede ser autocalibrado con facilidad, utilizando otros canales de la válvula selectora para la aspiración de soluciones patrón. Este ciclo básico puede realizarse también utilizando como sistema de impulsión una bomba peristáltica [Christian, 1992].

La exacta reproducibilidad de la zona de dispersión es igual de importante en SIA que en FIA. Por consiguiente, la secuencia de zonas aspiradas de muestra/reactivo y la dispersión mutua de éstas son claves de la operación en SIA. La dispersión ha de ser adecuada para obtener el grado suficiente de penetración de las zonas de muestra y reactivo. La dispersión será función de la relación de volúmenes y del grado de penetración de las dos zonas. Análogamente al FIA convencional, la dispersión de la zona de muestra debe ajustarse en función a los requerimientos de la medida a efectuar. Para medidas directas con sensores (por ejemplo pH o conductividad), es necesario que la dispersión sea mínima ( $D \rightarrow 1$ ). Para reacciones químicas con detección colorimétrica, fluorimetría, o quimioluminiscencia, las zonas de interfase de reactivo/muestra deben mezclarse en una proporción conveniente, siendo necesaria una dispersión media ( $D=2-10$ ). Para ajustar el rango de concentraciones en muestras concentradas son necesarias diluciones grandes, lo que implica usar sistemas que presenten valores de dispersión elevados ( $D>10$ ).

En la técnica SIA, el coeficiente de dispersión de la muestra,  $D_s$ , ha sido definido como la relación entre la concentración de la muestra en el sistema antes ( $C_s^0$ ) y después ( $C_s$ ) que el proceso de dispersión haya transcurrido, donde  $C_s$  es la concentración en el elemento de

fluido en el momento de la lectura. Por tanto, el coeficiente de dispersión viene determinado por la ecuación,

$$D_s = \frac{C_s^0}{C_s} \quad \text{ecuación 1.6}$$

Análogamente, se ha definido la dispersión para el reactivo (ecuación 1.7) como,

$$D_r = \frac{C_r^0}{C_r} \quad \text{ecuación 1.7}$$

Estas sencillas relaciones permiten estimar las concentraciones de reactivos y muestra en la zona de mezcla.

El solapamiento de zonas es un proceso muy importante en la técnica SIA, ya que para determinaciones con reacción química define la zona de interdispersión mutua de muestra y reactivo. Resulta evidente la importancia de identificar estas zonas, donde el valor de  $D_s$  deberá ser mayor que 2, y donde, al mismo tiempo, deberá haber un exceso de reactivo. Para una reacción sencilla con un solo reactivo, dos zonas, una de muestra y otra de reactivo, y una única interfase de contacto son suficientes (figura 1.6). Dos reacciones químicas requerirán tres zonas, dos de reactivo y una de muestra y dos interfases de contacto, etc. Obviamente, es factible definir un parámetro que establezca el grado de interpenetración mutua de las zonas con el objeto de determinar el tiempo necesario para obtener una señal representativa.

Por analogía con la definición en cromatografía, el concepto de zona de penetración o solapamiento puede ser utilizado aquí (figura 1.6 (c)) y vendría determinado por la ecuación 1.8,

$$P = 2W_0(W_s + W_r) \quad \text{ecuación 1.8}$$

donde,  $W_r$ ,  $W_s$  y  $W_0$  son respectivamente las anchuras correspondientes a reactivo, muestra y zona de solapamiento. Para un valor de  $P=1$  y 0 se obtienen, respectivamente, solapamientos máximo y nulo. Para valores entre 0 y 1 se obtienen solapamientos parciales.

Cabe destacar que cuando el solapamiento no es total, se observa la aparición de un punto de isodispersión  $I_D$ , donde la dispersión de la muestra y el reactivo son idénticas e independientes de la concentración (figura 1.6 (c)). El elemento de fluido correspondiente a  $I_D$  está determinado por la relación de concentraciones muestra/reactivo y es la misma que en la inyección, por tanto  $C_s/C_r=C_s^0/C_r^0$  y ambos están igualmente dispersos. Esta

dispersión describe solamente el proceso físico. Si existe reacción química, la relación de concentraciones es distinta. En el caso de una reacción completa y cuando existe una concentración equivalente de muestra y reactivo, el máximo de señal analítica corresponde al punto de isodispersión. En general, la cantidad de reactivo siempre es mayor que la de muestra y el punto del máximo no coincide con  $I_D$ , debido a que la relación  $C_r^0/C_s^0$  es mayor de 1. Este desplazamiento continúa hasta que se igualan los gradientes de concentración de muestra y reactivo. Como el modelo no considera la cinética de la reacción, la posición de  $I_D$  en el tiempo sólo informa del efecto asociado a variaciones de concentración en la zona de solapamiento y de la sensibilidad de la determinación [Gübeli et al., 1991b].

El volumen de inyección de muestra es el parámetro fundamental en la optimización de sistemas de flujo basados en la técnica SIA. Se puede considerar que la porción de muestra inyectada se divide en  $N$  diferentes etapas de mezcla cuando es inyectada en el sistema de flujo. Para cada una de estas etapas y utilizando un modelo de tanques en serie, se encuentra que:

$$C_{máx}/C_0 = 1 - \exp\left(-0,693S_v/S_{1/2}\right) \quad \text{ecuación 1.9}$$

donde,  $S_v$  es el volumen inyectado de muestra y  $S_{1/2}$  es el volumen necesario para obtener  $D_{max} = 2$ , siendo  $D_{max}$  la dispersión en el elemento de fluido correspondiente al máximo del pico. Para un número grande de etapas ( $N$ ) de mezcla, la forma de señal obtenida se aproxima a un pico gaussiano. En esa situación, la ecuación 1.9 se reemplaza por la función de error (ecuación 1.10) y cuando  $S_v$  es igual a  $S_{1/2}$  se tiene:

$$S_{1/2} = \left( V_r/2 \right) \left( N/2\pi \right)^{1/2} \quad \text{ecuación 1.10}$$

donde,  $V_r$  es el volumen del reactor.

Para valores de  $N$  entre 1 y 10, la dispersión en un sistema de flujo responde a una serie de curvas que cuando aumenta  $N$  muestran que  $S_v < S_{1/2}$ , es decir  $D > 2$ . La altura de pico normalizada ( $C/C_0$ ) incrementa linealmente con el volumen de muestra inyectado [Ruzicka y Hansen, 1988]. También es importante el parámetro  $S_{1/2}$  de las ecuaciones 1.9 y 1.10, ya que describe la zona de dispersión en un sistema de inyección en flujo que es función de la geometría y el tipo de flujo, determinando el ensanchamiento del pico.

El objetivo básico de la técnica SIA es conseguir un adecuado control de la penetración entre zonas por medio de la dispersión axial ya que la dispersión radial es mínima cuando

el flujo es laminar. Los factores de que depende ésta son los parámetros físicos y geométricos que definen el sistema y las relaciones de volúmenes de reactivo/muestra escogidas.

En un estudio de los factores que afectan a la dispersión en la técnica SIA, Gubeli et al. [1991b] observaron que la sensibilidad aumenta cuando el volumen de muestra era superior a  $S_{1/2}$ ; sin embargo, un aumento mayor no provocaba mejora. También, demostraron que, para reacciones químicas con un solo reactivo, los mejores resultados se obtenían cuando el volumen de reactivo es el doble que el de muestra, mientras que el volumen total debe ser menor o igual a la mitad de  $S_{1/2}$ . Para las reacciones químicas con dos reactivos, concluyeron que el volumen de muestra debe ser menor que  $S_{1/2}$  y la concentración el reactivo debe ser suficientemente alta. También observaron que el flujo inverso da lugar a una mayor dispersión y a un ensanchamiento creciente de la señal.

Los parámetros físicos que definen la zona de penetración mutua de reactivo y muestra son las dimensiones del tubo de acumulación, de la válvula de selección y del reactor. Los caudales de aspiración e impulsión son también variables que definen el grado de penetración en un tiempo determinado. Marshall y van Staden [1992] han realizado estudios de la influencia de estos parámetros en sistemas sin reacción química utilizando un colorante, azul de bromotimol. También se ha estudiado el fenómeno en sistemas con reacción química y la influencia de la fuerza iónica [Cladera, 1996]. En este último caso, la optimización de los parámetros físicos en el sistema SIA se ha realizado mediante el método simplex, utilizando la reacción modelo de Fe (II) con la *o*-fenantrolina.

Van Staden et al. [1997] han estudiado también el efecto de la relación de volúmenes y de la introducción de cámaras de mezcla [McCormack y van Staden, 1998] y de reactores empaquetados en la dispersión; sus resultados verificaron que tanto la secuencia de aspiración como la cinética de reacción son importantes en la optimización de la técnica SIA. Como era de esperar, el tipo, posición, y volumen de la cámara de reacción también afectan al nivel de dispersión.

Los términos definidos anteriormente para caracterizar la zona de penetración ( $D$ ,  $S_{1/2}$ ,  $P$ ) han proporcionado una descripción limitada al proceso físico de la dispersión. No se ha considerado la participación de la reacción química, por lo que es esencial una optimización rigurosa de todos los parámetros para cada método analítico concreto.

#### **1.4.2 Aplicaciones y perspectivas del SIA**

La técnica de inyección secuencial es instrumentalmente más simple, y a la vez más compleja, que la de inyección en flujo convencional. Para su implementación sólo es

necesaria una microbureta y una válvula selectora, pero requiere un diseño especial de *hardware* y programación que permita el control automático de todos los elementos del sistema. El diseño del sistema de flujo no tiene que ser reconfigurado para variar los volúmenes inyectados, los tiempos de reacción o las zonas de dispersión mutua. Todos estos parámetros pueden ser modificados fácilmente a nivel de programación, mediante cambios en los volúmenes, en los caudales de aspiración, o en los caudales de impulsión, o variando el tiempo de parada en flujo detenido. Todas estas operaciones pueden ser ejecutadas mediante instrucciones del programa de gestión. En el sistema también pueden utilizarse reactivos adicionales, reactores y detectores conectados a la válvula de selección (el límite aparente está en el número de canales disponibles). De este modo pueden integrarse múltiples de determinaciones y tipos de detección en un sistema por inyección secuencial.

La potencialidad y versatilidad de la técnica de análisis por inyección secuencial es todavía un campo a explorar. La mayoría de operaciones básicas en disolución automatizadas en FIA pueden en principio ser adaptadas a la metodología SIA [Guzman et al., 1993]. En el desarrollo de un sistema de inyección secuencial es imprescindible disponer de unos componentes de *hardware* adecuados, un ordenador y un programa diseñado para la aplicación concreta. En este sentido, el diseño de un programa flexible y amigable con el usuario es la tarea más complicada [Ruzicka, 1992].

De lo dicho anteriormente se puede deducir que una de las limitaciones más importantes en la aplicación de la técnica SIA ha sido el desarrollo de los programas de control necesarios para la gestión integrada de todos los elementos del sistema. Mientras que en el FIA puede operarse manualmente y la adquisición de datos puede incluso realizarse con registradores analógicos, en la técnica SIA es necesario un control de tiempos estricto, así como una sincronización total entre las acciones del sistema de impulsión y de la válvula selectora, que permitan realizar de un modo preciso y reproducible la inyección de la muestra, la gestión de flujos o la adquisición de datos. Todas estas acciones y tiempos de ejecución forzosamente han de ser ordenados desde un programa elaborado especialmente para la aplicación, en muchos casos desarrollado por el propio usuario para la instrumentación concreta de la que dispone. Guzman y Compton [1993] resaltan que la escasez de programas comerciales ha sido un factor limitante en el desarrollo del SIA.

Aunque algunos investigadores han desarrollado sus propios programas escritos en distintos lenguajes, como Turbo C++, Visual Basic, Basic, Windows 95 medioambiental, y LabVIEW, sólo tres artículos hacen especial hincapié en el programa de control y adquisición de datos desarrollado para la aplicación de la técnica SIA [Lenehan et al., 2002]. Recientemente, ha disminuido la necesidad de elaborar un programa específico para

la aplicación, ya que existen programas comerciales versátiles aunque asociados a una instrumentación muy concreta [www.globalfia.com; www.flowinjection.com].

Existe una gran diversidad de aplicaciones implementadas mediante la técnica de inyección secuencial, análogas a las implementadas en la técnica de inyección en flujo. En ellas se incluyen pretratamientos de muestra, técnicas derivadas y múltiples sistemas de detección. Entre las estrategias de pretratamiento de muestra aplicadas se encuentra la preconcentración [Oms et al., 1996a], la extracción líquido-líquido [Luo et al., 1996; Nakano et al., 1997; Peterson et al., 1997; Wang y Hansen, 2002], la extracción sólido-líquido [Grate y Taylor, 1996] y también la descomposición de la muestra en línea mediante microondas [Oliveira et al., 2000], así como la difusión gaseosa [Oms et al., 1996b; Luo et al., 1995] o la difusión mediante una celda especial llamada celda de difusión Franz (*Franz diffusion cell*, FDA) [Solich et al., 2003]. Satínský et al. [2003] han realizado la integración de columnas monolíticas en sistemas SIA. Estas columnas están basadas en la nueva tecnología sol-gel y presentan una mayor porosidad que las columnas de cromatografía líquida de alta presión. Estos investigadores han optimizado y validado un sistema de inyección secuencial cromatográfico (*Sequential Injection Chromatography*, SCI). Recientemente, Segundo et al. [2004] han publicado un *review* sobre los distintos sistemas SIA propuestos para análisis de rutina en vinos basados en distintos pretratamientos.

También han sido implementadas variantes de la técnica de FIA como la técnica *sandwich* [Estela et al., 1996; Rumori y Cerdà, 2003], el flujo monosegmentado [Vieira et al., 1998; Silva y Masini, 2002] y la técnica de flujo detenido aplicada en ensayos enzimáticos [Ruzicka y Gübeli, 1991; Guzman y Compton, 1993; Schindler et al., 1998; Segundo y Rangel, 2003] y en la monitorización de fermentaciones [Cheng et al., 1992]. La técnica del flujo detenido fue la primera aplicación implementada en SIA por dos razones obvias: (a) la idea de inyección secuencial proviene de traspasar el concepto de inyección en flujo desde el flujo continuo hasta el dominio de flujo detenido [Christian, 1992] y (b) la instrumentación y programación, necesarios en la técnica de inyección secuencial, son muy útiles en la implementación de la técnica de flujo detenido, debido a la existencia de un programa de control del sistema y de tiempos de operación.

La técnica SIA ha sido aplicada frecuentemente en la monitorización de parámetros medioambientales [van Staden y Taljaard, 1998; Cerdà et al., 2001] y procesos biotecnológicos [Cheng et al., 1991; Olsson et al., 1998]. Los avances recientes en biotecnología han hecho necesario el desarrollo de métodos analíticos que rápida y sistemáticamente faciliten medidas cuantitativas en tiempo casi real de los parámetros clave del proceso [Baxter y Christian, 1996]. En este sentido, el análisis por inyección

secuencial ha tenido un gran impacto [Cheng et al., 1992; Schuhmann et al., 1995] como es evidente por el número de publicaciones existentes, especialmente en la monitorización *online* de biomasa [Baxter et al., 1994], aminoácidos [Lukkari et al., 1993], fuentes de carbono [Min et al., 1995; 1996; Shu et al., 1995], fuente de fósforo [Masini y col, 1995], o detección simultánea de dos productos como glucosa y penicilina [Min et al., 1996] o glucosa y biomasa [Baxter et al., 1995]. Las razones fundamentales que han potenciado su aplicación son la eliminación del paso de preparación de la muestra y la disponibilidad de información en tiempo real, incrementando así la efectividad de la monitorización.

Actualmente la técnica SIA está consolidada como una herramienta más en la automatización de procedimientos de análisis, la evidencia está en los 200 artículos publicados desde su aparición hasta el año 2002. La técnica SIA ha sido aplicada en múltiples campos entre los que se encuentran los análisis de alimentos [Oliveira et al., 2000], monitorización de procesos [Lukkari et al., 1995], inmunoensayo [Ruzicka, 1994] y bioanálisis [van Staden y McCormack, 1998], análisis farmacéuticos [Sultan y Desai, 1998; Kubiak et al., 2001; Araújo et al., 1997] análisis medioambiental [Alpizar et al., 1996], combinación con las técnicas quimiométricas en la determinación multiparamétrica [Ruisánchez et al., 1994; Schindler et al., 1998] y, análisis y control de procesos industriales [van Staden y Taljaard, 1996; 1997]. Otras aplicaciones de la técnica SIA son las basadas en micropartículas (*bead injection*, BI) [Ruzicka y Scampavia, 1999], aplicaciones diversas como valoraciones [Alerm et al., 1996; Sultan et al., 1999], modelización medioambiental [Kinas et al., 2000] y estudios cinéticos [Taljaard y van Staden, 1998; Sultan et al. 1998] o de estequiometría [Suliman y Sultan, 1996]. Lenehan et al. [2002] han publicado recientemente un *review* muy interesante sobre la técnica de análisis por inyección secuencial en donde se detallan todas las aplicaciones realizadas hasta el año 2002 clasificadas por su campo de aplicación y la técnica instrumental de detección usada.

Recientemente, la continua evolución de las técnicas de flujo ha llevado también a la propuesta de nuevos conceptos basados en la idea inicial de manipulación e integración de la técnica SIA. Estos son el laboratorio en una válvula (*Lab-on-Valve*, LOV) propuesto por Ruzicka y una nueva variante para la manipulación de fluidos llamada zona fluídica (*Zone Fluidics*, ZF) propuesta recientemente por Marshall et al. [2003] Ambos representan dos estrategias alternativas para el desarrollo de sistemas de gestión de fluidos más complejos e integrados.

El primer concepto LOV [Ruzicka, 2000] se basa en la integración de todas las etapas necesarias para el análisis en la válvula selectora, normalmente como sistema de detección se utiliza la espectrofotometría o luminiscencia utilizando fibra óptica. La gestión de

fluidos se realiza mediante microburetas automáticas muy precisas, de 500 o 100  $\mu\text{l}$ , y bombas peristálticas. Esta alternativa ha sido utilizada por Ampan et al. [2003] para la determinación de plomo. Wang et al. [2003] han utilizado también un sistema de inyección secuencial basado en LOV para la automatización del proceso de extracción y preconcentración de ultratrazas de metales pesados usando microcolumnas renovables.

La ZF está definida por una zona controlada física y químicamente, que permite la manipulación dinámica de líquidos inmiscibles y de sólidos en suspensión en un conducto reducido con el objetivo de acondicionar la muestra y realizar su análisis [Marshall et al., 2003]. El objetivo principal de ZF es obtener una especie detectable y para ello se utilizan distintas operaciones unitarias, extracción con solventes, filtración, dilución, enriquecimiento, intercambio iónico, destilación, hibridación y reacción. Los componentes básicos de este sistema son iguales a los sistemas SIA, el elemento central es la válvula selectora de multiposición y la gestión de fluidos se realiza mediante una bomba bidireccional a un tubo de acumulación. ZF representa una alternativa viable a la automatización de procesos analíticos complejos frente a la robótica de mayor y coste y complejidad. Utiliza el mismo concepto utilizado en robótica donde las muestras son trasladadas de una a otra estación de trabajo. En este sentido, ZF es un tipo de robot de fluidos donde se traslada la muestra de un elemento a otro mediante movimiento de fluidos. La innovación de esta técnica es que integra, en un sistema SIA, elementos que permiten la manipulación de todo tipo de muestras, líquidas, aerosoles o suspensiones que contengan células o sólidos.

Por tanto, la tendencia actual en la técnica SIA (1990), igual que su predecesora la FIA (1975), es el desarrollo de sistemas automatizados con una clara tendencia a la integración y miniaturización, con el objetivo final de desarrollar sistemas de análisis en flujo de mayor robustez, portabilidad, adaptabilidad y versatilidad.

## **1.5 Microsistemas de análisis**

La creciente demanda de información en el ámbito de la monitorización medioambiental a o de procesos, así como el endurecimiento de la legislación en este ámbito ha planteado nuevos retos en el área de la instrumentación analítica. Hay que destacar la obtención de información espacial y temporal de procesos medioambientales clave, o en el ámbito de la salud, la delimitación de factores de riesgo tanto para la salud como para el medioambiente, de actividades industriales.

Dar salida a estos nuevos retos exige un nuevo tipo de instrumentación analítica alejada de los estándares actuales que conjugue la potencialidad de los métodos instrumentales sofisticados del ambiente controlado de un laboratorio, con la robustez, sencillez

operacional, portabilidad y tamaño reducido que permita su implementación como herramientas para obtener información distribuida espacial y temporalmente, en todo tipo de sistemas y entornos.

La fusión del concepto tecnológico de integración, procedente del campo de la microelectrónica, con el definido dentro del marco de la química analítica, ha permitido abordar las necesidades expuestas, revolucionando la investigación dirigida a solucionar este problema. Así, la conjunción del binomio miniaturización-integración ha permitido establecer la base para el desarrollo de una nueva generación de instrumentos constituidos por dispositivos miniaturizados, capaces de integrar todas las etapas necesarias para la realización del análisis químico.

Como paso previo a esta implementación, o materialización práctica, este nuevo planteamiento obliga a la realización de grandes esfuerzos de colaboración e innovación interdisciplinaria cooperativa entre numerosas áreas de investigación, como son la química, la biología, la microelectrónica, la informática, la óptica, los nuevos materiales, la mecánica de fluidos o la microfabricación.

La multiplicidad de componentes claves, tanto activos como pasivos, que es necesario desarrollar *ex-novo* para conseguir una integración total efectiva de las diferentes etapas del procedimiento analítico, ha ralentizado la consecución de los objetivos planteados, reflejando de esta manera, las dificultades inherentes a la obtención de instrumentación analítica miniaturizada.

Entre los elementos funcionales necesarios para dar solución a un intervalo lo más amplio posible de problemas analíticos, habría que destacar las estructuras de gestión de fluidos, así como las conexiones, los elementos de impulsión, dosificación e inyección de fluidos, válvulas, reactores, filtros, elementos de separación y/o preconcentración, microsensores físicos y químicos, emisores detectores de radiación, guías de onda, etc. La diversidad de estos elementos permite visualizar, claramente, la interdisciplinariedad del área de investigación y la necesaria implicación de científicos e ingenieros, de numerosas y diferentes disciplinas.

Hasta el momento, aún que se hayan conseguido importantes avances en el desarrollo de microsensores como elementos de detección y estructuras de soporte para microfluídica, aún queda un largo camino para recorrer en el desarrollo de microactuadores (bombas, válvulas, conmutadores, etc.) capaces de gestionar los fluidos dentro de las mencionadas estructuras.

Por otro lado, el escalado de las operaciones unitarias de los procesos implicados en el procedimiento analítico, así como de las reacciones químicas y biológicas utilizadas en el reconocimiento iónico y/o molecular, son también áreas de gran esfuerzo investigador.

A pesar de las dificultades encontradas, se han diseñado sistemas híbridos incorporando elementos con diferente grado de miniaturización en función de su disponibilidad, que ya han demostrado una gran potencialidad de esta tecnología de fabricación [Tamaña et al., 2002]. Estos sistemas han permitido visualizar claramente algunas ventajas del binomio miniaturización-integración, como son: el bajo coste/fabricación masiva, la reducción tanto del consumo de muestra y reactivos como de la generación de residuos, el incremento de la velocidad de análisis, diseño compacto, robustez, sencillez operacional, portabilidad, conectividad entre diferentes unidades, etc. Adicionalmente, estos sistemas híbridos han dado lugar a nuevas técnicas y métodos, sólo viables al reducir las dimensiones espaciales, y han facilitado el estudio de nuevos fenómenos, cuya la explotación práctica solo es posible en un entorno miniaturizado [van der Woerd et al., 2003].

### **1.5.1 Sistemas de gestión de fluidos miniaturizados**

Las posibilidades analíticas que se derivan de la integración de las etapas de preparación de la muestra, separación y detección en una sencilla unidad miniaturizada, ha conducido al concepto de microsistemas de análisis total (*micro-total analysis systems*,  $\mu$ TAS) [Manz et al., 1990] o laboratorio en un chip (*Lab-On-Chip*, LOC), donde módulos diseñados como microdispositivos, que no requieren de asistencia externa (programa, bombas o controles) excepto de una fuente de energía, son integrados en un chip. Esta es un área interdisciplinaria en continuo desarrollo y estudio, que incluye ciencias y técnicas tan diversas como los sistemas microelectromecánicos (*Microelectromechanical Systems*, MEMS), microfluídica, óptica, química, bioquímica, biología molecular o procesos de separación, entre otros.

#### *1.5.1.1 Técnicas de fabricación*

Muchas de las técnicas y materiales utilizados para la obtención de sistemas miniaturizados de gestión de fluidos provienen de la tecnología de microfabricación de sistemas microelectromecánicos (MEMS), usados tradicionalmente en la industria del circuito integrado (IC). El campo dentro de la microelectrónica dedicado a los MEMS ha ampliado su ámbito de aplicación hacia la microfluídica y ha continuado evolucionando y, refinando otros procesos de microfabricación e incorporado nuevos materiales.

Inicialmente y para la fabricación de los elementos de microfluídica, se utilizaron las técnicas fotolitográficas desarrolladas para el silicio, en los años 70, por la industria microelectrónica. Sin embargo, el silicio presenta la desventaja que es un material poco versátil, exige una elevada inversión inicial en infraestructuras y presenta tiempos de fabricación bastante elevados. Además, su opacidad en la región del UV-vis del espectro electromagnético dificulta la integración de sistemas de detección óptica. Esta situación se ha solventado, en algunos casos, mediante la incorporación de una ventana en el dispositivo de silicio, sellada posteriormente con un vidrio pirex. En consecuencia, la utilización del silicio como único material base de fabricación limita enormemente las posibilidades de diseño de los dispositivos. Este hecho ha dado un enorme impulso al estudio de materiales alternativos, básicamente poliméricos. El uso de estos nuevos materiales ha impulsado, a su vez, el desarrollo paralelo de nuevas técnicas de fabricación. En la tabla 1.1 se muestra un resumen de los procesos y materiales más utilizados actualmente.

**Tabla 1.1** Técnicas principales de fabricación utilizadas para la producción de microsistemas [Ehrfeld et al., 2000].

| Técnicas de microfabricación  | Substrato  |
|---|--|
| <b>Técnicas fotolitográficas</b>  |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>wet and dry etchings</i></li> <li>• <i>rayos-X y procesos LIGA</i></li> </ul> | silicio, cristal, polímeros<br>metales, polímeros, cristal, cerámica |
| <b>Microfabricación directa</b>   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>ablation laser</i></li> <li>• <i>powder blasting</i></li> </ul>               | materiales que forman enlace mediante irradiación UV                 |
| <b>Técnicas de replicación</b>  |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>hot embossing</i></li> <li>• <i>injection moulding</i></li> </ul>             | polímeros, cerámica, metales y polímeros híbridos                    |

Normalmente, una vez elaborado el dispositivo con diferentes substratos como silicio, vidrio, metal o polímeros, estos se pueden unir entre si a través de varios procesos (enlace por fusión, anódico, eutéctico y adhesivo). La unión se hace normalmente para alcanzar una estructura que sea difícil o imposible formar de otra manera o también para aportar solidez y protección mecánicas.

El desarrollo de la tecnología MEMS ha contribuido significativamente a la mejora de técnicas de microfabricación para otros materiales distintos al silicio. Dos ejemplos a resaltar son la técnica LIGA y el moldeado plástico para estos nuevos materiales. LIGA es el acrónimo alemán de litografía (*lithographie*), electrochapado (*galvanoformung*) y moldeado (*abformung*). Es un proceso que combina películas gruesas (*thick-film*) extremadamente resistentes y litografía de gran energía (Rayos-X). Esta tecnología permite el uso de cualquier material superficial conductor. El moldeado por inyección se utiliza con

elastómeros como poli(dimetilsiloxano) (PDMS) y otros polímeros. Una de sus principales ventajas es que resulta una técnica muy económica ya que pueden fabricarse muchos componentes con un simple molde [Judy, 2001]. La construcción de dispositivos de PDMS mediante técnicas litográficas suaves también ha sido estudiada recientemente [Lacher et al., 2001].

En la elaboración de dispositivos de microfluídica usando otros polímeros, las técnicas aplicadas han sido distintas (tabla 1.1). Por ejemplo metodologías como *hot embossing* y polimerización en plasma, han sido extensamente utilizadas para polimetil metacrilato (PMMA), poliestireno (PS) y policarbonato (PC) [Sequeira et al., 2002a].

Todos los métodos de fabricación descritos hasta el momento requieren la necesidad adicional de la post fabricación del dispositivo para formar una estructura sellada. Este inconveniente es más fácil de solucionar para dispositivos construidos con polímero que cuando se trata de silicio o vidrio. Los microcanales construidos con polímero se pueden aislar usando unión térmica a baja temperatura. Los polímeros elastoméricos como PDMS presentan además una adherencia excelente a una gran variedad de substratos de distintos materiales y se pueden utilizar para obtener microestructuras cerradas no permanentes [Wang y col, 2002].

Otro problema existente es el ensamblado de distintos elementos en el dispositivo de microfluídica. Aunque distintas soluciones de sellado, como el uso de colas epoxídicas o de juntas simples, son posibles, todos los métodos ensayados presentan algún problema. La exposición prolongada a los ambientes acuosos, puede producir daños en las uniones y provocar escapes en los empalmes entre los componentes hidráulicos y ópticos. Los epóxidos permiten un enlace permanente entre los componentes (silicio y vidrio), pero existe el problema de la obstrucción en el canal de flujo durante el proceso de unión si se utiliza un exceso de epóxido [Leatzow et al., 2002].

Resulta evidente, por tanto, la necesidad de una técnica que permita la fabricación de sistemas de microfluídica tridimensionales complejos a bajo coste y en poco tiempo, sin la necesidad de laboratorios y condiciones de trabajo especiales como las que encontramos en las salas blancas. Una alternativa es el uso de cerámicas de baja temperatura de sinterizado (LTCC) que permiten la construcción de dispositivos integrados en tres dimensiones (3D) a escala meso y coste reducido.

#### *1.5.1.2 Materiales*

Los dispositivos producidos en vidrio han sido muy utilizados debido su versatilidad y resistencia química, la relativa simplicidad de su fabricación, así como su aplicabilidad en

la detección óptica. Sin embargo, uno de los problemas que plantea su uso es la dificultad para producir prototipos de forma rápida a un coste asequible [McCreedy, 2001].

Actualmente, el uso de nuevos materiales, preferentemente polímeros ópticamente transparentes y materiales inertes tanto interna como externamente, está en rápida expansión, especialmente en aplicaciones medioambientales. La elaboración de microestructuras de gestión de fluidos en polímeros presenta ventajas frente a la tecnología del silicio o vidrio, que incluyen un procedimiento sencillo, alta velocidad de fabricación, y disminución de coste tanto en el primer prototipo como en la producción posterior [Sequeira y col, 2002a]. Además deben tener propiedades térmicas y eléctricas idóneas, y permitir el enlace con otros materiales para aplicaciones concretas. El menor coste de los dispositivos obtenidos con este tipo de materiales permite por tanto, la producción en masa de dispositivos desechables en el campo de la medicina y la genética.

Polímeros como PMMA, PS y PC son fácilmente moldeables y pueden utilizarse como materia prima en la elaboración de dispositivos utilizando distintas técnicas de microfabricación. Para el uso de estos materiales es muy importante que sean químicamente inertes. Deben ser resistentes a medios ácidos, básicos y a disolventes orgánicos.

El PMMA es amorfo, transparente e incoloro, resiste a la abrasión y a la radiación UV, pero tiene una baja resistencia a los disolventes orgánicos. El PS tiene propiedades físicas similares y puede ser esterilizado por radiación, pero tiene baja resistencia química. El PC ha sido muy utilizado en dispositivos médicos ya que es esterilizable y presenta una buena estabilidad bidimensional, pero presenta una baja resistencia química.

Las propiedades físicas y químicas del PDMS, lo hacen especialmente útil en la construcción de dispositivos con aplicación final en el campo de la biología y la medicina [Andersson y van den Berg, 2003], debido a su nula toxicidad. Además posee la propiedad de ser ópticamente transparente [Leatzow et al., 2002]. El PDMS ha sido utilizado en la elaboración de prototipos de dispositivos de un modo fácil y reproducible (para anchuras de canal mayores de 50  $\mu\text{m}$ ) sin necesidad de la participación de especialistas, a bajo coste y sin necesidad de sala blanca [McCreedy, 2001].

Otros polímeros como el polietileno de alta densidad (HDPE) o la polieteretercetona (PEEK) poseen una gran estabilidad química, pero presentan el inconveniente de no ser transparentes a la radiación [Sequeira et al., 2002a]. Muchos sistemas de detección utilizados son del dominio óptico (fluorescencia, quimioluminiscencia, UV-vis, etc) [Schwarz et al., 2001], por lo que el uso de HPDE y PEEK está limitado a otros sistemas de detección.

De los polímeros mencionados sólo el PMMA y el PDMS resultan útiles para la construcción de dispositivos que integren sistemas de detección ópticos. El PMMA es el menos hidrofóbico de todos los materiales plásticos y presenta una gran estabilidad hidrolítica [Wang et al., 2002], mientras que PMDS ha sido utilizado en la construcción de sistemas microfluídicos en tres dimensiones [Anderson et al., 2000]. Las ventajas adicionales que comporta la tridimensionalidad es la elaboración de sistemas más complejos que incorporen por ejemplo, etapas de pretratamiento de muestra. Ambos polímeros son alternativas viables a la utilización de silicio y vidrio en la construcción de microchips.

Otros materiales susceptibles de utilización son los copolímeros de olefinas cíclicas (COC) que presentan excelentes propiedades ópticas, químicas y físicas. Pueden utilizarse en aplicaciones como equipos de diagnosis y en dispositivos ópticos. Otra alternativa para la fabricación de sistemas de microfluídica es utilizar capas finas de polímeros. Poliuretanos, epóxidos, siliconas y poliamidas son algunos de los utilizados en la industria electrónica y que podrían utilizarse en el futuro como substratos en la elaboración dispositivos microfluídicos [Sequeira et al., 2002a].

Los fluoropolímeros son resistentes a ácidos, bases, especies oxidantes y reductoras, y a la mayoría de los disolventes orgánicos. Recientemente ha sido descrita una nueva técnica para construir dispositivos microfluídicos con poli(tetrafluoroetileno-*co*-hexafluoropropileno) (FEP), mediante una proceso relativamente económico basado en el enlace a baja temperatura. Se consiguen estructuras con canales circulares y diámetros menores de 13  $\mu\text{m}$ , y la posibilidad de integrar electrodos y capilares de silice fundida. Resulta especialmente útil en la incorporación a microescala de técnicas de separación como electroforesis capilar, cromatografía capilar líquida y capilar electrocromatográfica [Sahlin et al., 2002].

Recientemente también ha sido desarrollado sistemas analíticos miniaturizados basados en la electroforesis capilar con detección electroquímica (CEC). En la construcción de estos dispositivos han sido utilizados distintos materiales, vidrio, PDMS, LTCC y dos polímeros más como polietilentereftalato (PET) y polietileno (PE) [Lacher et al., 2001].

La LTCC o cerámica verde desarrollada por DuPont (DuPont, 951 series), es otro material alternativo al uso de silicio o vidrio en la elaboración de dispositivos. Aunque originalmente se utilizó como encapsulante en la industria de la microelectrónica, en los últimos años, este material se ha aplicado también en el desarrollo de sistemas de gestión de fluidos a escala meso (tecnología de sistemas meso, MsST). La tecnología LTCC permite la construcción de estructuras en tres dimensiones, laminando múltiples capas [Li

y Ananthasuresh, 2002], y facilita compactación del sistema fluídico así como la integración de los componentes mecánicos y eléctricos del sistema de análisis. También pueden incorporarse otros elementos pasivos del sistema durante el proceso de laminación y posterior sinterizado. Las posibilidades de aplicación de LTCC son diversas: medidas en flujo continuo mediante sensores, construcción de canales y dispositivos o de elementos activos para microválvulas y microbombas híbridas [Gongora-Rubio et al., 2001]. Adicionalmente, el uso de LTCC presenta otras ventajas como son la estabilidad térmica del material (22-150°C), comparable a la del silicio, la posibilidad de no utilizar sustrato soporte y el bajo coste de la materia prima (una oblea de silicio de 2" tiene un coste de 12\$, la misma cantidad de LTCC cuesta 0,07\$).

La elección de una técnica dada de entre las muchas posibles, depende primero de los materiales usados (metales, cristal, polímeros o cerámica), aunque también tiene que considerarse la aplicación final. De hecho, en función de la aplicación, la producción final de una microestructura determinada puede implicar estrategias de fabricación y materiales e/o inversiones tecnológicas completamente diferentes.

### **1.5.2 Aplicaciones de los microsistemas totales de análisis**

Desde la descripción conceptual de  $\mu$ -TAS realizada por Manz et al. [1990], también llamado *Lab-On-Chip*, han tenido lugar grandes avances en el área de los sistemas analíticos a escala micro. La razón está en las importantes ventajas asociadas a la conjugación de los conceptos de integración y miniaturización para la obtención de sistemas de análisis integrados miniaturizados. Algunas de los más importantes son: disminución de tiempo de análisis y volúmenes muertos, reducción del consumo de reactivos y muestras, alta eficacia en la manipulación y tratamiento de las muestras, y disminución de coste de operación.

Las publicaciones relacionadas con este concepto son numerosas, e incluyen las técnicas de microfabricación MEMS, las aplicaciones biológicas (cultivo de células, la reacción en cadena de la polimerasa, separación de ADN, secuenciación de ADN, y diagnóstico clínico) y también un buen número de operaciones estándar (preparación de la muestra, inyección de la muestra, manipulación de la muestra, reacción, separación y detección). Recientemente, el grupo de Manz ha publicado dos *reviews* muy extensos sobre el tema. El primero de ellos hace referencia a la historia, tecnología e infraestructura básica de los sistemas miniaturizados de análisis [Reyes et al., 2002] y el segundo se centra en aplicaciones concretas desarrolladas desde el año 1998 hasta el 2002, en los campos antes mencionados [Auroux et al., 2002]. Se puede comprobar que a pesar de la existencia de numerosas publicaciones relacionadas con el concepto de miniaturización, tanto de

tecnología de construcción de dispositivos (MEMS) como de aplicaciones concretas, el número de referencias relativas a sistemas de análisis químico es muy limitado [Sato et al., 2003]. La mayoría de las publicaciones están dirigidas al campo de la biología molecular [Gawron et al., 2001; Krishnan et al., 2001], los procesos de separación mediante electroforesis [Woolley et al., 1998; Wang et al., 1999] o cromatografía [Kutter, 2000], y al pretratamiento de la muestra [Lichtenberg et al., 2002; Greenwood y Greenway, 2002].

La causa de este direccionamiento hay que buscarla en el elevado coste del desarrollo de estos dispositivos sólo abordable cuando la aplicación cae dentro del mundo de las ciencias de la salud. Cabe recordar que los microsistemas o microreactores se definen como sistemas de reacción miniaturizados con uno o múltiples componentes de tamaño comprendido entre los sub-micrómetros o sub-milímetros. Así, aunque en la bibliografía existen ejemplos de inyectores, canales, bombas, mezcladores, electrodos, filtros, válvulas e intercambiadores de calor [He et al., 1999; Ehrfeld et al., 2000; Judy, 2001; Woias, 2001; Reyes et al., 2002], éstos no han alcanzado un nivel de operatividad adecuado. Esto provoca que la comercialización de los dispositivos microfluídicos esté en su infancia y que sólo sean accesibles algunos elementos microfluídicos como válvulas y mezcladores. Todos los otros componentes están todavía en la etapa de prototipo. Un requisito fundamental para dotar de viabilidad comercial a estos elementos es que puedan ser fabricados masivamente a un coste accesible y que ofrezcan el mismo nivel de confianza que los dispositivos macroscópicos. En este sentido las aplicaciones que justifican un uso masivo son principalmente el diagnóstico médico [Verpoorte, 2002; Srinivasan et al., 2004] y el control medioambiental [Lacher et al., 2001; Roblin y Barrow, 2000]. La aplicación con éxito de los sistemas microfluídicos en estas áreas puede ser tan importante como el efecto del silicio en la microelectrónica.

Uno de los principales problemas que presenta el desarrollo de microsistemas es la detección. A esta situación contribuyen dos factores, en primer lugar las limitaciones propias de la técnica de detección, como su sensibilidad; en segundo lugar, el pequeño volumen de muestra a analizar, y por tanto, la baja concentración del analito que llega al detector. Cuando el detector incorpora una celda con lados de  $1 \times 1 \times 1$  mm, el número de moléculas presentes es 600 billones. Cuando las dimensiones de la celda se reducen a  $10 \times 10 \times 10$   $\mu\text{m}$ , solo están presentes 600.000 moléculas. En el primer caso pueden ser utilizados distintos métodos convencionales, pero en el segundo la población molecular es tan pequeña que deben utilizarse métodos más sofisticados como la fluorescencia inducida por láser [Manz y Eijkel, 2001]. El método de detección define por tanto, el límite de detección del microsistema y marca el grado de aplicación de éste.

Los sistemas de detección más utilizados han sido los fluorescentes, quimioluminiscentes y los electroquímicos. La fluorescencia permite determinar concentraciones muy bajas en volúmenes de muestra del orden de femtolitros. Además, es una técnica muy precisa, los tiempos de respuesta son muy bajos y los colorantes usados son extremadamente selectivos frente a los analitos [Krishnan et al., 2001]. Otras aplicaciones han sido la medida de cinéticas enzimáticas [Seong et al., 2003], la caracterización de enzimas inmovilizados dentro de canales de PMDS [Mao et al., 2002] o el análisis de ADN en un microchip con electroforesis capilar múltiple [Song et al., 2002]. No obstante, y a pesar su selectividad, la fluorescencia presenta el inconveniente del soporte óptico e instrumental que necesita. Esto reduce la portabilidad y aumenta su coste.

La aplicación de la detección electroquímica en sistemas microfluídicos tiene un gran potencial. Entre otras ventajas presenta una remarcada sensibilidad, inherente capacidad de miniaturización, portabilidad, independencia de la respuesta respecto a la turbidez de la muestra, bajo coste, bajo consumo eléctrico y compatibilidad con las técnicas de microconstrucción y microfabricación [Wang, 2002]. Este tipo de detección ya ha sido utilizado con éxito en diversos sistemas microfluídicos, como la detección de la hibridación del ADN mediante un electrodo de oro modificado [Fan et al., 2003], el desarrollo de multisensores ESI miniaturizados, basados en cristales sensibles de calcogenuros, para la determinación de mezclas de iones metálicos [Mourzina et al., 2001], o la miniaturización de electrodos de referencia [Ciobanu et al., 2002].

Recientemente ha sido desarrollado, por Timmer et al. [2004], un sistema híbrido miniaturizado para amoníaco, construido mediante tecnología de microsistemas. La muestra gaseosa aspirada entra en contacto con una solución de  $\text{NaHSO}_4$  que transforma en  $\text{NH}_4^+$  todo el  $\text{NH}_3$  presente. Despues el catión amonio entra en contacto con una disolución de  $\text{NaOH}$  y se transforma en  $\text{NH}_3$ , que se difunde a través de una membrana de polipropileno a un compartimiento con un agua purificada. Se convierte de nuevo en  $\text{NH}_4^+$ , que es determinado con un electrodo de conductividad.

La detección mediante quimioluminiscencia ha sido utilizada para el análisis de iones metálicos e inmunoensayo. No necesita fuente de radiación para efectuar las medidas y el equipo necesario es más sencillo que para los métodos ópticos convencionales. Hostis et al. [2000] han integrado un microreactor enzimático con detección electroquimioluminiscente combinando las tecnologías de silicio y polímeros. Recientemente ha sido desarrollado un chip para la determinación de ácido úrico mediante quimioluminiscencia a través de la reacción producida entre  $\text{H}_2\text{O}_2$ , obtenida en un reactor enzimático, y luminol. La mayor ventaja de este sistema microfluídico es que utiliza aire como portador [Lv et al., 2002].

Otro método de detección óptico utilizado es la absorbancia. La aplicación de este tipo de detección plantea una importante limitación inherente al principio de medida. La dependencia de la sensibilidad con el camino óptico disminuye considerablemente su aplicabilidad a nivel micro [Schwarz et al., 2001]. Se ha tener en cuenta el cambio de escala que supone una medida a nivel macro con camino óptico 10000  $\mu\text{m}$ , respecto a las medidas realizadas a escala micro donde los caminos ópticos usualmente se encuentran entre 100-500  $\mu\text{m}$ . Para solventar este problema, Alonso et al. han propuesto un nuevo concepto de microsensor óptico que permite incrementar tanto la sensibilidad de las medidas de absorbancia como disminuir el tiempo de respuesta [Puyol et al., 1999, 2002a, 2002b].

Por otro lado, un factor a favor de esta técnica es la posibilidad de utilizar las fuentes y los detectores de tamaño reducido y bajo coste ya existentes. Así, la integración de LEDs y fotodetectores en sistemas miniaturizados ha demostrado su viabilidad. Recientemente, se ha descrito un sistema microfluídico en PDMS donde se han integrado microespectrofotómetros construidos sobre un óxido de metal semiconductor complementario (CMOS). Utiliza un LED como fuente de luz y permite hacer medidas de soluciones de colorante diluidas [Adams et al., 2003].

Distintos autores han presentado los resultados obtenidos en microchips basados en medidas de absorbancia como sistema de detección. Los parámetros analizados han sido muy diversos, así como el sistema instrumental utilizado. En algunos casos se han utilizado LEDs y fotodetectores, y en otros todavía la detección se ha realizado con espectrofotómetros convencionales mediante el uso de fibra óptica [Maims et al., 2001]. Los principales parámetros analizados han sido ortofosfatos, ion amonio, ion nitrito, ion nitrato, y Hierro (II). En todos los casos, los sistemas son híbridos, utilizándose componentes macroscópicos. Como elementos de impulsión se ha utilizado el flujo electroosmótico, bombas peristálticas y en algún caso, también, microburetas.

La determinación de ion  $\text{NH}_4^+$  ha sido abordada por diversos autores. En todos los casos se ha utilizado la reacción de Berthelot. En esta reacción el ion amonio, reacciona con hipoclorito y fenol formando azul de indofenol que es determinado posteriormente mediante detección espectrofotométrica. Daridon y col [2001] estudiaron la cinética de la reacción mediante medidas discontinuas y en flujo, en un microchip de silicio, estimando el efecto de la temperatura en la constante de velocidad. El sistema de detección utilizado fue un espectrofotómetro conectado con fibra óptica a una cubeta de 400  $\mu\text{m}$  de camino óptico integrada en el chip. Para la impulsión de los líquidos utilizaron dos microburetas automáticas. Se obtuvieron resultados reproducibles y un alto grado de mezcla por difusión que permitió la realización de los estudios cinéticos. Tiggelaar et al. [2002] utilizaron la

misma reacción, para caracterizar una celda de detección diseñada y construida por ellos. La celda de detección estaba integrada en un chip de silicio y tenía 1,2 cm de longitud, 200  $\mu\text{m}$  de profundidad y 0,8  $\mu\text{m}$  de anchura. El sistema de detección utilizado estaba compuesto por un LED y un fotodiodo. Con este sistema pudieron realizar medidas de azul de indofenol en un intervalo entre 0,02-50  $\mu\text{M}$ . También Sequeira et al. [2002b] han realizado recientemente un estudio sobre la estabilidad de los reactivos y posibles interferencias de la reacción con el objeto de valorar su implementación en un sistema autónomo de análisis. La única diferencia respecto al estudio previo [Daridon et al., 2001] está en el camino óptico que en este caso era de 585  $\mu\text{m}$ .

Otro de los parámetros que se ha determinado en sistemas microfluídicos es el ion ortofosfato. Daykin et al. [1995] fueron los primeros en utilizar un  $\mu\text{FIA}$  para la determinación de ortofosfato mediante su reacción con molibdato en presencia de un reductor. Utilizaron un microsistema de vidrio con canales de 325  $\mu\text{m}$  de anchura y 30  $\mu\text{m}$  de profundidad. Como sistema de impulsión se utilizó el flujo electroosmótico y como sistema de detección se usaron un LED y un fotodetector. Doku et al. [1999] desarrollaron un micro-FIA ( $\mu\text{-FIA}$ ) para la determinación de fosfato basado también en la reacción con azul de molibdeno. El sistema microfluídico fue fabricado en vidrio de borosilicato mediante técnicas de fotolitografía y grabado isotrópico húmedo. Constaba de canales de 200  $\mu\text{m}$  de anchura y 50  $\mu\text{m}$  de profundidad, y emplearon flujo electroosmótico para el movimiento de reactivos e inyección de la muestra. El tipo de detección utilizado fue espectrofotométrico usando un LED y un microespectrofotómetro *diode array*. También han sido utilizados otros sistemas de impulsión como bombas de pistón realizadas con  $\text{Al}_2\text{O}_3$  cerámico y microsistemas plásticos. En este último caso, la celda era de 0,5 mm de camino óptico y la fuente de luz utilizada un LED [Carlsson et al., 1997].

Recientemente Sequerira et al. [2002a] han propuesto un microsistema realizado en plástico para la determinación de ortofosfato mediante detección óptica. La fuente de luz es un LED y el tamaño del camino óptico de la celda es de 400  $\mu\text{m}$ . Los resultados obtenidos permiten determinar ortofosfato mediante la absorbancia del complejo amarillo del ácido vanadomolibdofosfórico formado, con un límite de detección del orden de 5 ppm. Utilizando el mismo sistema, Bowden y Diamond [2003], han estudiado la estabilidad de los reactivos empleados con el fin de verificar la posibilidad de diseñar un microsistema capaz de monitorizar este parámetro en régimen autónomo durante un periodo de un año. El uso de microsistemas aporta ventajas como bajo mantenimiento, bajo consumo de reactivos y, bajo mantenimiento y consumo energético.

Greenway et al. [1999] han desarrollado un  $\mu$ TAS para la determinación de ion nitrito basado en la reacción con sulfanilamida para formar la sal de diazonio que reacciona con N-(1-naftil)etilendiamina y forma el colorante azoico que después es detectado a 526 nm. La reacción se realiza en un microsistema fabricado en borosilicato con canales de 325  $\mu$ m de anchura y 30  $\mu$ m de profundidad. Utilizaron un LED como emisor y un microespectrofotómetro con fibra óptica como detector. Las distintas disoluciones fueron impulsadas electroosmóticamente. Se aplicó la técnica de flujo detenido o *stopped-flow* para conseguir características de respuesta comparables al sistema FIA convencional, obteniéndose un límite de detección de 0,2  $\mu$ M, con un intervalo lineal de 0-100  $\mu$ M. Este mismo grupo de investigación ha adaptado el mismo sistema para la determinación de ion nitrato. Utilizaron cadmio como reductor y analizaron el ion nitrito formado mediante la reacción de Griess de diazo-copulación. El límite de detección es bajo de 0,51  $\mu$ M, pero la precisión del método estimada como RSD (8,3%) no es buena comparada con la del sistema FIA convencional [Petsul et al., 2001].

Recientemente, Rainelli et al. [2003] han realizado un sistema  $\mu$ FIA en PMMA que han utilizado para cuatro determinaciones, ion hierro (II), metales pesados totales, ion cloruro e ion nitrito. El sistema de gestión de fluidos está compuesto por jeringas automáticas y válvulas. El sistema de detección utiliza un LED como fuente de emisión y fibras ópticas para transportar la luz hacia la celda del microsistema. Se ha comparado el bombeo electrocinético con el bombeo mecánico mediante jeringas, obteniéndose resultados comparables. En todas las determinaciones se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos con sistemas FIA convencionales. En concreto, el ion nitrito se puede analizar en un intervalo entre 5-150  $\mu$ M con un límite de detección de 4  $\mu$ M.

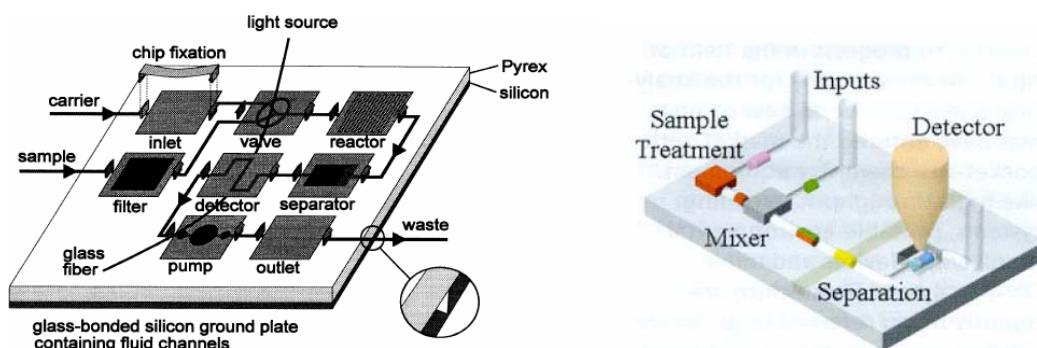
Lu y Collins [2001] han diseñado un microsistema para la determinación de metales de transición basado en la separación electroforética de los complejos formados tras su reacción con 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR). Utilizando un LED verde como fuente de radiación se alcanzan límites de detección inferiores a 1 ppm. Otros grupos también han desarrollado detectores basados en fotodiodos lineales para visualizar la separación conseguida en el canal [Schwarz y Hauser, 2001].

Una de las opciones posibles para conseguir una sensibilidad adecuada en medidas de absorbancia es el uso de celdas de multireflexión para incrementar el camino óptico. En base a este concepto, Verpoorte et al. [1992], han construido celdas de vidrio que incrementan de 5 a 10 veces el camino óptico efectivo. Otra alternativa diferente, para aumentar la sensibilidad, es el uso de métodos termoópticos. Este tipo de técnica necesita de un instrumentación muy precisa y se basa en la medida de la variación del índice de refracción debida a la absorción de radiación por parte de la muestra contenida en la celda

[Schwarz y Hauser, 2001]. Swinney y col [2000] han desarrollado un sistema de detección basado en la interferometría de dispersión que permite realizar medidas de índice de refracción en volúmenes del orden de sub-nanolitros. Esta técnica permite medir variaciones en el índice de refracción del orden  $10^{-6}$  y tiene un volumen de detección de  $188 \cdot 10^{-12}$  l.

### 1.5.3 Sistemas comerciales y tendencias futuras

En la actualidad *Danfoos Analytical* comercializa un equipo integrado de dimensiones reducidas (350 mm × 600 mm) que permite determinar tres parámetros, los iones  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , de modo alternativo. El sistema tiene compartimentos para reactivos, soluciones patrón y recogida de residuos, y tiene autonomía de 6 semanas. Está diseñado como sensor de nutrientes para su uso en plantas de tratamiento de aguas residuales. Su funcionamiento se basa en una membrana de diálisis que permite la migración de los iones presentes en el agua a través de ella y la posterior reacción con el reactivo específico que provoca la formación de un producto coloreado. El tipo de detección por tanto es espectrofotométrica. Los métodos utilizados para cada analito son, azul de indofenol para  $\text{NH}_4^+$ , sulfato de hidracina para  $\text{NO}_3^-$  y azul de molibdeno para  $\text{PO}_4^{3-}$ . El intervalo lineal y el límite de cuantificación son óptimos en todos los casos. El consumo de reactivos es mínimo debido al bajo caudal de trabajo 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  [www.danfoss.dk].



**Figura 1.7** Sistemas microfluídicos para análisis químico. (a) Microsistema integrado,  $\mu$ TAS [Lebbink et al., 1996], (b) etapa de reacción o separación.

A pesar de los continuos avances en la investigación de nuevos materiales y aplicación de nuevas técnicas de microfabricación, el microsistema que integra todos los elementos necesarios para realizar un análisis, representa más una tendencia u objetivo que una realidad [Wang, 2002b]. Los microsistemas integrados como el de la figura 1.7 (a) representan un futuro todavía lejano. La mayoría de microsistemas incorporan sólo algunas de las etapas del proceso analítico y normalmente el sistema de impulsión de fluidos y la detección son externas al microchip en que se realiza la reacción química o proceso de separación (figura 1.7 (b)) [Ericsson y Li, 2004].

## **1.6 Reacción modelo**

En los estudios dirigidos al diseño de nuevos sistemas de gestión de fluidos con reacción química realizados en esta tesis, se ha utilizado como modelo demostrador la determinación de ion nitrito. Se ha escogido este parámetro por su importancia en el ámbito medioambiental le convierte en un parámetro cuya determinación es susceptible de ser automatizada.

La determinación de nitrógeno en forma de ion nitrito es muy importante tanto en aguas de consumo como en aguas residuales tratadas en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR). Niveles altos de este ion indican desde contaminación por vertidos en un río, hasta un funcionamiento incorrecto de una planta depuradora con tratamiento biológico [WPFC, 1983].

Los problemas ecológicos asociados con una concentración alta de ion nitrito hacen necesario el desarrollo e implementación de métodos analíticos automatizados que permitan su monitorización en sistemas naturales, y para el control de las EDARs.

Las principales formas en que se presenta el nitrógeno en el agua residual urbana, son el orgánico y el amoniacal. El nitrógeno orgánico es eliminado en gran parte por el consumo de los propios microorganismos presentes en el cultivo, pero el amonio, si no se evita, permanece inalterable a lo largo del proceso. Desde el momento en que las plantas depuradoras de aguas residuales urbanas se han visto en la necesidad de eliminar este nitrógeno, el estudio exhaustivo de su ciclo ha sido clave en el desarrollo de nuevos tipos de procesos que deben incorporarse a los tratamientos convencionales [R-Roda, 1994].

### **1.6.1 Potencial peligrosidad del ion nitrito**

Los iones nitrito se forman en la naturaleza por la acción de bacterias nitrificadoras como etapa intermedia en la formación de los nitratos. Sin embargo, su concentración en plantas y agua es, normalmente, muy baja. A veces, puede haber conversión microbiológica de ion nitrato a ion nitrito durante el almacenamiento de legumbres frescas, particularmente a temperatura ambiente, en cuyo caso la concentración de ion nitrito pueden llegar a niveles excepcionalmente altos (cerca de 3600 mg/kg de peso en seco).

En individuos normales sanos, los iones nitrato y nitrito se absorben y excretan fácilmente, aunque una parte puede ser metabolizada por la microflora en el conducto gastrointestinal. Así mismo, la reducción del ion nitrato a ion nitrito sucede bajo la presencia de microorganismos. La mayor parte del ion nitrito presente en el cuerpo humano está originado por la reducción del ion nitrato por las bacterias de la saliva.

La toxicidad del ion nitrito es bien conocida y tiene dos aspectos bien diferenciados. El primero es la inducción de la metahemoglobinemia como consecuencia de la oxidación del ion nitrito por parte de la forma ferrosa de la hemoglobina, que pasa a su forma férrica (metahemoglobina). Esta, al no enlazar reversiblemente el oxígeno, provoca la muerte por anoxia (asfixia). En un adulto, la metahemoglobina se convierte rápidamente en oxihemoglobina por la acción de sistemas reductores como la NADH<sup>+</sup>-metahemoglobina reductasa. Este sistema enzimático no está completamente desarrollado en los lactantes de hasta tres meses de edad y en los animales muy jóvenes. Esta deficiencia desaparece a los tres o cuatro meses de vida excepto para los casos de deficiencia enzimática hereditaria. Además, se ha observado que la hemoglobina fetal que en los recién nacidos representa entre el 60% y 80% de su hemoglobina total, se oxida más fácilmente a metahemoglobina que la hemoglobina adulta. En estas condiciones puede haber un aumento en el volumen de metahemoglobina formada, dando como resultado un proceso clínico característico, la metahemoglobinemia. El proceso de oxidación-reducción de la metahemoglobina en los eritrocitos de individuos sanos, es de carácter continuo. Se considera que el contenido medio de metahemoglobinas en poblaciones sanas es inferior al 2% de la concentración de hemoglobina total. Niveles superiores al 50% pueden ocasionar la muerte (cianosis). Los signos clínicos de intoxicación por ion nitrato, atribuibles a hipoxia, aparecen cuando los valores de metahemoglobina sobrepasan aproximadamente el 20%.

El segundo aspecto de la toxicidad del ion nitrito se encuentra la formación de compuestos cancerígenos (compuestos de N-nitroso) por la reacción entre el ion nitrito y las aminas secundarias o terciarias, o las amidas. Recientes investigaciones epidemiológicas no han conseguido establecer una relación positiva (estadísticamente significativa) entre el contenido de ion nitrato en agua potable y el cáncer de estómago, a pesar de las sospechas generadas en algunos casos [Kiang et al., 1978].

Por tanto, los riesgos para la salud por exposición a ion nitrito están vinculados directamente no tan solo a su concentración en el agua potable y los alimentos, sino también a la presencia o ausencia de condiciones favorables a la oxidación de iones nitrato. Parece ser que los adultos no se ven directamente perjudicados por la exposición a las concentraciones existentes de iones nitrato y nitrito en el medio ambiente si bien algunos estudios han indicado que los aerosoles de ion nitrato en el aire actúan como irritantes a los menores de tres meses [OMS, 1980].

A pesar que los datos clínicos disponibles son muy limitados para establecer la necesaria relación dosis-respuesta, se han de reducir al mínimo el uso de iones nitrato y nitrito como aditivos alimentarios. Hay que tener en cuenta que grandes cantidades de ion nitrato son empleadas para la curación de los productos cárnicos y de pescadería. En estos productos

parte del ion nitrato es bioquímicamente reducido a ion nitrito, que previene el crecimiento de organismos responsables del botulismo. El ion nitrito también da a los embutidos el gusto característico al combinarse con las hemoproteínas de la sangre.

En España y, siguiendo las directrices de adaptación establecidas por la legislación europea el límite legal de un agua dedicada a consumo humano está situado en 50 ppm de ion nitrato y 0,010 ppm de ion nitrito (BOE 254, 23-10-90). La solución de este problema medioambiental no es simplemente una cuestión de legislación sobre el nivel aceptable de ion nitrato en el agua de consumo doméstico. En este momento el grado de contaminación de las aguas potencialmente aptas para el consumo humano en toda Europa está comenzando a sobrepasar el límite legal establecido, específicamente en las aguas de pozo. Las administraciones están planteando disminuir el límite legal establecido. Esto no ataca el problema en sus fundamentos. La erradicación del problema pasa por la aplicación de medidas preventivas que reduzcan los vertidos en el medio natural.

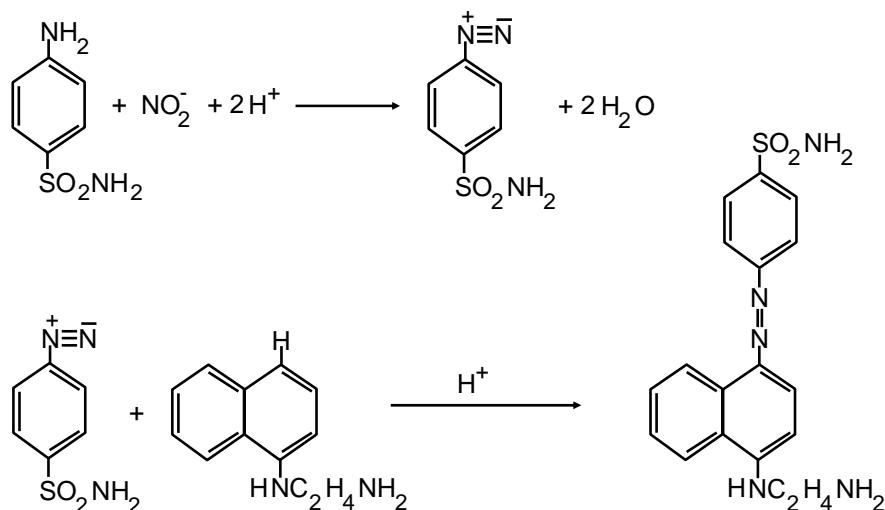
### **1.6.2 Métodos para la determinación de ion nitrito**

El nitrógeno en forma de ion nitrito aparece rara vez en concentraciones mayores de 1mg/l, ni siquiera en efluentes de aguas residuales tratadas si las plantas depuradoras de aguas residuales operan en condiciones óptimas. Su concentración en superficie y aguas subterráneas normalmente, es menor de 0,1 mg/l. Por esta razón son necesarios métodos muy sensibles para su determinación. El procedimiento espectrofotométrico aporta esta sensibilidad aunque, últimamente, también ha sido utilizada una técnica instrumental estándar como la cromatografía iónica.

La cromatografía iónica [Bermejo et al., 1991] es muy sensible y permite la determinación simultánea de varios iones en la misma muestra. Estas ventajas quedan contrarrestadas por el elevado coste y complejidad de una técnica que comúnmente sobrepasa las necesidades más habituales y ha de ser implementada en laboratorios preparados y por personal cualificado. Todo ello la hace inadecuada para la monitorización de este parámetro en condiciones de campo. El procedimiento espectrofotométrico es más económico y preferible cuando el análisis de ion nitrito se realiza para concentraciones especialmente bajas [Sawyer et al., 1994].

El procedimiento colorimétrico utilizado es una modificación de la reacción de diazotización de Griess-Ilosvay. Normalmente son empleados dos reactivos orgánicos: sulfanilamida y diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (NED). Las reacciones involucradas son la formación de la sal de diazonio seguida de la reacción de condensación (copulación) y formación del colorante azoico. De las múltiples combinaciones de amina primaria y compuesto aromático, la recomendada es la anterior.

En condiciones ácidas, el ion nitrito, en forma de ácido nitroso, reacciona con un grupo amina de la sulfanilamida para formar la sal de diazonio que combinada con el diclorhidrato de NED forma un colorante azoico de color rosa fucsia (figura 1.8). El color producido es directamente proporcional a la cantidad de ion nitrito presente en la muestra, y la determinación de la concentración se realiza por comparación con estíndares de concentración conocida.



**Figura 1.8** Reacción modelo de diazotización-copulación utilizada (Griess-Ilosvay).

Como simplificación en la metodología, es común encontrar procedimientos que utilizan un reactivo mixto preparado con sulfanilamida y diclorhidrato de NED disueltos conjuntamente en medio ácido [APHA-AWWA-WPCF, 1992]. Esta será la opción escogida, con objeto de simplificar la operación de los sistemas de flujo utilizados en esta tesis y minimizar la producción de residuos.

También se han utilizado reacciones basadas en métodos cinéticos para la determinación de ion nitrito. Las reacciones utilizadas son diversas y en todas ellas se ha utilizado el efecto catalítico de la presencia de ion nitrito en distintas reacciones redox, en todos los casos se ha utilizado la técnica FIA y se ha determinado la disminución de absorbancia. Las reacciones redox utilizadas han sido las siguientes: oxidación de gallicina por bromato en medio ácido [Enfasi y Kazemzadeh, 1999], oxidación de clorofosfonazo-pN por bromato en medio de  $H_2SO_4$  [Xingguo et al., 1996], oxidación de azul de timol por bromato en medio ácido sulfúrico [Pettas et al., 1998] y oxidación de verde de naftol B por bromato potásico en medio de ácido fosfórico [Zhi-Qi et al., 1998a]. Esta última reacción ha sido aplicada en la determinación simultánea de ion nitrito e ion nitrato previa reducción de éste en una columna reductora de cadmio-zinc [Zhi-Qi et al., 1998b].

Otras técnicas instrumentales implementadas en los sistemas FIA para la determinación de ion nitrito han sido la amperometría y la quimioluminiscencia. La combinación FIA-biamperometría tiene como ventaja principal el aumento de selectividad. Esta técnica ha sido aplicada en la determinación de los iones nitrato y nitrito. La reducción de ion nitrato a ion nitrito fue realizada de por reducción con una columna de cadmio [Danet, 1998] o mediante fotoreducción [Gil Torró et al., 1998]. La técnica de quimioluminiscencia en fase gas ha sido aplicada en la determinación sucesiva de amoníaco, ion nitrito e ion nitrato en forma de NO mediante reacción de éste con O<sub>3</sub> [Aoki et al., 1997]. Otra determinación indirecta de ion nitrito en agua, suelos y muestras industriales está basada en la quimioluminiscencia de acriflavina. La presencia de ion nitrito y su reacción previa con acriflavina decrece la intensidad luminiscente, este efecto inhibitorio en la quimioluminiscencia de la acriflavina se usa para determinar el ion nitrito [Catala Icardo et al., 2001].

El análisis de ion nitrito mediante la técnicas de flujo ha sido una determinación muy aplicada, contabilizándose más de 230 publicaciones desde 1981 en que Ruzicka propusiera el primer sistema FIA [[www.flowinjection.com](http://www.flowinjection.com)]. Aún así, esta determinación por su importancia, continua siendo objeto de numerosos estudios dirigidos a su optimización. Cambios en el reactivo cromogénico para aumentar la sensibilidad [Ahmed et al., 1996; Kawakami y Igarashi, 1997; Mousavi et al., 1998; Revanasiddappa et al., 2001] o la sustitución de reactivos carcinógenos [Martínez Caltayud et al., 1998], junto con innovaciones que se refieren a la resolución de la determinación simultánea de iones nitrato y nitrito, mediante una metodología alternativa como es el SIA [Oms et al., 1995; Cerdà et al., 1998], confirman su interés. Los avances conseguidos en la miniaturización de los sistemas analíticos inducen en muchas ocasiones modificaciones en los procedimientos ya establecidos con el objeto de adecuar éstos a las nuevas condiciones de trabajo [Peris et al., 1997].

## 1.7 Bibliografía

- Adams, M.L.; Enzelberger, M.; Quake, S.; Scherer, A.** “Microfluidic integration on detector arrays for absorption and fluorescence micro-spectrometers”, *Sensors and Actuators A*, **104** (1), 25-31, (2003).
- Ahmed, M.J.; Stalikas, C.D.; Tzouwara-Karayanni, S.M.; Karayannis, M.I.** “Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow injection analysis”, *Talanta*, **43**, 1009-1018, (1996).
- Alegret, S.; Alonso, J.; Bartrolí, J.; Paulis, J.M.; Lima, J.L.F.C.; Machado, A.A.S.C.** “Flow-through tubular PVC matrix membrane electrode without inner reference solution for flow injection analysis”, *Analytica Chimica Acta*, **164**, 147-152, (1984).
- Alegret, S. (ed.)**, “Integrated Analytical Systems”, Chapter 1: Integration, a new paradigm in analytical chemistry, Alegret, S. Ed. Elsevier, Amsterdam, (2003).
- Alerm, Ll.; Bartrolí, J.** “Micro-batch flow titration”, *Analytical Letters*, **28/8**, 1483-1497, (1995).
- Alerm, Ll.; Bartrolí, J.** “Development of a sequential microtitration system”, *Analytical Chemistry*, **68**, 1394-1400, (1996).
- Alonso, J.; Bartrolí, J.; Barber, R.** “Sandwich techniques in flow-injection analysis. Part 3. Simultaneous determination of Cr (VI) in two concentration ranges”, *Analytica Chimica Acta*, **261**, 219-223, (1992).
- Alpizar, I.; Crespi, A.; Cladera, A.; Corteza, R.** “Simultaneous Determination of Chloride and pH in Wastewaters by Sequential Injection Analysis”, *Laboratory Robotics and Automation*, **8**, 165-170, (1996).
- Ampan, P.; Ruzicka, J.; Atallah, R.; Christian, G.D.; Jakmunee, J.; Grudpan, K.** “Exploiting sequential injection analysis with bead injection and lab-on-valve for determination of lead using electrothermal atomic absorption spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, **499** (1-2), 167-172, (2003).
- Anderson, J.R.; Chiu D.T.; Jackman, R.J.; Cherniavskaya, O.; McDonald, J.C.; Wu, H.; Whitesides, S.H.; Whitesides, G.M.** “Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PMDS by rapid prototyping”. *Anaytical Chemistry*, **72**, 3158-3164, (2000).
- Andersson, H.; van den Berg, A.** “Microfluidic devices for cellomics: a review”, *Sensors and Actuators B*, **92** (3), 315-325, (2003).
- Andrew, K.N.; Blundell, N.J.; Price., D.; Worsfold, P.J.** “Flow injection techinques for water monitoring”, *Analytical Chemistry*, **66**, A916-A922, (1994).
- Andreev, V.P.; Christian, G.D.** “Principles and capabilities of electroinjection analysis”, *Analytical Letters*, **34**, 1569-1583, (2001).
- Aoki, T.; Fukuda, S.; Hosoi, Y; Mukai, H.** “Rapid flow injection analysis method for successive determination of ammonia, nitrite, and nitrate in water by gas-phase chemiluminiscence”, *Analytica Chimica Acta*, **349** (1-3), 11-16, (1997).
- APHA-AWWA-WPCF.** “Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales”. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, (1992).
- Araújo, A.N.; Lima, J.L.F.C.; Rangel, A.O.S.S.; Teixeira, M.T.M.** “Use of the sandwich technique in flow injection systems for extending the range of an analytical method. Application to chloride determination in waters”, *Journal Flow Injection Analysis*, **9**, 69-74, (1992).

- Araújo, A.N.; Lima, J.L.F.C.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.** "Multicommunication in Flow Analysis. 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach", *Analytical Chimica Acta*, **310**, 447-452, (1995a).
- Araújo, A.N.; Lima, J.L.F.C.; Saraiva, M.L.M.F.S.** "Sandwich FIA simultaneous multidetermination of cationic species in waters", *Journal Flow Injection Analysis*, **12**, 194-208 (1995b).
- Araújo, A.N.; Gracia, J.; Lima, J.L.F.C.; Poch, M.; Lücia, M.; Saraiva, M.F.S.** "Colorimetric determination of iron in infant fortified formulas by sequential injection analysis", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **357**, 1153-1156, (1997).
- Araújo, A.N.; Costa, R.C.C.; Lima, J.L.F.C.; Reis, B.F.** "Sequential injection system in flame atomic absorption spectrometry for the determination of calcium and magnesium in mineral waters", *Analytical Chimica Acta*, **358**, 111-119, (1998).
- Auroux, P. A.; Iossifidis, D.; Reyes, D. R.; Manz, A.** "Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications". *Analytical Chemistry*, **74**, 2637-2652, (2002).
- Baxter, P.J.; Christian, G.D.; Ruzicka, J.** "Rapid determination of total biomass from a yeast fermentation using sequential injection", *Analyst*, **119**, 1807-1812, (1994).
- Baxter, P.J.; Christian, G.D.; Ruzicka, J.** "Multivariate approach for the simultaneous determination of total biomass and glucose from a yeast fermentation by sequential injection analysis", *Analytical Chemistry*, **40**, 455-471, (1995).
- Baxter, P.J.; Christian, G.D.** "Sequential injection analysis a versatile technique for bioprocess monitoring", *Accounts of Chemical Research*, **29**, 515-521, (1996).
- Bermejo Martínez F.; Bermejo Barrera M.P.; Bermejo Barrera A.**, "Química Analítica General, Cuantitativa e Instrumental", Vol 2, 6<sup>a</sup> edición. Ed. Editorial Paraninfo, (1991).
- Betteridge, D.; Dagless, E.L.; Fields, B.; Graves, N.K.** "A highly sensitive flow-through phototransducer for unsegmented continuos-flow analysis demonstrating high-speed spectrophotometry at the parts per  $10^9$  level and a new method of refractometric determinations", *Analyst*, **103**, 897-908, (1978).
- Betteridge, D.; Sly, T.J.; Wade, A.P.** "Versatile automatic development system for flow injection analysis", *Analytical Chemistry*, **58**, 2258-2265, (1986).
- 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 and Actuators B*, **90** (1-3), 170-174 (2003).
- Brandes, W.; Maschke, H. E.; Schepers, T.** "Specific flow injection sandwich binding assay for IgG using protein A and a fusion protein", *Analytical Chemistry*, **65**, 3368, (1993).
- Brito, V.O.; Raimundo I.M.** "Simultaneous multiple injection in monosegmented flow analysis", *Analytica Chimica Acta*, **371**, 317-324, (1998).
- Carlsson, K.; Jacobsen, H.S.; Jensen, A.L.; Stenström, T.; Karlberg, B.** "Micro-continuous flow system for wet chemical analysis", *Analytica Chimica Acta*, **354** (1-3), 35-42, (1997).
- Catalá Icardo, M.; García Mateo, J.V.; Martínez Calatayud, J.** "Determination of nitrite by inhibition of the chemiluminescence of acriflavine in a flow-injection assembly", *Analyst*, **126** (8), 1423-1427, (2001).
- Catalá Icardo, M.; García Mateo, J.V.; Martínez Calatayud, J.** "Multicommunication as a powerful new analytical tool", *Trends in analytical chemistry*, **21** (5), 366-378, (2002).
- Cerdà, A.; Oms, M.T.; Forteza, R.; Cerdà, V.** "Sequential injection sandwich technique for the simultaneous determination of nitrate and nitrite", *Analytica Chimica Acta*, **371**, 63-71, (1998).

- Cerdà, V.; Estela, J.M.; Forteza, R.; Cladera, A.; Becerra, E.; Altamira, P.; Sitjar, P.** "Flow techniques in water analysis", *Talanta*, **50** (4), 695-705, (1999).
- Cerdà, V.; Cerdà, A.; Cladera, A.; Oms, M.T.; Mas, F.; Gómez, E.; Bauzá, F.; Miró, M.; Corteza, R.; Estela, J.M.** "Monitoring of environmental parameters by sequential injection analysis", *Trends in Analytical Chemistry*, **20** (8), 407, (2001).
- Christian, G.D.** "Novel flow injection analysis systems for drug analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **10**, 769-773, (1992).
- Christian, G.D.; Ruzicka, J.** "Exploiting stopped-flow injection methods for quantitative chemical assays", *Analytica Chimica Acta*, **261**, 11-21, (1992).
- Christian, G.D.** "Evolution and revolution in quantitative analysis", *Analytical Chemistry*, **67** (17), 532A-538A, (1995).
- Christian, G.D.** "Flow analysis and its role and importance in the analytical sciences", *Analytica Chimica Acta*, **499**, 5-8, (2003).
- Ciobanu, M.; Wilburn, J.P.; Buss, N.I.; Ditavong, P.; Lowy, D.A.** "Miniaturized Reference Electrodes Based on Ag/AgX Internal Reference Elements. I. Manufacturing and Performance", *Electroanalysis*, **14** (14), 989-997, (2002).
- Cladera, A.; Tomas, C.; Gomez, E.; Estela, J.M.; Cerdà, V.** "A new instrumental implementation of sequential injection analysis", *Analytical Chimica Acta*, **302**, 297-308, (1995).
- Cladera, A.; Gómez, E.; Estela, J.M.; Cerdà, V.** "Effect of variables influencing  $S_{1/2}$  in sequential injection analysis. Extrapolability of  $S_{1/2}$  based results between SIA designs", *Talanta*, **43**, 1667-1674, (1996).
- Couto, C.M.C.C.; Lima, J.L.F.C.; Montenegro, M.C.B.S.M.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.** "Potentiometric flow injection determination of cadmium in waste waters including in-line ion-exchange separation/concentration", *Analytica Chimica Acta*, **366**, 155- 161 (1998).
- Couto, C.M.C.M., Montenegro, M.C.B.S.M.** "Detectores potenciométricos para sistemas de análise por injeção em fluxo, evaluaçao e aplicação", *Química Nova On line*, **23** (6), (2000).
- Danet, A.F.; David, V.** "Flow injection biamperometric determination of nitrite and nitrate", *Analytical Letters*, **31** (5), 751-764, (1998).
- Daridon, A.; Sequeira, M.; Pennarun-Thomas, G.; Dirac, H.; Krog, J.P.; Gravesen, P.; Lichtenberg, J.; Diamond, D.; Verpoorte, E.; de Rooij, N.F.** "Chemical sensing using an integrated microfluidic system based on the Berthelot reaction", *Sensors and Actuators B*, **76** (1-3), 235-243, (2001).
- Daykin, R.N.C.; Haswell, S.J.** "Development of a micro flow injection manifold for the determination of orthophosphate", *Analytica Chimica Acta*, **313** (3), 155-159, (1995).
- de Armas, G.; Miró, M.; Cladera, A.; Estela, J.M.; Cerdà, V.** "Time-based multisyringe flow injection system for the spectrofluorimetric determination of aluminium", *Analytica Chimica Acta*, **455** (1), 149-157, (2002).
- de la Guardia, M.** "An integrated approach of analytical chemistry", *Journal Brazilian Chemistry Society*, **10** (6), 429-437, (1999).
- Doku, G.N.; Haswell, S.J.** "Further studies into the development of a micro-FIA ( $\mu$ FIA) system based on electroosmotic flow for the determination of phosphate as orthophosphate", *Analytica Chimica Acta*, **382** (1-2), 1-13, (1999).
- Ehrfeld, W.; Hessel, V.; Löwe, H.** "Microreactors - New technology for modern chemistry", Ed. Wiley – VCH, (2000).

- Ensafi, A.A.; Kazemzadeh, A.** "Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flor injection with spectrophotometric detection", *Analytica Chimica Acta*, **382** (1-2), 15-21, (1999).
- Erickson, D.; Li, D.** "Integrated microfluidic devices" , *Analytica Chimica Acta*, **507** (1), 11-26, (2004).
- Estela, J.M.; Cladera, A.; Munoz, A.; Cerdà, V.** "Simultaneous Determination of Ionic Species by Sequential Injection Analysis Using a Sandwich Technique with Large Sample Volumes", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **64**, 205-215, (1996).
- Fan, C.; Plaxco, K.W.; Heeger, A.J.** "Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100** (16), 9134-9137, (2003).
- Fonseca, O.** "Desarrollo de un analizador automático para la determinación de ion plomo en muestras medioambientales. **Tesis Doctoral.** Universitat Autònoma de Barcelona, (2003).
- Frenzel, W.** "Enhanced performance of ISEs in FIA: non-nernstian response, indirect determination, differential detection and modified reverse FIA", *Analyst*, **113**, (1988).
- Gawron, A.J.; Martin, R.S.; Lunte, S.M.** "Microchip electrophoretic separation systems for biomedical and pharmaceutical analysis", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **14** (1), 1-12 (2001).
- Gil Torró, I.; García Mateo, J.V.; Martínez Calatayud, J.** "Flow-injection biamperometric determination of nitrate (by photoreduction) and nitrite with the  $\text{NO}_2^-/\text{I}^-$  reaction", *Analytica Chimica Acta*, **366** (1-3), 241-249, (1998).
- Gomez, E.; Tomas, C.; Cladera, A.; Estela, J.M.; Cerdà, V.** "Multicomponent techniques in sequential injection", *Analyst*, **120**, 1181-1184, (1995).
- Gongora-Rubio, M.R.; Espinoza-Vallejos, P.; Sola-Laguna, L.; Santiago-Avilés, J.J.** "Overview of low temperature co-fired ceramics tape technology for meso-system technology (MsST)". *Sensors & Actuators*, **89**, 222-241, (2001).
- Grate, J.W.; Taylor, R.H.** "Sequential injection method with on-line soil extraction for determination of Cr (VI)", *Field Analytical Chemistry and Technology*, **1** (1), 39-48, (1996).
- Greenwood, P.A.; Greenway, G.M.** "Sample manipulation in micro total analytical systems", *Trends in analytical chemistry*, **21** (11), 726-740, (2002).
- Gübeli, T.; Christian, G.D.; Ruzicka, J.** "Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry", *Analytical Chemistry*, **63**, 2407-2413, (1991).
- Guzman, M.; Compton, B.J.** "Use of sequential injection technique and robotics for the automation of rhFXIII fluorometric activity assay case study", *Talanta*, **40** (12), 1943-1950, (1993).
- Guzman, M.; Pollema, C.; Ruzicka, J.; Christian, G.D.** "Sequential injection technique for automation of complex analytical procedures fluorometric assay of factor XIII", *Talanta*, **40**, 81-87, (1993).
- Hansen E.H.** "Flow-injection analysis: leaving its teen-years and maturing. A personal reminiscence of its conception and early development", *Analytica Chimica Acta*, **308**, 3-13, (1995).
- He, B.; Tan, L.; Regnier, F.** "Microfabricated Filters for Microfluidic Analytical Systems", *Analytical Chemistry*, **71** (7), 1464-1468, (1999).
- Horvai, G.; Pungor, E.** "Comparative study on the precision of potentiometric techniques applied with ion-selective electrodes. Part 3. Potentiometric titrations", *Analytica Chimica Acta*, **116** (1), 87-92, (1980).

- Hostis, E.L.; Michel, P.E.; Fiacabrino, G.C.; Strike, D.J.; Rooij, N.F.; Koudelka-Hep, M.**  
 "Microreactor and electrochemical detectors fabricated using Si and EPON SU-8", *Sensors and Actuators B*, **64**, 156-162, (2000).
- <http://www.analytical.danfoss.com/>, consultada en marzo de 2004.
- <http://www.flowinjection.com/flowinjection>, consultada en marzo de 2004.
- <http://www.globalfia.com>, consultada en marzo de 2004
- Ivaska, A. Ruzicka, J.** "From flow injection to sequential injection comparison of methodologies and selection of liquid drives", *Analyst*, **118**, 885-889, (1993).
- Judy, J.W.** "Microelectromechanical systems (MEMS): fabrication, design and applications", *Smart Materials and Structures*, **10**, 1115-1134, (2001).
- Karlberg, B.; Torgrip, R.** "Increasing the scope and power of flow-injection analysis through chemometric approaches", *Analytica Chimica Acta*, **500**, 299-306, (2003).
- Kawakami, T.; Igarashi, S.** "Asymmetric porphyrin derivative having one reactive site a highly sensitive spectrophotometric reagent for nitrite", *Analytica Chimica Acta*, **354** (1-3), 159-161, (1997).
- Kellner, R.; Mermet, J.M.; Otto; M.; Widner, H.W.; (e.d.)**, "Analytical Chemistry", Wiley-Vch, Weinheim, (1998).
- Kiang, C.H.; Kuan, S.S.; Guilbault, G.** "Enzymatic determination of nitrate: electrochemical detection after reduction with nitrate reductase and nitrite reductase", *Analytical Chemistry*, **50** (9), 1319-1322, (1978).
- Kikas, T.; Ishida, H.; Roberts, P.J.W.; Webster, D.R.; Janata, J.** "Virtual Pluma", *Electroanalysis*, **12** (12), 974-979, (2000).
- Krishnan, M.; Namasivayam, V.; Lin, R.; Pal, R.; Burns, M.A.** "Microfabricated Reaction and Separation Systems", *Current Opinions in Biotechnology*, **12** (1), 92-98, (2001).
- Kubán, V.** "Gas diffusion/permeation flow injection analysis. Part I. Principles y instrumentation", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **23** (5), 323-354, (1992).
- Kubiak, W.W.; Latonen, R.M.; Ivaska, A.** "The sequential injection system with adsorptive stripping voltammetric detection", *Talanta*, **53** (6), 1211-1219, (2001).
- Kutter J.P.** "Current developments in electrophoretic and chromatographic separation methods on microfabricated devices", *Trends in Analytical Chemistry*, **19** (6), 352-363, (2000).
- Lebink G.K.** "Microsystems in Agriculture" en Microsystem technology: exploring opportunities, Samson BedrijfsInformatie, Alphen aan den Rijn/Zaventem, 193-226, (1994).
- Lacher, N.A.; Garrison, K.E.; Martin, R.S.; Lunte, S.M.** "Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry". *Electrophoresis*, **22**, 2526-2536, (2001).
- Lapierre, A.V.; Battaglini, F.; Raba, J.** "Rotating bioreactor based on an electron transfer mediated by osmium complexes incorporating a continuous-flow/stopped-flow system Application to the determination of glucose in serum samples", *Analytica Chimica Acta*, **443** (1), 17-24, (2001).
- Leatzow, D.M.; Dodson, J.M.; Golden, J. P.; Ligler, F.S.** "Attachment of plastic fluidic components to glass sensing surfaces". *Biosensors & Bioelectronics*, **17**, 105-110, (2002).
- Lenehan, C. H.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W.** "Sequential injection analysis", *Analyst*, **127**, 997-1020, (2002).

- Li, J.; Ananthasuresh, G.K.** "Three-dimensional low-temperature co-fired ceramic shells for miniature systems applications". *Journal of micromechanics and microengineering*, **12**, 198-203, (2002).
- Lichtenberg, J.; de Rooij, N.F.; Verpoorte, E.** "Sample pretreatment on microfabricated devices", *Talanta*, **56** (2), 233-266, (2002).
- Liu, S.; Dasgupta, P.K.** "Flow-injection analysis in the capillary format using electroosmotic pumping", *Analytica Chimica Acta*, **268** (1), 1-6, (1992).
- Liu, S.; Dasgupta, P.K.** "Sequential injection analysis in capillary format with an electroosmotic pump", *Talanta*, **41** (11), 1903-1910, (1994).
- Lu, Q.; Collins, G.E.** "Microchip separations of transition metal ions via LED absorbance detection of their PAR complexes", *Analyst*, **126** (4), 429-432 , (2001).
- Lukkari, I.; Ruzicka, J.; Christian, G.D.** "Determination of total ammonium nitrogen and free ammonia in a fermentation medium by sequential injection analysis", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **346**, 813-818, (1993).
- Lukkari, I.; Irgum, K.; Lindgren, P.; Lidén, J.** "On-line determination of pyrocatechol, protocatechuic acid, pyrogallol and gallic acid in black liquor by sequential injection and high-performance liquid chromatography", *Process Control and Quality*, **7** (3-4), 185-193, (1995).
- Luo, Y.Y.; Alothman, R.; Christian, G.D.; Ruzicka, J.** "Flow sequential injection determination of gaseous ammonia with a glass diffusion denuder", *Talanta*, **42**, 1545-1551, (1995)
- Luo, Y.Y.; Alothman, R.; Ruzicka, J.; Christian, G.D.** "Solvent extraction sequential injection without segmentation and phase separation based on the wetting film formed on a Teflon tube wall", *Analyst*, **121**, 601-606, (1996).
- Luque de Castro, M. D.** "Solid-phase reactors in flow injection analysis", *Trends in Analytical Chemistry*, **11** (4), 149-155, (1992).
- Luque de Castro, M.D.; Gámiz-Gracia, L.** "Miniaturisation: a well-defined trend in separation and preconcentration techniques", *Analytica Chimica Acta*, **351** (1-3), 23-40, (1997).
- Lv, Y.; Zhang, Z.; Chen, F.** "Chemiluminescence biosensor chip based on a microreactor using carrier air flow for determination of uric acid in human serum", *Analyst*, **127** (9), 1176-1179 , (2002).
- Maims, C.; Hulme, J.; Fielden, P.R.; Goddard, N.J.** "Grating coupled leaky waveguide micro channel sensor chips for optical analysis", *Sensors and Actuators B*, **77** (3), 671-678, (2001).
- Manz, A.; Eijkel, J. C. T.** "Miniaturization and chip technology. What can we expect?", *Pure and Applied Chemistry*, **73** (10), 1555–1561, (2001).
- Manz, A.; Gruber, N.; Widmer, H.M.** "Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing". *Sensors and Actuators B*, **1**, 244-248, (1990).
- Mao, H.; Yang, T.; Cremer, P.S.** "Design and Characterization of Immobilized Enzymes in Microfluidic Systems", *Analytical Chemistry*, **74** (2), 379-385, (2002).
- Marcos, J.; Ríos, A.; Valcárcel, M.** "Automatic testing of enzyme modifiers by the flow-gradient technique", *Analytica Chimica Acta*, **308**, 152-158, (1995).
- Marshall, G.D.; van Staden, J.F.** "Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis", *Process Control and Quality*, **3**, 251-261, (1992).
- Marshall, G.; Wolcott D.; Olson, D.** "Zone fluidics in flow analysis: potentialities and applications", *Analytica Chimica Acta*, **499** (1-2), 29-40, (2003).

- Martelli, P.B.; Reis, B.F.; Kronka, E.A.M.; Bergamin, H.; Korn, M.; Zagatto, E.A.G.; Lima, J.L.F.C.; Araújo, A.N.** "Multicommutation in flow analysis .2. Binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in steel alloys", *Analytical Chimica Acta*, **308**, 397-405, (1995).
- Martínez Calatayud, J.; García Mateo, J.V.; David, V.** "Multi-insertion of small controlled volumes of solutions in a flow assembly for determination of nitrate (photoreduction) and nitrite with proflavin sulphate", *Analyst*, **123** (3), 429-434, (1998).
- Martínez, S.** "Desenvolupament d'analitzadors de tensioactius aniònics i no iònics per a l'aplicació medioambiental. **Tesi Doctoral.** Universitat Autònoma de Barcelona, (2002).
- Mascini, M.; Palleshi, G.** "Determination of l-amino acids and alcohols with oxidase enzymes and a tubular iodide-selective electrode", *Analytica Chimica Acta*, **100**, 215-221, (1978).
- Masini, J.C.; Baxter, P.J.; Detwiler, K.R.; Christian, G.D.** "On-line spectrophotometric determination of phosphate in bioprocesses by sequential injection", *Analyst*, **120**, 1583-1587, (1995).
- McCormack, T.; van Staden, J.F.** "Use of a sequential injection technique to evaluate the effect of mixing chambers on zone penetration", *Analytica Chimica Acta*, **367**, 111-121, (1998).
- McCreedy, T.** "Rapid prototyping of glass and PDMS microstructures for micro total analytical systems and micro chemical reactors by microfabrication in the general laboratory". *Analytica Chimica Acta*, **427**, 39-53, (2001).
- McKelvie, I.D.; Peat, D.M.W.; Matthews, P.; Worsfold, P.J.** "Elimination of the Schlieren effect in the determination of reactive phosphorus in estuarine by flow-injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **351**, 265-271, (1997).
- Min, R.W.; Nielsen, J.; Villadsen, J.** "Simultaneous monitoring of glucose, lactic acid and penicillin by sequential injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **312**, 149-156, (1995).
- Min, R.W.; Nielsen, J.; Villadsen, J.** "On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **320** (2-3), 199-205, (1996).
- Montesinos, J.L.; Alonso, J.; del Valle, M.; Lima, J.L.F.C. ; Poch, M.** "Mathematical modelling of two analyte sequential determinations by flow-injection sandwich systems", *Analytica Chimica Acta*, **254**, 177-187, (1991).
- Motomizu, S.; Kobayashi, M.** "Flow injection method for the determination of anionic surfactants after liquid-liquid extraction using on-tube visible absorption and fluorescence detection", *Analytica Chimica Acta*, **261** , 471-475, (1992).
- Mourzina, Y.G.; Schubert, J.; Zander, W.; Legin, A.; Vlasov, Y.G.; Lüth, H.; Schöning, M.J.** "Development of multisensor systems based on chalcogenide thin film chemical sensors for the simultaneous multicomponent analysis of metal ions in complex solutions", *Electrochimica Acta*, **47** (1-2), 251-258, (2001).
- Mousavi, M.F.; Jabbari, A.; Nouroozi, S.** "A sensitive flow-injection method for determination of trace amounts of nitrite", *Talanta*, **45** (6), 1247-1253, (1998).
- Nakano, S.; Luo, Y.Y.; Holman, D.; Ruzicka, J.; Christian, G.D.** "Sequential injection photometric determination of molybdenum using organic wetting film extraction", *Microchemical Journal*, **55**, 392-398, (1997).
- Namiesnik, J.** "Trends in environmental analytics and monitoring", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **30** (2), 221-230, (2000).
- Newman, A.** "In the swim of flow injection analysis", *Analytical Chemistry News & Features*, 203A-206A, (1996).

- Novis, M.; Berregui, I.; Ríos, A.; Valcárcel, M.** "A new simple-injection/simple-dilution system for the flow-injection analytica technique", *Analytica Chimica Acta*, **381**, 287-295, (1999).
- Oliveira, C.C.; Sartini, R.P.; Zagatto, E.A.G.** "Microwave-assisted simple preparation in sequential injection: spectrophotometric determination of magnesium, calcium and iron in food", *Analytica Chimica Acta*, **413**, 41-48, (2000).
- Olsson, L.; Schulze, U.; Nielsen, J.** "On-line bioprocess monitoring – an academic discipline or an industrial tool?", *Trends in analytical chemistry*, **17** (2), 88-95, (1998).
- Oms, M.T.; Cerdà, A.; Cerdà, V.** "Sequential injection analysis of nitrites and nitrates", *Analytica Chimica Acta*, **315**, 321-330, (1995).
- Oms, M.T.; Cerdà, A.; Cerdà, V.** "Preconcentration by flow reversal in conductometric sequential injection analysis of ammonium", *Electroanalysis*, **8**, 387-390, (1996a).
- Oms, M.T.; Cerdà, A.; Cladera, A.; Cerdà, V.; Forteza, R.** "Gas diffusion techniques coupled sequential injection analysis for selective determination of ammonium", *Analytical Chimica Acta*, **318**, 251-260, (1996b).
- Organización Mundial de la Salud (OMS).** "Nitratos, nitritos y compuestos de N-nitroso". Washington: Publicación Científica No. 394. Criterios de salud ambiental 5, p.74, (1980).
- Peris, M.; Ors, R.; Bonastre, A.; Gil, P.; Serrano, J.** "Advanced application of rule nets to the automation of chemical analysis systems", *Analytica Chimica Acta*, **354**, 249-253, (1997).
- Peterson, K.L.; Logan, B.K.; Christian, G.D.; Ruzicka, J.** "Sequential injection extraction for sample preparation", *Analytica Chimica Acta*, **337**, 99-106, (1997).
- Petsul, P.H.; Greenway, G.M.; Haswell, S.J.** "The development of an on-chip micro-flow injection analysis of nitrate with a cadmium redactor", *Analytica Chimica Acta*, **428** (2), 155-161, (2001).
- Pettas, I.A.; Lafis, S.I.; Karayannis, M.I.** "Reaction rate method for determination of nitrite by applying a stopped-flow technique", *Analytica Chimica Acta*, **376** (3), 331-337, (1998).
- Puyol, M.; del Valle, M.; Garcés, I.; Villuendas, F.; Dominguez, C.; Alonso, J.** "Integrated Waveguide Absorbance Optode for chemical sensing", *Analytical Chemistry*, **71**(22), 5037-5044 (1999).
- Puyol, M.; Miltsov, S.; Salinas, I.; Alonso, J.** "Ketocyanine dyes: H<sup>+</sup>-selective Ionophores for use in Integrated Waveguides Absorbance Optodes", *Analytical Chemistry*, **74**, 570-576 (2002a).
- Puyol, M.; Salinas, I.; Garcés, I.; Villuendas, F.; Llobera, A.; Domínguez, C.; Alonso, J.** "Improved Integrated Absorbance Optodes for Ion Selective Sensing", *Analytical Chemistry*, **74**, 3354 – 3361 (2002b).
- Rainelli, A.; Stratz, R.; Schweizer, K.; Hauser, Peter C.** "Miniature flow-injection analysis manifold created by micromilling", *Talanta*, **61** (5), 659-665, (2003).
- Ramon, M.** "Desenvolupament d'un analitzador automàtic per a la monitoritació d'ió fosfat en aigües suaficials". **Tesi Doctoral**. Universitat Autònoma de Barcelona, (2003).
- Reis, B.F.; Bergamin, H.** "Evolução dos injectores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo", *Química Nova*, **16**, 570-573, (1993).
- Reis, B.F.; Gine, M.F.; Zagatto, E.A.G.; Lima, J.L.F.C.; Lapa, R.A.** "Multicommunication in Flow Analysis. 1. Binary sampling concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digest", *Analytical Chimica Acta*, **293**, 129-138, (1994).

- Revanasiddappa; Kumar, K.; Bilwa, M.** "A Facile Spectrophotometric Determination of Nitrite Using Diazotization with p-Nitroaniline and Coupling with Acetyl Acetone", *Microchimica Acta*, **137** (3-4), 249-253, (2001).
- Reyes, D.R.; Iossifidis, D.; Auroux, P.A.; Manz, A.** "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology". *Analytical Chemistry*, **74**, 2623-2636, (2002).
- Rius, A.; Callao, M.P.; Rius, F.X.** "Self configuration of sequential injection analytical systems", *Analytical Chimica Acta*, **316**, 27-37, (1995).
- Roblin, P.; Barrow, D.A.** "Microsystems technology for remote monitoring and control in sustainable agricultural practices", *Journal of Environmental Monitoring*, **2** (5), 385-392, (2000).
- Rothman, L.D.; Crouch, S.R.; Ingle, J.D.** "Theoretical and experimental investigation of factors affecting precision in molecular absorption spectrophotometry", *Analytical Chemistry*, **47**, 8, 1226-1233, (1975).
- R-Roda Layret, J.** "Definició d'un sistema basat en el coneixement per el control de plantes depuradores d'aigües residuals urbanes amb criteris de Nitrificació / Desnitrificació, **Treball de recerca**, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, (1994).
- Ruisánchez, I.; Rius, A.; Larrechi, M.S.; Callao, M.P.; Rius, F.X.** "Automatic simultaneous determination of Ca and Mg in natural waters with no interference separation", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **24** (1), 55-63, (1994).
- Rumori, P.; Cerdà, V.** "Reversed flow injection and sandwich sequential injection methods for the spectrophotometric determination of copper(II) with cuprizone", *Analytica Chimica Acta*, **486** (2), 227-235, (2003).
- Ruzicka, J.; Hansen E.H.** "Flow Injection Analysis. Part I: A new concept of fast continuous flow analysis", *Analytica Chimica Acta*, **78**, 145, (1975).
- Ruzicka, J.; Hansen E.H.** "Flow Injection Analysis. Principles, applications and trends", *Analytica Chimica Acta*, **114**, 19-44, (1980).
- Ruzicka, J.; Hansen E.H.** "The first decade of flow injection analysis: from serial assay to diagnostic tool", *Analytica Chimica Acta*, **179**, 1, (1986).
- Ruzicka, J.; Hansen E.H.** "Flow Injection Analysis", 2nd ed., E.d. Wiley Interscience, New York, (1988).
- Ruzicka, J.; Marshall, J.D.** "Sequential injection : a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays", *Analytica Chimica Acta*, **237**, 329-343, (1990).
- Ruzicka, J.; Gübeli, T.** "Principles of stopped flow sequential injection analysis and its application to the kinetic determination of traces of a proteolytic enzyme", *Analytical Chemistry*, **63**, 1680-1685, (1991).
- Ruzicka, J.** "The second coming of flow-injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **261**, 3-10, (1992).
- Ruzicka, J.** "Discovering Flow Injection: Journey from sample to a live cell and from solution to suspension", *Analyst*, **119** (9), 1925-1934, (1994).
- Ruzicka, J.; Scampavia, L.** "From flow injection to bead injection", *Analytical Chemistry News & Features*, 257A-263A, (1999).
- Ruzicka, J.** "Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection", *Analyst*, **125** (6), 1053-1060, (2000).
- Sahlin, E.; Beisler, A.T.; Wolzman, S.J.; Weber, S.G.** "Fabrication of microchannel structures in fluorinated ethylene propylene". *Analytical Chemistry*, **74**, 4566-4569, (2002)

- Satínský, D.; Solich, P.; Chocholous, P.; Karlícek, R.** “Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique”, *Analytica Chimica Acta*, **499** (1-2), 205-214, (2003).
- Sato, K.; Hibara, A.; Tokeshi, M.; Hisamoto, H.; Kitamori, T.** “Microchip-based chemical and biochemical analysis systems”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55** (3), 379-391, (2003).
- Sawyer L.N.; Mccarty P.L.; Parfin, G.F.** “Chemistry for Environmental Engineering”, Ed. Mc Graw Hill, (1994).
- Schindler, R.; Thanh, H.L.; Lendl, B.; Kellner, R.** “Determination of enzyme kinetics and chemometric evaluation of reaction products by FTIR spectroscopy on the example of -fructofuranosidase”, *Vibrational Spectroscopy*, **16** (2), 127-135, (1998).
- Schuhmann, W.; Wohlschläger, H.; Huber, J.; Schmidt, H.L.; Stadler, H.** “Development of an extremely flexible automatic analyzer with integrated biosensors for on-line control of fermentation processes”, *Analytica Chimica Acta*, **315** (1-2), 113-122, (1995).
- Schwarz, M.A.; Hauser, P.C.** “Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices”, *Lab on a Chip*, **1**, 1-6, (2001).
- Segundo, M.A.; Rangel, A.O.S.S.** “Kinetic determination of L(-)malic acid in wines using sequential injection analysis”, *Analytica Chimica Acta*, **499** (1-2), 99-106, (2003).
- Segundo, M.A.; Lima, J.L.F.C.; Rangel, A.O.S.S.** “Automatic flow systems based on sequential injection analysis for routine determinations in wines”, *Analytica Chimica Acta*, en prensa, (2004).
- Seong, G.H.; Heo, J.; Crooks, R.M.** “Measurement of Enzyme Kinetics Using a Continuous-Flow Microfluidic System”, *Analytical Chemistry*, **75** (13), 3161-3167, (2003).
- Sequeira, M.; Bowden, M.; Minogue, E.; Diamond, D.** “Towards autonomous environmental monitoring systems”. *Talanta*, **56**, 355-363, (2002a).
- Sequeira, M.; Diamond, D.; Daridon, A.; Lichtenberg, J.; Verpoorte, S.; de Rooij, N.F.** “Progress in the realisation of an autonomous environmental monitoring device for ammonia”, *Trends in analytical chemistry*, **21**(12), 816-827, (2002b).
- Shu, H.C.; Hakanson, H.; Mattiasson, B.** “On-line monitoring of D lactic acid during a fermentation process using immobilized D lactate dehydrogenase in a sequential injection analysis system”, *Analytica Chimica Acta*, **300**, 277-285, (1995).
- Silva, M.S.P.; Masini, J.C.** “Exploiting monosegmented flow analysis to perform in-line standard additions using a single stock standard solution in spectrophotometric sequential injection procedures”, *Analytica Chimica Acta*, **466** (2), 345-352, (2002).
- Skoog, D.A.; Leary, J.** “Análisis Instrumental”, 4<sup>a</sup> edición, Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A.; Madrid, (1994).
- Solé, S.** “Desenvolupament de sistemes biosensores enzimàtics i immunològics basats en un suport magnètic renovable”, **Tesi Doctoral**. Universitat Autònoma de Barcelona, (2000).
- Solich, P.; Sklenátová, H.; Huclová, J.; Satínský, D.; Schaefer U.F.** “Fully automated drug liberation apparatus for semisolid preparations based on sequential injection analysis”, *Analytica Chimica Acta*, **499** (1-2), 9-16, (2003).
- Song, J.M.; Mobley, J.; Vo-Dinh, T.** “Integrated circuit microchip system with multiplex capillary electrophoresis module for DNA analysis”, *Analytica Chimica Acta*, **466** (2), 187-192, (2002).
- Srinivasan, V.; Pamula, V.K.; Fair, R.B.** “Droplet-based microfluidic lab-on-a-chip for glucose detection”, *Analytica Chimica Acta*, **507** (1), 145-150, (2004).

- Suliman, F.E.O.; Sultan, S.M.** "Sequential injection technique employed for stoichiometric studies, optimization and quantitative determination of some fluoroquinolone antibiotics complexed with iron(III) in sulfuric acid media", *Talanta*, **43** (4), 559-568, (1996).
- Sultan, S.M.; Suliman, F.E.O.** "Use of a sequential injection technique for mechanistic studies and kinetic determination of bromazepam complexed with iron(II) in hydrochloric acid", *Analyst*, **121**, 617-621, (1996).
- Sultan, S.M.; Desai, N.I.** "Mechanistic study and kinetic determination of vitamin C employing the sequential injection technique", *Talanta*, **45** (6), 1061-1071, (1998).
- Sultan, S.M.; Hassan, Y.A.M.; Ibrahim, K.E.E.** "Sequential injection technique for automated titration: Spectrophotometric assay of vitamin C in pharmaceutical products using cerium (IV) in sulfuric acid", *Analyst*, **124** (6), 917-921, (1999).
- Suzuki, H.** "Microfabricación de chemical sensors and biosensors for environmental monitoring", *Material Science and Engineering*, **C 12**, 55-61, (2000).
- Swinney, K.; Bornhop, D.J.** "A chip-scale universal detector for electrophoresis based on backscattering interferometry", *Analyst*, **125** (10), 1713-1718, (2000).
- Taljaard, R.E.; Van Staden, J. F.** "Simultaneous determination of cobalt(II) and Ni(II) in water and soil samples with sequential injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **366** (1-3), 177-186, (1998).
- Tamanaha, C.R.; Whitman, L.J.; Colton, R.J.** "Hybrid macro-micro fluidics system for a chip-based biosensor", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **12** (2), N7-N17, (2002).
- Tiggelaar, R.M.; Veenstra, T.T.; Sanders, R.G.P.; Gardeniers, J.G.E.; Elwenspoek, M.C.; van den Berg, A.** "A light detection cell to be used in a micro analysis system for ammonia", *Talanta*, **56** (2), 331-339, (2002).
- Timmer, B.H.; van Delft, K.M.; Otjes, R.P.; Olthuis, W.; van den Berg, A.** "Miniaturized measurement system for ammonia in air", *Analytica Chimica Acta*, **507** (1), 137-143, (2004).
- Trojanowicz, M.** "Flow injection analysis: Instrumentation and applications", World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapour, (2000).
- Tryzell, R.; Karlberg, B.** "Efficiency and response studies on gas diffusion manifolds in flow-injection systems", *Analytica Chimica Acta*, **308**, 206-213, (1995).
- Ukeda, H.; Ishii, T.; Sawamura, M.; Kusunose, H.** "Dinamic analysis of the binding process of bovine serum albumin on glutaraldehyde-activated controlled pore glass", *Analytica Chimica Acta*, **308**, 261-268, (1995).
- Valcarcel, M; Luque de Castro, M.D.** "Análisis por inyección en flujo", Imprenta San Pablo, Murcia, Córdoba, (1984).
- van der Linden, W.E.** "Flow injection analysis in on-line process control", *Analytica Chimica Acta*, **179**, 91-101, (1984).
- van der Woerd, M.; Ferree, D.; Pusey, M.** "The promise of macromolecular crystallization in microfluidic chips", *Journal of Structural Biology*, **142** (1), 180-187, (2003).
- van Staden, J.F.; Taljaard, R.E.** "Determination of sulphate in natural waters and industrial effluents by sequential injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **331** (3), 277-281, (1996).
- van Staden, J.F.; Taljaard, R.E.** "Determination of ammonia in water and industrial effluent streams with the indophenol blue method using sequential injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **315** (3), 281-289, (1997).

- van Staden, J.F.; du Plessis, H.; Linsky, S.M.; Taljaard, R.E.; Kremer, B.** "Influence of different ratios on the isodispersion point in sequential injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **354**, 59-64, (1997).
- van Staden, J.F.; McCormack, T.** "Sequential-injection spectrophotometric determination of amino acids using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid", *Analytica Chimica Acta*, **369** (1-2), 163-170, (1998).
- van Staden, J.F.; Taljaard, R.E.** "On-line Monitoring of Phosphate in Natural Water and Effluent streams using Sequential Injection Analysis", *Microchimica Acta*, **128** (3-4), 223-228, (1998).
- Verpoorte, E.; Manz, A.; Lüdi, H.; Bruno, A.E.; Maystre, F.; Krattiger, B.; Widmer, H.M.; van der Schoot, B.H.; de Rooij, N.F.** "A silicon flow cell for optical detection in miniaturized total chemical analysis systems", *Sensors and Actuators B*, **6**, 66-70, (1992).
- Verpoorte, E.** "Microfluidic chips for clinical and forensic analysis", *Electrophoresis*, **23** (5), 677-712, (2002).
- Vieira, J.A.; Raimundo, I.M.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.; Lima, J.L.F.C.** "Sampling strategies in sequential injection analysis: Exploiting the monosegmented-flow approach", *Analytica Chimica Acta*, **366** (1-3), 257-262, (1998).
- Vieira, J.A.; Raimundo, I.M.; Reis, B.F.** "Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems", *Analytica Chimica Acta*, **438** (1-2), 75-81, (2001).
- Wang, J.; Tian, B.; Sahlin, E.** "Micromachined Electrophoresis Chips with Thick-Film Electrochemical Detectors", *Analytical chemistry*, **71** (23), 5436-5440, (1999).
- Wang, J.** "Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review", *Talanta*, **56** (2), 223-231, (2002a).
- Wang, J.** "Portable electrochemical systems", *trends in analytical chemistry*, **21** (4), 226-232, (2002b).
- Wang, J.; Hansen, E.H.** "Development of an automated sequential injection on-line solvent extraction-back extraction procedure as demonstrated for the determination of cadmium with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, **456** (2), 283-292, (2002).
- Wang, J.; Pumera, M.; Chatrathi, M.P.; Escarpa, A.; Griebel, A.; Dörner, W.; Löwe, H.** "Towards disposable lab-on-a-chip: Poly(methylmethacrylate) microchips electrophoresis device with electrochemical detection". *Electrophoresis*, **23**, 596-601, (2002).
- Wang, J.; Hansen, E.H.; Miró, M.** "Sequential injection-bead injection-lab-on-valve schemes for on-line solid phase extraction and preconcentration of ultra-trace levels of heavy metals with determination by electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, **499** (1-2), 139-147, (2003).
- Woias, P.** "Micropumps-summarizing the first two decades, Microfluidics and BioMEMS.", Mastrangelo, C. H.; Becker, H. (eds.), *Proceedings of The International Society for Optical Engineering (SPIE)*, **4560**, 39-52, (2001).
- Woolley, A.T.; Lao, K.; Glazer, A.N.; Mathies, R.A.** "Capillary Electrophoresis Chips with Integrated Electrochemical Detection", *Analytical Chemistry*, **70** (4), 684-688, (1998).
- WPCF (The Water Pollution Control Federation)**, "Nutrient control", Manual of practice FD-7, WPCF, Washington, (1983).
- Xingguo, C.; Ketai, W.; Zhide, H.; Zhengfeng, Z.** "Kinetic flow injection spectrophotometric determination of nitrite by its catalytic effect on the oxidation of chlorophosphonazo-pN by bromate", *Analytical Letters*, **29** (11), 2015-2023, (1996).

- Yao, T.; Ogawa, H.** “Highly sensitive flow-injection sandwich immunoassay for human immunoglobulin G based on two staged amplification”, *Journal Flow Injection Analysis*, **17** (1) 51-58, (2000).
- Zagatto, E.A.G.; Arruda, M.A.Z. ; Jacintho, A.O. ; Mattos, I.L.** “Compensation of the schlieren effect in flow-injection analysis by using dual wavelength spectrophotometry”, *Analytica Chimica Acta*, **234**, 153-160, (1990).
- Zagatto, E.A.G.; Reis, B.F.; Oliveira, C.C.; Sartini, R.P.; Arruda, M.A.Z.** “Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis”, *Analytica Chimica Acta*, **400**, 249-256, (1999).
- Zhi-Qi, Z.; Lou-Jun, G.; Han-Ying, Z.** “Flow-injection catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the redox reaction between naphthol green B and potassium bromate”, *Talanta*, **47** (2), 497-501, (1998a).
- Zhi-Qi, Z.; Lou-Jun, G.; Han-Ying, Z.; Quian-Guang L.** “Catalytic simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate with a flow injection system”, *Analytica Chimica Acta*, **370** (1), 59-63, (1998b).



# **Objetivos**



## Capítulo 2

---

### *Objetivos*

---

En la actualidad existe una demanda creciente de sistemas analíticos para la monitorización de procesos químicos basados en instrumentación sencilla y capaz de trabajar, de forma automática, durante largos períodos de tiempo. Los sistemas de análisis por inyección en flujo convencionales (FIA), cumplen adecuadamente estos requisitos y su robustez está favoreciendo su introducción en el diseño de monitores de procesos. En esta área del control analítico automatizado existe, adicionalmente, una decidida tendencia hacia la miniaturización de los equipos para incrementar su portabilidad.

Las ventajas que esta reducción de escala aporta permiten disminuir drásticamente tanto el consumo de reactivos como el volumen necesario de muestra. La reducción de volumen de muestra permite redimensionar a la vez los complejos sistemas de pretratamiento usados para su obtención. En conjunto, las necesidades de mantenimiento de los equipos se minimizan lo que es de enorme importancia en sistemas de control analítico en régimen de funcionamiento autónomo. Un área donde las técnicas de flujo continuo tienen una gran potencialidad es el diseño de sistemas de control analítico autoadaptativos, capaces de adecuar automáticamente sus parámetros de operación a los requerimientos de análisis cambiantes de numerosos tipos de muestras.

En esta área, los sistemas FIA convencionales optimizados son equipos cerrados, diseñados para determinar, en una muestra dada, un único analito en un intervalo de concentraciones predeterminado. Cualquier modificación del intervalo de trabajo o analito a determinar implica, a pesar de la versatilidad de la técnica, una modificación previa de las características físicas del sistema. Esta limitación de las técnicas FIA convencionales puede ser soslayada mediante el uso de una metodología de flujo continuo alternativa que confiere robustez, versatilidad y capacidad autoadaptativa a los sistemas convencionales, denominada análisis por inyección secuencial (SIA). Adicionalmente, se puede aumentar la selectividad y sensibilidad de estos sistemas de gestión de fluidos mediante la incorporación de etapas de separación o preconcentración en línea. En cualquier caso, tanto la miniaturización como el funcionamiento autoadaptativo, va a exigir un enorme esfuerzo investigador dirigido al diseño de nueva instrumentación para sistemas de gestión de fluidos y técnicas de flujo continuo innovadoras que permitan el manejo eficiente de microfluidos. Así mismo, estos sistemas deben ser automatizables y, siendo el objetivo final su funcionamiento autónomo, la instrumentación debe ser lo suficientemente versátil como para procesar información y en función de ésta, autoadaptarse para operar en las condiciones adecuadas en todo momento.

Con esta perspectiva a largo plazo, el objetivo general de la presente tesis es el desarrollo de la infraestructura instrumental básica para el diseño y construcción de sistemas automáticos de análisis autoadaptativos basados en la metodología FIA y SIA, y de sistemas automáticos de análisis miniaturizados. Sistemas de gestión de fluidos versátiles en los que además se puedan implementar distintos tipos de detección según las necesidades. Más concretamente, este objetivo general se puede dividir en cuatro objetivos parciales, enumerados a continuación:

- Caracterización de sistemas FIA que utilizan una microbureta como sistema de inyección.
- Diseño de un sistema integrado para la gestión de fluidos, basado en la técnica por inyección secuencial (SIA), controlable por ordenador.
- Desarrollo de un sistema SIA con etapa de preconcentración en línea para la determinación de catión cadmio mediante detección potenciométrica.
- Diseño y fabricación de sistemas de microfluídica mediante tecnología microelectrónica (IC) y desarrollo de la infraestructura instrumental necesaria para la implementación de microsistemas de análisis total ( $\mu$ TAS).

## **Materiales y Métodos**



# Capítulo 3

---

## *Materiales y métodos*

---

### **3.1 Introducción**

En este capítulo se detallan las características comunes a los distintos trabajos realizados en esta tesis y se expone la metodología utilizada en la evaluación y caracterización de los sistemas de gestión de fluidos desarrollados. Para evitar repeticiones innecesarias, se ha optado por una presentación genérica de los reactivos y metodologías aplicadas, reservándose para la parte experimental de cada capítulo las indicaciones específicas de la instrumentación utilizada en cada sistema.

En el primer apartado se detallan las soluciones y reactivos utilizados en cada una de las determinaciones implementadas. En el segundo se especifica la metodología de caracterización seguida en cada caso agrupada según el tipo de detección utilizada.

### **3.2 Reactivos y soluciones**

En esta apartado se relacionan las distintas soluciones y reactivos utilizados en cada una de las determinaciones realizadas, la reacción determinación de ion nitrito mediante detección espectrofotométrica y la determinación de catión cadmio mediante detección potenciométrica. Para la preparación de reactivos y soluciones se ha utilizado en todos los casos agua desionizada MilliQ ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ). La calidad de todos los reactivos utilizados ha sido para análisis o superior.

#### **3.2.1 Análisis de ion nitrito**

##### **Solución colorante**

La solución de colorante utilizada en los estudios de dispersión sin reacción química en los sistemas de flujo se ha preparado por dilución de una solución madre del indicador rojo de fenol (Panreac, PA) de concentración  $1,13 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  [Welcher, 1966] en NaOH 0,1 M (Panreac, PA 98%). Las distintas soluciones patrón se han preparado por dilución de la anterior en NaOH 0,1 M.

##### **Soluciones patrón de ion nitrito**

Las soluciones patrón de  $\text{NO}_2^-$  (entre 0,005-500 ppm) han sido preparadas diariamente a partir de un stock de 1000 ppm de  $\text{NO}_2^-$ . La solución stock se ha preparado utilizando una sal de sodio,  $\text{NaNO}_2$  del 98% (Panreac, PA). Debido a que el anión nitrito se oxida con facilidad, el tiempo de vida de esta disolución es de una semana conservada en nevera.

##### **Reactivos**

El reactivo cromogénico se ha preparado por disolución de 10 g de sulfanilamida (Panreac, PA 99%) y 1 g diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina (NED) (Panreac, PA 98%) en 100 ml de ácido fosfórico de (Panreac, PA 85%) y posterior enrarse con agua hasta 1 litro. La solución es estable durante aproximadamente un mes si se conserva en nevera y en frasco oscuro debido a la fotodegradabilidad del NED [APHA-AWWA-WPCF, 1992].

##### **Otras soluciones**

Las soluciones utilizadas para la caracterización del sistema mediante valoraciones se han preparado a partir de Tris (hidroximetil)aminometano (TRIS) de Merck y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Panreac, 96%).

##### **Soluciones patrón de ozono**

El ozono se ha generado por paso de oxígeno a través de un ozonizador de laboratorio Sander modelo 301.7. Las distintas soluciones estándar de ozono se han realizado por

dilución de una solución saturada, obtenida por burbujeo del ozono producido en agua MilliQ acidificada con ácido sulfúrico a pH 2, en un frasco colector de 500ml. Un tiempo de 10 minutos es suficiente para obtener la concentración de saturación a una temperatura de trabajo constante de 20°C. Las soluciones estándar diluidas se prepararon también en agua MilliQ a pH 2 para minimizar la descomposición del ozono.

### 3.2.2 Determinación de ion cadmio

#### Soluciones patrón y reactivos

La solución madre de cadmio utilizada para los estudios sin etapa de preconcentración en línea ha sido preparada por pesada rigurosa de Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> de grado analítico de Panreac. Las soluciones menos concentradas han sido obtenidas por dilución sucesiva a partir de la anterior.

Las soluciones patrón para los estudios de las interferencias han sido preparadas por pesada rigurosa de las sales correspondientes. Los reactivos utilizados son de grado analítico. Las soluciones han sido estandarizadas cuando ha sido necesario con el patrón primario adecuado.

La solución portadora ha sido preparada con KNO<sub>3</sub> (Panreac, 98%). Las disoluciones tampón utilizadas se han preparado a partir de las sales correspondientes de calidad analítica.

La solución madre de cadmio, en los estudios de preconcentración, ha sido preparada a partir de una solución de CdCl<sub>2</sub> de 1000,0 mg·l<sup>-1</sup> (Titrisol<sup>®</sup> Merck Art. 9960) en agua. Las soluciones patrón (5·10<sup>-8</sup>-10<sup>-3</sup> M) han sido preparadas diariamente por dilución sucesiva en HNO<sub>3</sub> 0,1% v/v.

El reactivo complejante ha sido preparado a partir de NaCl de Merck y HCl de Panreac (PA, 37%). El eluyente ha sido preparado a partir de la sal NaNO<sub>3</sub> (Merck).

La resina de intercambio iónico empleada fue la AG<sup>®</sup> 1-X8, 200-400 mesh (45-106 µm), en forma de cloruro de BIO-RAD Lab [C.I.E.R.I. Manual].

#### Construcción de los electrodos

En la preparación de la membrana sensora se han utilizado soluciones de Na<sub>2</sub>S y Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> preparadas por pesada a partir de las sales correspondientes de grado analítico,

En la construcción de los electrodos se han utilizado dos tipos de resina. Una resina epoxídica conductora compuesta por EPO-TECH 410 (componente A) y EPO-TECH 410 (componente B) de Epoxy Technology, usada en una proporción de 1,5 g: 0,16 g. Una

resina epoxídica no conductora constituida por Araldite M y endurecedor HR, de Ciba-Geigy, en una proporción 1 g : 0,4 g.

### 3.3 Parámetros de caracterización de los sistemas de detección

#### 3.3.1 Detección espectrofotométrica

En la caracterización de los sistemas experimentales con detección espectrofotométrica realiza con un espectrofotómetro convencional, los parámetros de calidad estimados han sido el límite detección, la repetitividad y reproducibilidad.

##### 3.3.1.1 Límite de detección

El límite de detección de un método puede ser definido como la concentración más pequeña que puede ser determinada por éste con un 95% de confianza [Caulcutt y Boddy, 1983]. El límite de confianza del 95% puede ser modificado por cualquier otro más apropiado en función de las necesidades específicas del análisis. Modificar este límite representa un riesgo y debe relacionarse más con la utilización de los resultados que con la precisión del método.

En los sistemas propuestos en los capítulos 4 y 5 existe el problema de la diferencia de índice de refracción entre la muestra y el reactivo, lo que provoca una absorbancia mayor de la real. Este efecto conocido con el nombre de efecto Schlieren ha sido ampliamente descrito en la bibliografía (§ 1.5). Para minimizar su efecto en la respuesta analítica se ha realizado, en todos los calibrados, un blanco con agua destilada, con el mismo número de replicados que en los patrones. De este modo, la lectura de absorbancia correcta se obtendrá como la diferencia de absorbancia entre la muestra y el blanco.

La concentración de analito se obtiene por interpolación en una recta de calibración del tipo  $y=b\times x$  donde  $y$  es la lectura corregida de absorbancia. Las rectas de calibración obtenidas en los diferentes calibrados efectuados confirman que, para el rango de concentraciones escogido, existe una relación lineal entre éstas y la absorbancia. Confirmando la corrección del blanco realizada, la línea de regresión pasa por el origen.

Antes de estimar el límite de detección es necesario definir un *criterio de detección* de cuál será la lectura correcta para una determinación y hasta qué concentración límite de nitritos se podrá determinar. Para obtener el criterio de detección se ha determinado la desviación estándar de blancos obtenidos por quintuplicado en distintos calibrados realizados en diferentes días. Se ha procedido de esta manera por evitar la necesidad de disponer de valores de blancos pertenecientes al mismo calibrado, como indica Caulcutt. Se han agrupado 10 parejas de estos blancos y se han obtenido el valor del cuadrado de la diferencia entre parejas de blanco.

La desviación estándar correcta de los blancos se calcula como se indica en la ecuación 3.1 [Caulcutt y Boddy, 1983].

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum (dif)^2}{n}} \quad \text{ecuación 3.1}$$

La definición de criterio de detección implica que el 5% de las muestras de concentración cero pueden dar un absorbancia superior al criterio. Se está asumiendo que los errores de las lecturas siguen una distribución normal. Por este motivo, se ha de estimar la desviación estándar utilizando la distribución de Student en el cálculo con 10 grados de libertad, a partir de estos valores se establece el criterio de detección según la ecuación 3.2:

$$\text{criterio de detección} = t_b \cdot s_b \quad \text{ecuación 3.2}$$

Paralelamente se ha de realizar un calibrado para calcular la desviación estándar de una serie de muestras ( $s_p$ ) correspondientes a la concentración estimada como límite de detección, a partir del cálculo de la desviación estándar para una serie de blancos. Un método para estimar esta concentración es suponer que la desviación estándar de un patrón,  $s_p$  es igual a  $s_b$ . A partir de aquí, la lectura de absorbancia correspondiente puede ser calculada con el criterio de detección. Se puede estimar como **criterio de detección**  $\times 2$  y como la desviación estándar del patrón ( $s_p$ ) puede ser mayor que la desviación estándar del blanco ( $s_b$ ) se añade un incremento del 20%, por tanto la lectura mínima de absorbancia será de **criterio de detección**  $\times 2 + 20\% \text{ de este valor}$ . Utilizando la ecuación de la recta de un calibrado se calcula la concentración mínima detectable. Esta corresponde teóricamente a la señal de absorbancia mínima calculada a partir de la desviación estándar de los blancos.

A continuación se realizan 10 replicados de la concentración estimada como límite de detección y se calcula la desviación estándar de la media de estos valores de absorbancia restando previamente el valor del blanco.

La lectura correcta correspondiente al límite de detección (en unidades de absorbancia) se ha calculado de modo que sólo el 5% de las muestras pueden tener una concentración por debajo del límite de detección. Finalmente, el límite de detección viene determinado por la ecuación 3.3, donde la lectura de absorbancia correspondiente al límite de detección es igual a:

$$\text{Señal absorbancia}_{LD} = \text{criterio de detección} + t_p \cdot s_p \quad \text{ecuación 3.3}$$

Sustituyendo el valor de absorbancia mínimo diferenciable de la señal del blanco en la recta de calibración correspondiente se obtiene el valor de límite de detección (ecuación 3.4).

$$Señal de absorbancia_{LD}=b \cdot x$$

ecuación 3.4

En el microsistema desarrollado no se ha detectado el efecto Schlieren (§ 1.5), a pesar de la diferencia de refracción entre las soluciones. Esto es debido tanto al grado de mezcla obtenido en el sistema como a la disminución del camino óptico en el sistema de medida. En este caso, el camino óptico es de 200  $\mu\text{m}$  respecto al convencional de 10000  $\mu\text{m}$ . En este caso el límite de detección ha sido calculado como establece la IUPAC [Inczedy, 1998], ecuación 3.5.

$$Señal_{LD}=S_b + k \cdot s_b$$

ecuación 3.5

A partir de esta señal se calcula la mínima concentración detectable sustituyendo este valor en la recta de calibración.

### 3.3.1.2 Repetitividad y reproducibilidad

El término repetitividad hace alusión a la correspondencia existente entre sucesivos resultados obtenidos al analizar una misma muestra mediante un mismo método y bajo las mismas condiciones experimentales. La reproducibilidad, en cambio, hace referencia a condiciones más heterogéneas, ya sea por cambios en el operario, pequeñas modificaciones en el sistema de medida (por ejemplo, cambio de columna de preconcentración, tubos de bomba, etc.) o bien por el muestreo en diferentes períodos de tiempo (cada tres días, semanal, etc.).

En esta memoria, la repetitividad se ha evaluado realizando diferentes análisis de una misma muestra utilizando el mismo sistema de medida a lo largo de un día. Por otra parte, la reproducibilidad se ha determinado estudiando el comportamiento del sistema a lo largo del tiempo.

La repetitividad se ha determinado realizando 10 medidas de un estándar central dentro del intervalo de respuesta lineal y calculando el error estándar relativo como  $RSD (\%) = [s_{n-1}/\text{media}] \times 100$ . De esta manera se ha estimado si existen diferencias significativas para una concentración intermedia en la zona del calibrado.

La reproducibilidad de los métodos propuestos, se ha obtenido por comparación de las pendientes de calibrados realizados en días diferentes en idénticas condiciones de operación. Esta comparación se ha realizado aplicando el análisis de varianza de un factor, ANOVA. Como resultado de este tratamiento puede decirse si existen o no existen diferencias significativas entre las pendientes obtenidas en diferentes días, según la relación de valores del estadístico F calculado. Cuando el valor de  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tabulada}}$ , se ha considerado que el sistema es reproducible y se ha aceptado la hipótesis nula: las medias

de las pendientes no difieren significativamente. Por tanto, el método propuesto es reproducible.

### 3.3.2 Detección potenciométrica

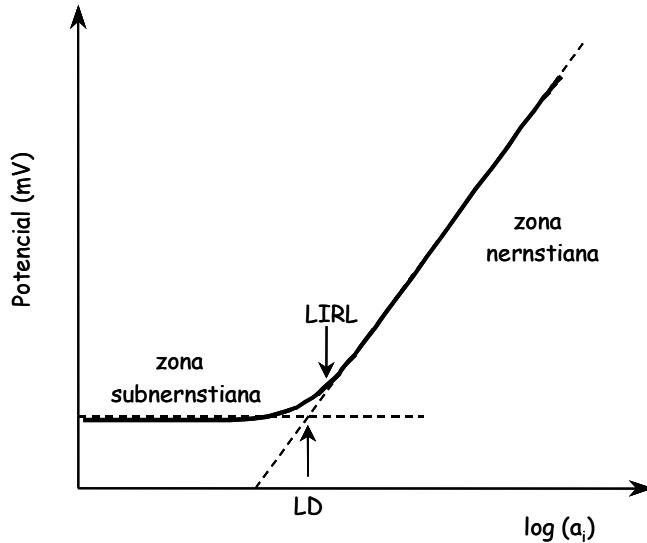
En la caracterización del detector potenciométrico se ha utilizado una metodología de evaluación análoga a la propuesta para los electrodos en configuración convencional, ya que no existe una metodología definida para la evaluación de las características operacionales de los electrodos incorporados en sistemas de flujo. Para ello se ha utilizado el sistema SIA de baja dispersión propuesto en el capítulo 6.

Se han evaluado un conjunto de parámetros de calibración típicos, que incluyen la determinación de la pendiente de las rectas de calibración, el límite inferior de respuesta lineal (LIRL) y los valores de repetitividad y estabilidad de los potenciales a lo largo del tiempo. Se ha evaluado del grado de interferencia de diferentes iones en la respuesta de los sensores mediante la determinación de los coeficientes de selectividad potenciométricos, así como la influencia del pH en el valor de potencial suministrado por estos.

El elemento sensor de los electrodos de membrana cristalina se compone de cristales iónicos de sales poco solubles. El electrodo de membrana cristalina sensible a cadmio utilizado consiste en una membrana cuyo sensor está constituido por una mezcla de CdS/Ag<sub>2</sub>S en proporción molar 1:10. Se trata por tanto de una membrana homogénea policristalina. En este caso la conducción eléctrica se realiza mediante el catión Ag<sup>+</sup> que transporta una carga eléctrica por ion y tiene un radio pequeño. Durante la conducción, los iones adyacentes móviles migran a las vacantes (defectos del cristal) de su estructura, mientras que otros iones no se pueden mover debido a la barrera de la red cristalina. Para esta clase de electrodos, el potencial de difusión de los iones dentro de la membrana se puede, generalmente, menospreciar. En consecuencia, el origen del potencial de membrana es comparativamente simple. El comportamiento de estos sensores es similar al de los electrodos de segunda especie.

Los electrodos selectivos de iones son sensores electroquímicos, cuyo potencial depende tanto de la concentración como del tipo de especies químicas presentes en solución. Mediante la medida de diferencia de potencial que se establece entre el electrodo indicador y un electrodo de referencia puede determinarse la actividad o, si la fuerza iónica está ajustada, la concentración de la especie libre en solución.

La curva de calibración de un ESI en discontinuo se construye representando el potencial medido frente del logaritmo de la actividad (a<sub>i</sub>) (figura 3.1). Se observa la existencia de dos zonas diferentes: una zona lineal o nernstiana y otra no lineal o subnernstiana.



**Figura 3.1** Representación de una curva de calibración de un ESI sensible a un catión. LD: límite de detección, LIRL: límite inferior de respuesta lineal y  $a_i$ : actividad del ion principal.

En todos los calibrados se utiliza la misma metodología de cálculo para determinar los diferentes parámetros que definen las características de funcionamiento de las membranas sensoras. Los cálculos se realizan utilizando el paquete gráfico *Sigma Plot 8.0* que utiliza el algoritmo de Marquardt-Levenberg [Rao, 1987] y el programa *Excel 7.0*.

En el tratamiento básico de los datos se hace uso de la ecuación de Nernst:

$$E = cte + B_1 \cdot \log a_i \quad \text{ecuación 3.6}$$

donde  $E$  es el potencial que se obtiene después de cada adición, expresado en mV y  $a_i$  es la actividad de ion principal. El término  $B_1$  es la sensibilidad del ESI en el tramo lineal (zona nernstiana) (ver figura 3.1). Los coeficientes de esta expresión se obtienen por regresión lineal. La pendiente de la recta es positiva cuando el electrodo es sensible a un catión o negativa cuando es sensible a un anión. Para realizar los ajustes no lineales se hace uso de otras dos expresiones:

$$E = cte + B_2 \log(a_i + \sum K_{Cd^{2+},j}^{pot} a_j^{z_j/z_i}) \quad \text{ecuación 3.7}$$

$$E = cte + B_3 \cdot \log(a_i + C) \quad \text{ecuación 3.8}$$

Con el uso de los ajustes no lineales, los cálculos son de mayor complejidad, pero los resultados que se obtienen tienen mayor importancia práctica, ya que es en esta zona donde se puede distinguir con mayor facilidad la pérdida de sensibilidad del sensor. Los términos  $B_2$  y  $B_3$  son la sensibilidad del sensor, incluyendo toda la curva de calibración, o sea, la zona lineal y la zona no lineal de respuesta,  $a_j$  y  $z_j$  son la actividad y la carga del ion interferente,  $K^{pot}$  es la constante de selectividad potenciométrica que da una medida directa

de la interferencia provocada por la especie interferente (j) sobre el ion principal (i) (ion cadmio en este caso, z=2).

El término C en la expresión 3.8 se define como:

$$C = LD_{ap} + \sum K_{Cd^{2+},j}^{pot} a_j^{\frac{z}{z_i}} \quad \text{ecuación 3.9}$$

donde  $LD_{ap}$ , es una constante empírica obtenida durante el ajuste por regresión de los datos que se define como el límite de detección aparente ( $LD_{ap}$ ). Esta constante no coincide con el LD clásico que define la IUPAC [Guilbault y Durst, 1976].

En la expresión 3.7 se ha despreciado el término  $LD_{ap}$  ya que en presencia de un fondo iónico se considera que el término coeficiente de selectividad potenciométrico por la actividad del ion interferente es mucho mayor que el límite de detección aparente. En estas condiciones, y desde un punto de vista práctico, el límite de detección dependerá del nivel de interferente presente en la disolución. Por ello, en presencia de interferente se utiliza la expresión 3.7.

### 3.3.2.1 Caracterización de los electrodos selectivos de iones integrados en sistemas de flujo

Para realizar las calibraciones de los electrodos integrados en sistemas de flujo se preparan diferentes disoluciones de analito de concentraciones perfectamente conocidas, de manera que cada patrón se inyecta secuencialmente en el sistema. Los patrones se inyectan de menor a mayor concentración para evitar la saturación de las membranas sensoras.

La representación de la altura del pico obtenida por inyección del patrón (H) respecto a la línea base, frente al logaritmo de actividad ( $\log a_i$ ) permite obtener las curvas de calibración. La respuesta sigue el modelo predicho por la ecuación de Nernst:

$$H = cte + B_1 \log a_i \quad \text{ecuación 3.10}$$

Dado que en los sistemas de flujo se trabaja, normalmente, con una disolución acondicionadora de una concentración salina elevada, el coeficiente de actividad, calculado a partir de la ecuación de Debye-Hückel, se puede considerar constante,

$$-\log \gamma = \frac{0,5 \cdot z_i^2 l^{1/2}}{1 + l^{1/2}} \quad \text{ecuación 3.11}$$

$$I = 0,5 \sum (c_i \cdot z^2) \quad \text{ecuación 3.12}$$

siendo  $z_i$  la carga del ion principal, I la fuerza iónica de la disolución y  $c_i$  la concentración del ion principal.

Una vez considerado que el coeficiente de actividad es constante, la ley de Nernst se modifica ya que el potencial variará en función del logaritmo de la concentración y no del logaritmo de la actividad del analito. Así la expresión que caracteriza la zona de respuesta nernstiana será la siguiente:

$$H = cte + B_1 \cdot \log c_i \quad \text{ecuación 3.13}$$

En nuestro caso, cuando se trabaje en la zona de respuesta no lineal se utilizará la expresión que involucra esta zona de trabajo,

$$H = cte + B_3 \cdot \log(c_i + C) \quad \text{ecuación 3.14}$$

La curva de calibración que se obtiene es similar a la representada en la figura 3.1, pero en lugar de representar el potencial se representa la altura de pico (H, mV) frente al logaritmo de la concentración del analito.

### 3.3.2.2 Características de respuesta de los electrodos selectivos de iones

#### **Sensibilidad o pendiente de la curva de calibración**

La definición más sencilla de este parámetro es aquella que acepta la IUPAC como la pendiente de la curva de calibración [Guilbault y Durst, 1976]. La pendiente de la recta de calibrado (B) es uno de los parámetros más importantes a determinar cuando se comparan diferentes electrodos o sistemas de flujo, ya que se utiliza como criterio discriminatorio para determinar el tiempo de vida útil de un dispositivo sensor.

Para un ion monovalente, el valor teórico de la pendiente en la zona lineal de la curva de calibración es de  $59 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$  mientras que para un ion divalente, la pendiente teórica sería de  $29,5 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Si las pendientes son menores se habla de rectas subnernstianas, que es el caso más habitual o rectas supernernstianas cuando estas son mayores.

#### **Límite inferior de respuesta lineal (LIRL)**

El límite inferior de respuesta lineal se define como el valor mínimo de actividad del ion principal, a partir del cual la respuesta del electrodo tiene un comportamiento nernstiano (ecuación 3.6).

Teniendo en cuenta que no existe un criterio generalizado para la determinación de este parámetro, se utiliza el procedimiento descrito por Hara et al. [1994]. En dicho trabajo se propone un criterio basado en el seguimiento de un parámetro estadístico que es el coeficiente de correlación de Pearson (r).

En el caso de las calibraciones realizadas en sistemas de flujo, el criterio establecido para fijar el intervalo lineal es realizar el ajuste lineal de todos los valores H (mV) y

concentraciones de que se dispone y realizar un ajuste por mínimos cuadrados de los datos hasta obtener un coeficiente de regresión lo más próximo a 1 ( $> 0,99$ ).

### **Límite de detección (LD)**

Existe una gran diversidad de criterios en cuanto al límite de detección en potenciometría. Por analogía a las definiciones adoptadas en otros campos, se define este parámetro como la concentración de analito a partir de la cual, el potencial (E) se desvía en un múltiplo arbitrario del error estándar del potencial medio correspondiente a la región de bajas concentraciones (zona subnernstiana) (figura 3.1).

Por cuestiones prácticas, la IUPAC [1997] hace una definición más simple y conveniente de este parámetro, definiéndolo como la actividad (o concentración) de ion principal que corresponde al punto de intersección entre la extrapolación de la recta con comportamiento nernstiano y el segmento inicial de bajas concentraciones, normalmente horizontal (ver figura 3.1).

Otra definición aceptada del límite de detección es aquella que se deriva de aplicar métodos no lineales de ajuste. Este tipo de regresión no lineal (ecuación 3.8) permite ajustar todos los datos experimentales, incluido aquellos valores inferiores al límite inferior de respuesta lineal.

$$E = cte + B_3 \cdot \log(a_i + C) \quad \text{ecuación 3.8}$$

El término  $B_3$  constituye la sensibilidad del sensor en todo el intervalo de calibración (zona lineal y no lineal) y el parámetro  $C$  engloba dos factores, el límite de detección aparente y la existencia de posibles interferencias.

$$C = LD_{ap} + \sum K_{Cd^{2+},j}^{pot} a_j^{2/z_j} \quad \text{ecuación 3.15}$$

A lo largo de todo este trabajo se ha utilizado este tipo de ajuste no lineal para establecer el límite de detección, siguiendo la metodología establecida en nuestro grupo de trabajo [Fonseca, 2003].

### **Coeficientes de selectividad potenciométrica**

De acuerdo con la de Nikolskii-Eisenmann (ecuación 3.7), el potencial depende no sólo de la actividad del ion principal sino también de la concentración del coeficiente de selectividad potenciométrica ( $K^{pot}$ ) de todas las especies en solución.

La aplicabilidad analítica de los electrodos selectivos de iones normalmente está comprometida por su selectividad. El coeficiente de selectividad potenciométrico,  $K^{pot}$ , está definido por la IUPAC [Umezawa et al., 2000] como la capacidad de un electrodo

selectivo de iones de distinguir una especie iónica de otras presentes en solución y, cuanto menor es este valor mayor es la preferencia del electrodo por el ion primario.

La determinación de este parámetro en SIA, se ha realizado utilizando el método de la soluciones mezcladas [Alegret et al., 1985] mediante el método de fijado del ion principal. En este método se mide la variación de potencial, entre el electrodo indicador y el de referencia, en soluciones de actividad de ion primario constante y de ion interferente variable, a fuerza iónica constante. Los valores de diferencia de potencial obtenidos se representan gráficamente frente al logaritmo de la actividad del ion interferente. Por intersección de la extrapolación de las zonas lineales de la curva obtenida se obtienen los valores de concentración de ion interferente  $c_j$ . Estos valores se utilizan en el cálculo  $K^{pot}$ , según la ecuación 3.16

$$K_{i,j}^{pot} = \frac{c_i}{c_j} \quad \text{ecuación 3.16}$$

Sí  $z_i = z_j$ , la ecuación asume la forma siguiente:

$$K_{i,j}^{pot} = \frac{c_i}{c_j} \quad \text{ecuación 3.17}$$

Según Pungor y Tóth [1969], en el caso de los electrodos de membrana cristalina, el valor de  $K^{pot}$  puede ser previsto por la razón de los productos de solubilidad de la sal constituyente de la membrana del electrodo (AgI) y de la sal de ion interferente (AgJ), pudiendo ser expresado por la ecuación 3.18,

$$K_{i,j}^{pot} = \frac{K_{ps} \text{AgI}}{K_{ps} \text{AgJ}} \quad \text{ecuación 3.18}$$

Esta misma relación ha sido utilizada para la comparación de los valores de los coeficientes de selectividad potenciométrica teóricos previsibles y los valores obtenidos experimentalmente con los electrodos construidos.

Los valores experimentales obtenidos dependen de las condiciones en que se ha realizado el estudio, es decir del tipo de metodología utilizada en la evaluación de este coeficiente, del estado físico de las membranas y de las concentraciones de los iones, principal e interferente en las soluciones analizadas. Por tanto, realmente sólo da idea del orden de magnitud o extensión de la interferencia. Dado que el objetivo de este trabajo es valorar si existen diferencias en las características operacionales de la respuesta de los electrodos implementados en la metodología SIA, respecto a los estudios anteriores llevados acabo con el mismo tipo de electrodos pero en sistemas de flujo basados en la técnica FIA [Ferreira, 1994; Couto, 1999], se ha optado por escoger una metodología semejante.

El procedimiento seguido en la evaluación de este parámetro ha consistido en la inyección secuencial, en el sistema SIA, de soluciones de concentración constante de ion primario y concentraciones crecientes de ion interferente. De este modo se ha efectuado el estudio en un intervalo suficientemente amplio de concentraciones de ion interferente. Con los valores de potencial registrados se ha realizado un gráfico de potencial en función del logaritmo de la concentración de ion interferente, realizándose el cálculo del coeficiente de selectividad potenciométrico como se ha indicado antes (ecuación 3.17). El valor de  $K^{pot}$  ha sido determinado por la intersección de la extrapolación de los dos segmentos lineales de la curva, obtenida por representación gráfica. Estos estudios han sido realizados utilizando dos unidades tubulares distintas.

### **Estabilidad y repetitividad de los potenciales**

La estabilidad de los electrodos ha sido evaluada realizando distintas curvas de calibración a lo largo de un día de trabajo y calculando después la variación de potencial para diferentes niveles de concentración, en la zona de respuesta lineal del electrodo. Para esta evaluación se han determinado las respectivas curvas de calibración, se ha calculado su pendiente y el coeficiente de correlación cuadrático.

La repetitividad ha sido evaluada calculando la desviación estándar de las señales analíticas obtenidas, después del análisis sucesivo de soluciones de concentración conocida, correspondientes a concentraciones intermedias de la zona de respuesta lineal del electrodo. El número de repeticiones ha sido 16 para los estudios sin etapa de preconcentración y 10 para el sistema con etapa de preconcentración en línea.

### **Tiempo de vida de los electrodos**

Para la evaluación de este parámetro se han realizado calibrados sucesivos, a lo largo del tiempo, en el intervalo de concentración correspondiente a la zona lineal de respuesta del electrodo. Se han determinado los valores de pendiente, los coeficientes de regresión lineal y la estabilidad de los potenciales de los electrodos.

Los electrodos se han considerado inutilizados cuando después del pulimento y acondicionamiento, la respuesta del electrodo se mantenía degradada, lo que se concretaba en tiempos de recuperación de la línea de base era muy altos, sensibilidades bajas, LIRL en aumento y estabilidad de los potenciales alterada (más de 2 mV).

### **Tiempo de respuesta**

La velocidad de respuesta de los electrodos en el sistema SIA ha sido evaluada como el tiempo necesario para que el sensor alcance el 95 % de la variación total de la señal

después de efectuada una inyección de patrón. El tiempo de respuesta ha sido evaluado para concentraciones bajas y altas dentro del intervalo de respuesta lineal del electrodo.

### **Evaluación del pH**

La evaluación de la influencia del pH sobre la respuesta de los electrodos selectivos de iones es otro de los parámetros a tener en cuenta en la caracterización de cualquier sensor. Para llevar a cabo este estudio, se ha medido la señal suministrada por el electrodo en el sistema SIA al analizar una disolución patrón donde se hacían adiciones sucesivas de soluciones saturadas de NaOH o HNO<sub>3</sub>. El volumen de disolución patrón era de 250 ml. Después de cada adición de ácido o base se tomaba muestra y se analizaba en el sistema de flujo. El elevado volumen utilizado de solución patrón permite asegurar que la concentración del ion principal a lo largo del estudio permanezca constante. Mediante la representación de la variación del potencial en función del pH se obtienen los denominados diagramas Reilley que ayudan a establecer el intervalo de pH útil del sensor.

### **Etapa de preconcentración en línea**

El factor de preconcentración (FP) expresa la efectividad del proceso de preconcentración [Lancaster et al., 1994] y no es más que la ganancia neta obtenida en términos de concentración del analito, al comparar un sistema directo con un sistema con preconcentración.

En la literatura aparecen descritos diversos métodos para calcular el FP [Baker, 1994; Lancaster et al., 1994; Santelli y col, 1994]. En los métodos espectrofotométricos este factor se expresa como la relación que existe entre las sensibilidades (pendiente de la recta de calibrado) del sistema directo y el sistema con preconcentración.

En cambio, en este caso, y siguiendo las recomendaciones sugeridas en los métodos espectrofotométricos, el factor de preconcentración se expresará como el cociente entre los límites de detección del sistema directo y el sistema con preconcentración [Martínez-Barachina et al., 1999], tal y como lo expresa la ecuación 3.19:

$$FP = \frac{LD_{directo}}{LD_{preconcentración}} \quad \text{ecuación 3.19}$$

Se ha de considerar que en potociometría la sensibilidad es siempre constante (en ambos sistemas), lo cual provocaría que el factor de preconcentración siempre fuese 1. En cambio utilizando la comparación de los límites de detección se puede evaluar la mejora obtenida al introducir la etapa de preconcentración en el sistema.

### 3.4 Bibliografía

- Alegret, S.; Alonso, J.; Bartroli, J.; Lima, J.L.F.C.; Machado, A.A.S.C.; Paulis, J.M.** “Flow-through sandwich PVC matrix membrane electrode for flow injection analysis”, *Analytical Letters*, **18** (A18), 2291-2303, (1985).
- APHA-AWWA-WPCF.** “Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales”. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, (1992).
- Baker, J.T.** “Solid phase extraction for simple preparation: a technical guide to theory, method development and use”, J. T. Baker Inc, (1994).
- Caulcutt, R.; Boddy, R.** “Statistics for analytical chemists”, Ed. Chapman and Hall, London-New York, (1983).
- Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual**, Bio-Rad Laboratories, 1414 Harbor Way South, Richmond, CA 94804.
- Couto, C.M.C.M.** “Desenvolvimento e aplicação de sistemas de fluxo contínuo de alta sensibilidade com detecção potenciométrica”. **Dissertação de Doutoramento**, Faculdade de Farmacia, Universidade do Porto, (1999).
- Ferreira, I.M.P.L.V.O.** “Construção, avaliação e aplicação de detectores potenciométricos tubulares para FIA baseados em membranas cristalinas homogéneas”. **Dissertação de Doutoramento**, Faculdade de Farmacia, Universidade do Porto, (1994).
- Fonseca, O.** “Desarrollo de un analizador automático para la determinación del ion plomo en muestras medioambientales”, **Tesis doctoral**, Universitat Autònoma de Barcelona, (2003).
- Guilbault, G.G.; Durst, R.A.** “IUPAC recommendation for nomenclature of ion-selective-electrodes”, *Pure and Applied Chemistry*, **48**, 127, (1976).
- Hara, H.; Takahashi, K.; Ohkubo, H.** “Nitrate ion-sensitive field effect transistor based on bis(bathocuproin)-copper(I) nitrate dissolved in solid solvents”, *Analytical Chimica Acta*, **290** (3), 329-333, (1994).
- Incze, J.; Lengyel, T.; Ure, A.M.** “Compendium of Analytical Nomenclature (definitive rules 1997)”, 3<sup>rd</sup> edition, Blackwell Science, (1998).  
Acceso en línea: [http://www.iupac.org/publications/analytical\\_compendium/](http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/)
- Lancaster, H.L.; Marshall, G.D.; Gonzalo, E.R., Ruzicka, J.; Christian, G.D.** “Trace metal atomic absorption spectrometric analysis utilizing sorbent extraction on polymeric-based supports and renewable reagents”, *Analyst*, **119** (7), 1459-1466, (1994).
- Linder, E.; Tóth, K.; Pungor, E.** “Response time curves of ion-selective electrodes”, *Analytical Chemistry*, **48** (7), 1071-1078, (1976).
- Martínez-Barachina, S.; Alonso, J.; Matia, Ll.; Prats, R.; del Valle, M.** “Determination of trace levels of aionic surfactants in river water and wastewater by a flow injection analysis system with on-line preconcentration and potentiometric detection”, *Analytical Chemistry*, **71**, 3684-3691, (1999).
- Pungor, E.; Tóth, K.** “Selectivity of ion-specific membrane electrodes”, *Analytical Chimica Acta*, **47** (2), 291-297, (1969).
- Rao, S.S.** “Optimization. Theory and its applications”, 2nd edition. John Wiley & Sons, New Delhi, (1987).
- Santelli, R.E.; Gallego, M.; Valcárcel, M.** “Preconcentration and atomic absorption determination of copper traces in waters by on-line adsorption-elution on an activated carbon minicolumn”, *Talanta*, **41** (5), 817-823, (1994).

**Umezawa, Y.; Bühlmann, P.; Umezawa, P.; Tohda, K.; Amemiya, S.** “Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations (Technical Report)”, *Pure and Applied Chemistry*, **72** (10), 1851-2082, (2000).

**Welcher, F.** “Chemical Solutions”. E.d. D. Van Nostrand Company, INC., New Jersey, (1966).

**r-FIA**



# Capítulo 4

---

## *Determinación de ion nitrito mediante r-FIA. Aplicación al análisis de ozono*

---

### 4.1 Introducción

En los últimos años, se ha desarrollado nueva instrumentación que ha permitido conseguir un elevado grado de automatización en numerosas etapas del procedimiento analítico (muestreo, pretratamiento, medida, etc.). La incorporación de las metodologías de flujo continuo ha facilitado las condiciones necesarias para la integración, en un único equipo automatizado, de todas estas etapas. Finalmente, la aplicación de la microelectrónica y la informática con las ventajas correspondientes en términos de capacidad de control automático, adquisición, tratamiento e interpretación de señales, ha permitido cerrar el ciclo metodológico completamente para llegar al analizador automatizado dedicado, con funcionamiento autónomo.

La técnica de análisis por inyección en flujo ha sido utilizada ampliamente en la automatización de procesos de análisis rutinarios. Esta técnica ha alcanzado una enorme popularidad por su simplicidad instrumental y sencillez operacional. Sin embargo, esta técnica de flujo no posee la capacidad de adecuarse, sin intervención externa, a condiciones variables en la composición de la muestra a analizar cuando estas provoquen alteraciones no previstas durante el diseño del sistema [Peris et al., 1997].

Las ventajas y el alto potencial de aplicación de la técnica FIA [Ruzicka y Hansen, 1975], ha hecho que hasta el año 2002 se hallan publicado más de 12000 artículos de investigación, y más de 15 monografías sobre el tema, demostrando el enorme impacto de esta metodología en la química analítica actual [www.flowinjection.com].

A pesar de las ventajas, una de las limitaciones (restricciones) que presentan habitualmente los sistemas FIA convencionales es su intervalo de aplicabilidad. Los sistemas están diseñados para trabajar en condiciones óptimas de sensibilidad en unas zonas de concentración determinadas. Esto puede resultar un inconveniente cuando se analizan muestras de distinta procedencia o aguas naturales, ya que pueden encontrarse en un intervalo de concentración más amplio. En un sistema FIA convencional, si se desea trabajar en diferentes intervalos de concentración del analito en la muestra, han de optimizarse diferentes variables hidrodinámicas [Betteridge et al., 1986], como el caudal, volumen de inyección, etc.; incrementar el número de canales o introducir módulos adicionales (sistemas de preconcentración, cámaras de dilución, etc.). Es decir, modificaciones en su configuración física que limitan nivel de funcionamiento automático y autónomo, en definitiva su versatilidad.

El objetivo de este capítulo es, partiendo de un sistema FIA monocanal de referencia, introducir diferentes modificaciones que permitan obtener un sistema de flujo completamente automatizado capaz de autoajustar su intervalo de trabajo.

En primer lugar se han estudiado los procesos de dispersión que se verifican tanto en el sistema de referencia como en el sistema modificado. Posteriormente se ha implementado y optimizado un sistema FIA reverso (r-FIA) [Valcárcel y Luque de Castro, 1984] utilizando como reacción modelo la de determinación de ion nitrito. En este sistema se introduce una variante importante respecto a los sistemas básicos FIA que consiste en la inyección del reactivo en un canal portador por el que circula la muestra. Esto permite, entre otras ventajas, la automatización de sistemas de análisis en los que el consumo de muestra no es crítico frente al consumo de reactivos. Se han realizado estudios comparativos substituyendo la válvula de inyección por una microbureta automática como dispositivo de inserción de reactivo, y finalmente se ha validado el método de inyección alternativo mediante su aplicación en el análisis automático de ion nitrito en dos intervalos de concentración diferentes.

A continuación, en la segunda parte de este capítulo se ha aplicado el sistema propuesto r-FIA en el análisis de ozono en agua mediante la incorporación de una etapa de difusión gaseosa. También se detalla una breve introducción respecto a la implementación de la técnica de difusión gaseosa en FIA.

La difusión gaseosa es una técnica de separación que explota la volatilidad de un compuesto. El componente volátil, que es generado normalmente por una reacción en el sistema de flujo, se difunde desde el canal dador, a través de una membrana hidrofóbica permeable a gas, hacia un canal aceptor donde una segunda reacción lo transforma en una especie detectable. Esta técnica ha sido aplicada para separar muchos compuestos volátiles:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{HSO}_3/\text{SO}_3^{2-}$  y  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$  [Kubán, 1992]. Las ventajas de la difusión gaseosa incluyen: ajuste fácil del tiempo de residencia de la muestra en la celda de difusión, respuesta rápida, alta frecuencia de análisis y, la más importante, el aumento de selectividad. Esta última ventaja se deriva de la capacidad de separar el analito de las interferencias no volátiles de la matriz de la muestra.

Existen distintos tipos de membranas semipermeables utilizadas en FIA en función del proceso de separación elegido. Las membranas no porosas y las microporosas son las utilizadas con mayor frecuencia en procesos de difusión de gases en FIA (DG-FIA). Este tipo de membranas permiten la determinación de gases, substancias muy volátiles y especies gaseosas producidas en el propio sistema. Las membranas microporosas son de materiales diversos como Teflón, difluoruro de polivinilideno (PVDF), celulosa, ésteres de celulosa y otros materiales. Como alternativas más económicas a las de PTFE y PVDF se pueden utilizar membranas de polipropileno, nylon, copolímero vinil/acrílico, y algunas veces papeles hidrofóbicos, que tienen, además, una buena resistencia mecánica y química, pocas impurezas, y resistencia a temperaturas altas.

El proceso de difusión depende de diferentes factores como son las características de la membrana (tamaño del poro, porosidad y geometría) y las condiciones experimentales utilizadas (caudal, tiempo de intercambio, temperatura, presión, composición del aceptor y especialmente de la volatilidad del gas). Distintas membranas hidrofóbicas microporosas han sido utilizadas para separar distintas especies. En concreto, el PTFE ha sido utilizado con buenos resultados en la separación  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HCN}$  y  $\text{NH}_3$  [Alegret et al., 1989, 1990]. El PVDF presenta una alta eficacia en la separación de gases como  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HCOOH}$  y  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pero menor para moléculas mayores [Kubán, 1992]. Recientemente una membrana de PVDF ha sido utilizada en el análisis de  $\text{SO}_2$  en vinos con un sistema DG-FIA. Los resultados obtenidos fueron comparables a los del método estándar [Bartrolí et al., 1991; Kubán et al., 1998].

La cloración ha sido el método más utilizado para la desinfección y purificación de agua potable. Sin embargo, el proceso de cloración lleva asociada la formación de compuestos orgánicos clorados potencialmente tóxicos que pueden afectar incluso a bajas concentraciones a larvas de peces y otras formas de vida. Como método alternativo a la cloración para la desinfección de aguas potables se está utilizando la ozonización. Este

procedimiento tiene el inconveniente de que la concentración residual de ozono en agua después del proceso de desinfección es muy baja. En este sentido, el cloro pervive en mayor concentración incluso durante el tiempo de almacenaje.

El método colorimétrico del índigo (trisulfonato potásico de índigo) es el estándar para la determinación de ozono residual en agua. Se basa en la decoloración de una solución ácida de índigo por reacción con ozono. La disminución de absorbancia es proporcional a la concentración de ozono. La constante de proporcionalidad es  $0,42 \pm 0,01 \text{ cm/mg}\cdot\text{l}$ . Se trata de un método cuantitativo, selectivo y simple, con un límite de detección de 10 a 20  $\mu\text{g O}_3/\text{l}$  que permite trabajar en dos intervalos de concentración: 0,01-0,1 mg  $\text{O}_3/\text{l}$  y 0,05-0,5 mg  $\text{O}_3/\text{l}$ . Las principales interferentes son  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Mn (II),  $\text{Cl}_2$  y  $\text{Br}_2$  debido a que decoloran al índigo directamente o indirectamente tras ser oxidados por el ozono [APHA-AWWA-WEF, 1999].

Se han propuesto diversos métodos para el análisis de ozono residual basados en la técnica FIA aunque utilizando diversas estrategias. Así se encuentran técnicas yodométricas basadas en la reducción del ion yoduro en presencia de ozono [Machado et al., 1995] o técnicas basadas en la degradación de un reactivo coloreado en presencia de ozono [Straka et al., 1984; Onari, 1994]. También se ha descrito sistemas FIA que incluyen membranas de difusión gaseosa. En el primer sistema FIA con difusión gaseosa para la determinación de ozono se evaluaron dos tipos de membranas hidrofóbicas: *homogénea o no porosa* de dimetil silicona y *microporosa* de Teflón® (politrettafluoruro de etileno, PTFE) [Straka et al., 1985]. En dicho estudio se utilizaron dos reactivos reductores, trisulfonato potásico de índigo y bis(terpiridina) de Hierro (II). Se evaluó la sensibilidad, el intervalo lineal y el límite de detección con ambas membranas, así como el grado de eliminación de interferencias. Los oxidantes estudiados como interferentes fueron cloro, manganeso y peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos mostraron que la membrana de dimetil silicona, a pesar de su permeabilidad, necesitaba un tiempo de contacto previo para que se produjese la difusión que, además, dependía de la concentración de ozono. Todo ello complicaba su utilización provocando que el sistema fuera poco repetitivo. Por el contrario, la difusión de ozono a través de la membrana de Teflón era proporcional al tiempo de contacto, y se observó un aumento de sensibilidad al incrementar éste ya que se producía más difusión de ozono, aumentando por tanto la señal. Además las interferencias de Mn (VII) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  se eliminaron con la membrana hidrofóbica. El cloro no era eliminado totalmente pero se redujo a 0,8-0,9 % el error por ppm de  $\text{Cl}_2$ . Con este sistema DG-FIA se obtuvo un intervalo lineal entre 0,03-0,4 mg  $\text{O}_3/\text{l}$ .

Existen estudios más recientes basados también en la reacción del trisulfonato potásico de índigo con ozono, en un sistema DG-FIA, que han permitido disminuir el límite de detección a 0,010-0,020 mg O<sub>3</sub>/l [Darby et al., 1995].

## 4.2 Descripción del sistema

A continuación se detallan las características de los equipos, materiales y elementos utilizados en la implantación de los sistemas FIA de referencia, r-FIA para el análisis de ion nitrito y la aplicación posterior del sistema modificado para el análisis de ozono en aguas.

### 4.2.1 Instrumentación

El sistema de referencia utilizado (figura 4.1) está constituido por los elementos tradicionales de un sistema FIA. Las características de estos elementos se detallan a continuación.

- *Válvula de inyección de 6 vías*: Omnifit modelo 1106.
- *Bomba peristáltica*: Gilson Minipuls 3. Los tubos de bomba son de PVC de Elkay.
- *Tubo de conexión/reacción*: tubos de PTFE de Tecator de diversos diámetros internos y longitudes, función de las diferentes condiciones experimentales.
- *Detector*: espectrofotómetro de haz simple 4049 LKB Novaspec Biochrom.
- *Celda de flujo del espectrofotómetro*: Hellma modelo 178.111 de 1 cm de camino óptico y volumen interno 8  $\mu$ l.
- *Adquisición de datos*: un registrador Metrohm E586 Labograph. Las lecturas de absorbancia se han realizado a 550 nm en los estudios sin reacción química y 555 nm en los estudios con reacción química.

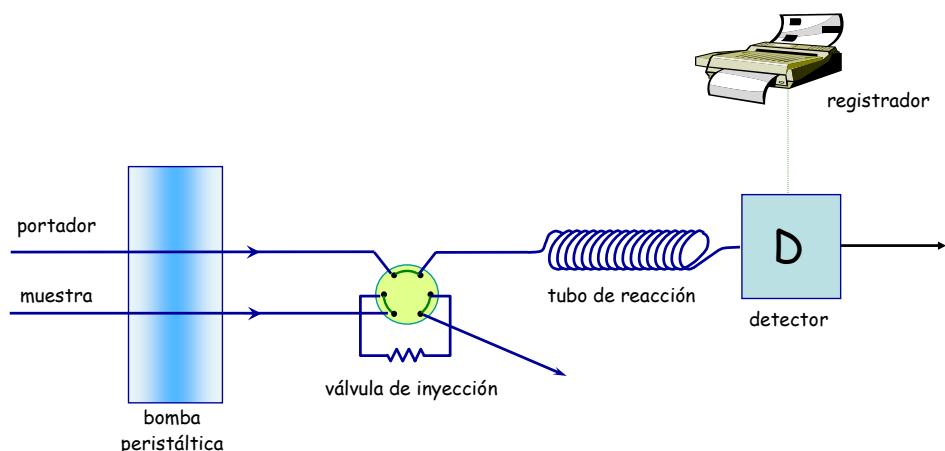


Figura 4.1 Sistema FIA monocanal de referencia.

En el segundo sistema utilizado se ha substituido la válvula de 6 vías por una microbureta automática Crison Instruments modelo Microbur 2030, equipada con una jeringa de 2,5ml, siendo la adición mínima de 25  $\mu$ l (precisión del 1%). La bureta está controlada por un programa de (dosificación) inyección variable gestionado por un PC Toshiba T1000, comunicado con la microbureta, por una interfase RS-232 (figura 4.2).

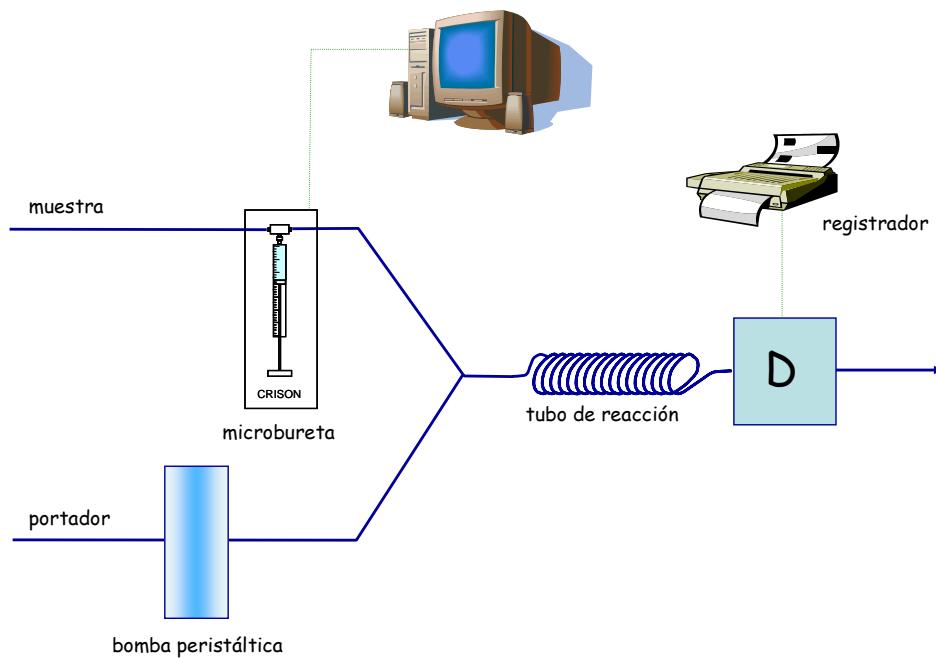


Figura 4.2 Sistema FIA con microbureta automática como elemento de inyección.

En el primer sistema de flujo, el volumen de inyección viene determinado por el tamaño del bucle y en el segundo sistema por el recorrido de la jeringa. Las condiciones geométricas del sistema son distintas para el sistema sin reacción química y el sistema con reacción química. Los sistemas utilizados en este último caso son los mismos (figuras 4.1 y 4.2), con la única diferencia de la variante FIA implementada, el FIA reverso (§ 1.3.1), realizándose la inyección de reactivo en un canal portador de muestra.

Para la determinación de ozono en aguas, el sistema r-FIA ha sido modificado mediante la incorporación de una celda de difusión de gases situada en un segundo canal por el que fluye la muestra. La solución aceptora de ion nitrito sale de la celda de difusión gaseosa y confluye con el reactivo inyectado, el resto del sistema es igual que en los estudios anteriores. La celda de difusión está formada por dos piezas de metacrilato que sujetan la membrana. Ésta queda atrapada entre dos tiras de plástico pegadas, con una canal central de  $7,2 \times 0,25 \text{ cm}^2$  y un grosor de 0,4 mm que definen las dimensiones del canal de difusión. En la figura 4.3 se presenta el sistema r-FIA con difusión gaseosa (DG-r-FIA) implementado.

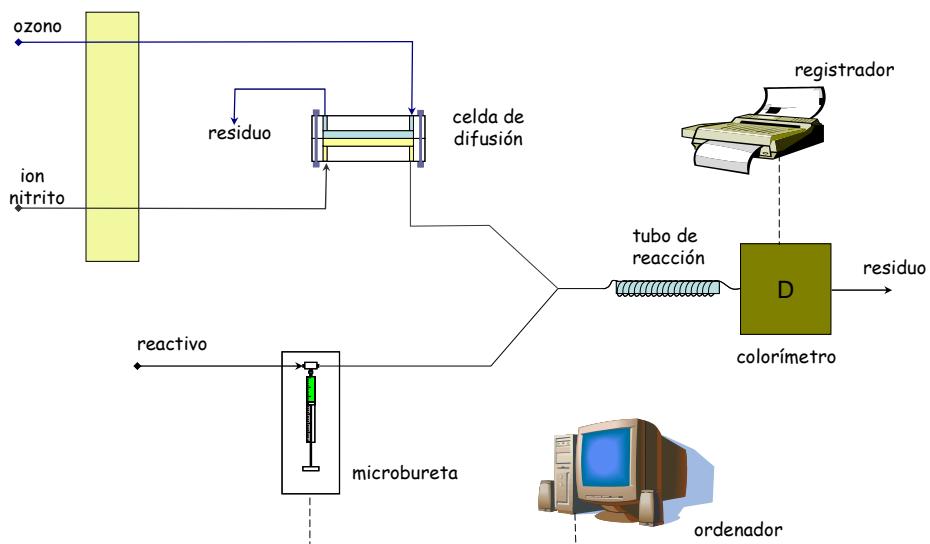


Figura 4.3 Sistema GD-r-FIA utilizado en la determinación de ozono residual.

#### 4.2.2 Programa de gestión de análisis por FIA y r-FIA

En los estudios realizados con el sistema de referencia (figura 4.1) la inyección se ha realizado manualmente. En el sistema con microbureta automática ha sido necesario realizar un programa de control para la inyección. El programa elaborado para esta aplicación permite la inyección de volúmenes variables en los sistemas FIA, r-FIA y GD-r-FIA. En la figura 4.4 se presenta el diagrama de flujo que gestiona la dosificación de diferentes volúmenes de la solución o reactivo a inyectar.

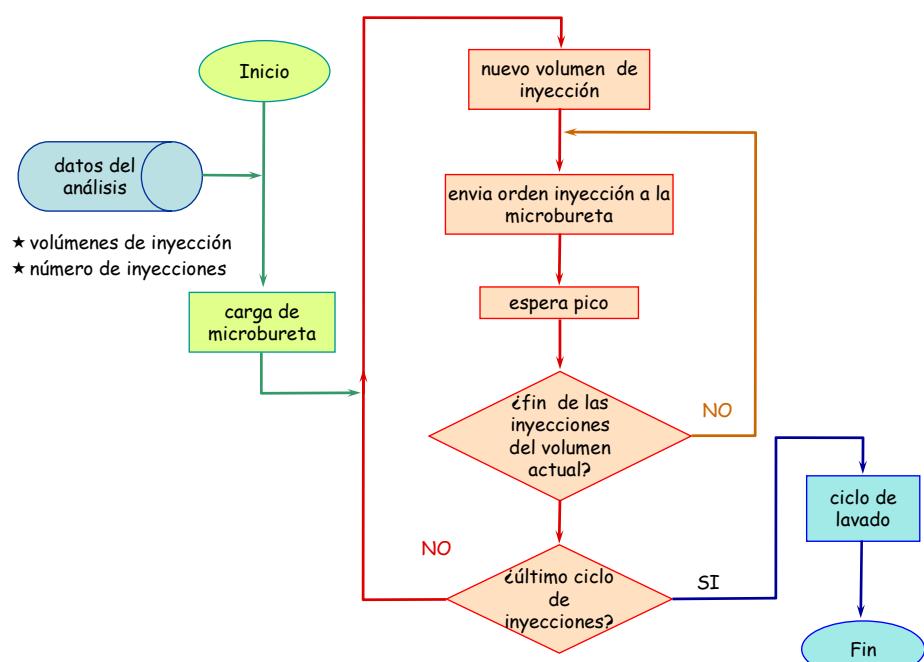
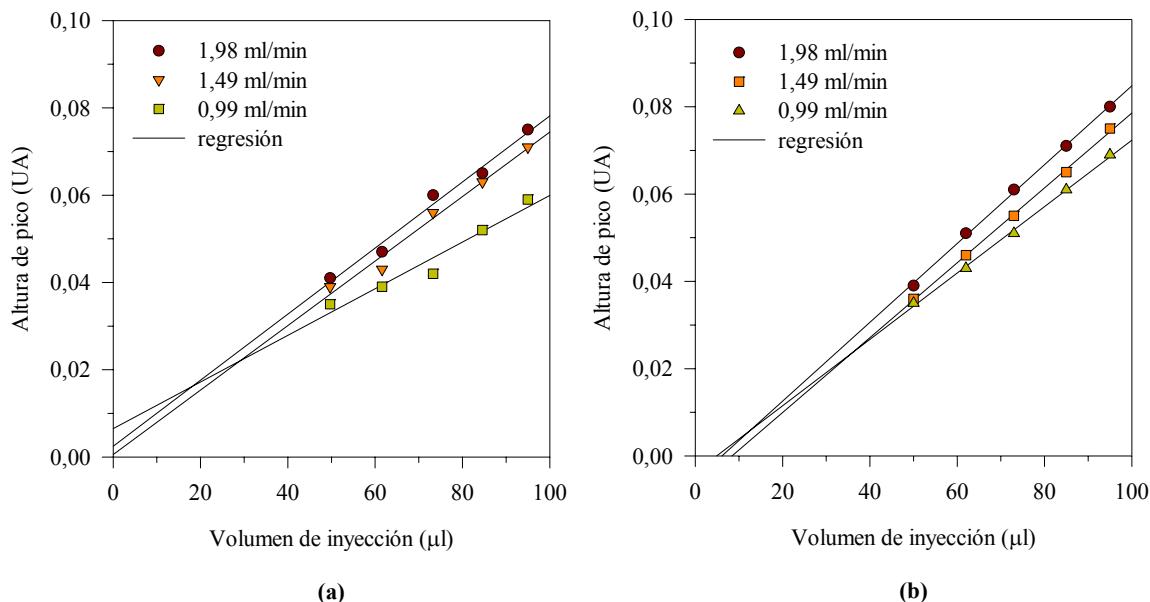


Figura 4.4 Diagrama de flujo del programa de gestión de FIA con inyección a través de microbureta. La comunicación entre la microbureta y el ordenador es mediante el puerto de comunicaciones serie (RS-232).

### 4.3 Estudio de la respuesta sin reacción química

Se ha estimado el coeficiente de dispersión en el sistema FIA monocanal de referencia con dos sistemas de inyección diferentes, una válvula de inyección de seis vías y una microbureta automática. En ambos casos, se ha evaluado la influencia en la señal obtenida, tanto del volumen insertado como del caudal. Manteniendo la longitud y el diámetro del tubo de reacción en 50 cm y 0,8 mm de diámetro, respectivamente. Cuando la inyección se realiza con válvula de seis vías, los volúmenes de inyección son prefijados por diferentes bucles de muestra, previamente calibrados. Cuando la inyección se realiza con microbureta, los volúmenes inyectados son controlados vía ordenador. La solución colorante utilizada es una disolución de rojo de fenol preparada por dilución de una solución madre  $1,13 \cdot 10^{-2}$  M (§ 3.2.1).

Los caudales de portador estudiados han sido 1,98, 1,49 y 0,99 ml/min. Cuando la inyección se realizó con válvula de seis vías, los volúmenes de muestra inyectados fueron 49,7; 61,6; 73,3; 84,6 y 95,0  $\mu$ l. Utilizando la microbureta, los volúmenes inyectados fueron 50, 62, 73, 85 y 95  $\mu$ l. Para cada caudal y volumen, se realizaron 10 replicados. El error estadístico es inferior a la precisión del espectrofotómetro utilizado, por lo que se considera un error asociado de  $\pm 0,001$  UA.



**Figura 4.5** Estudio de la respuesta en el estudio sin reacción química para válvula (a) y microboreta (b), como sistemas de inyección

En la figura 4.5 se muestra la comparación de los resultados obtenidos para ambos sistemas de inyección a todos los caudales y volúmenes estudiados. En general, se observa que, para todos los caudales, la respuesta es lineal cuando la inyección se realiza con microbureta (figura 4.5 (b)). Cuando se utiliza la válvula de seis vías (figura 4.5 (a)), la

respuesta obtenida también es lineal excepto para el caudal de 0,99 ml/min. Al realizar el ajuste por mínimos cuadrados, en el sistema FIA de referencia se observa una mayor dispersión de la señal al variar el volumen de inyección. Este fenómeno se incrementa al disminuir el caudal. El sistema con la microbureta se comporta básicamente como el sistema FIA pero presenta una mayor linealidad.

Se ha estimado el valor numérico de la dispersión en las distintas condiciones experimentales, mediante el cálculo del coeficiente de dispersión [Ruzicka y Hansen, 1988]. Para ello ha sido necesario conocer la medida de la absorbancia cuando en el sistema de flujo no existe dispersión, es decir cuando sólo circula colorante (§ 1.3.2). En las condiciones experimentales utilizadas, el valor de  $C_0$  es 0,220 UA. A partir de este valor se ha calculado el valor del coeficiente de dispersión ( $D=C_0/C_{\max}$ ) para las seis series correspondientes a cada caudal y sistema de inyección. Los resultados obtenidos (tabla 4.1) se han comparado mediante dos criterios estadísticos, el test  $t$  de Student para muestras por parejas y la comparación por regresión lineal [Miller y Miller, 1993].

**Tabla 4.1** Coeficiente de dispersión,  $D=C_0/C_{\max}$  función del volumen de inyección y caudal, para los dos modos de inyección ( $n=10$ ).

|             | Volumen( $\mu\text{l}$ ) | $Q=1,98 \text{ ml/min}$ | $Q=1,49 \text{ ml/min}$ | $Q=0,99 \text{ ml/min}$ |
|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Válvula     | 49,7                     | $5,366 \pm 0,003$       | $5,641 \pm 0,004$       | $6,286 \pm 0,005$       |
|             | 61,6                     | $4,681 \pm 0,002$       | $5,116 \pm 0,003$       | $5,641 \pm 0,004$       |
|             | 73,3                     | $3,667 \pm 0,004$       | $3,929 \pm 0,001$       | $5,238 \pm 0,003$       |
|             | 84,6                     | $3,385 \pm 0,009$       | $3,492 \pm 0,009$       | $4,231 \pm 0,002$       |
|             | 95,0                     | $2,933 \pm 0,006$       | $3,099 \pm 0,007$       | $3,729 \pm 0,001$       |
| Microbureta | 50,0                     | $5,641 \pm 0,004$       | $6,111 \pm 0,005$       | $6,286 \pm 0,005$       |
|             | 62,0                     | $4,314 \pm 0,002$       | $4,783 \pm 0,002$       | $5,116 \pm 0,003$       |
|             | 73,0                     | $3,607 \pm 0,001$       | $4,000 \pm 0,001$       | $4,314 \pm 0,002$       |
|             | 85,0                     | $3,099 \pm 0,001$       | $3,385 \pm 0,001$       | $3,607 \pm 0,001$       |
|             | 95,0                     | $2,750 \pm 0,001$       | $2,933 \pm 0,001$       | $3,188 \pm 0,001$       |

En general se observa que la dispersión en el sistema FIA con microbureta es ligeramente inferior a la dispersión con válvula de seis vías, salvo para el volumen menor de 50  $\mu\text{l}$  donde la dispersión obtenida con microbureta es superior a la de la válvula.

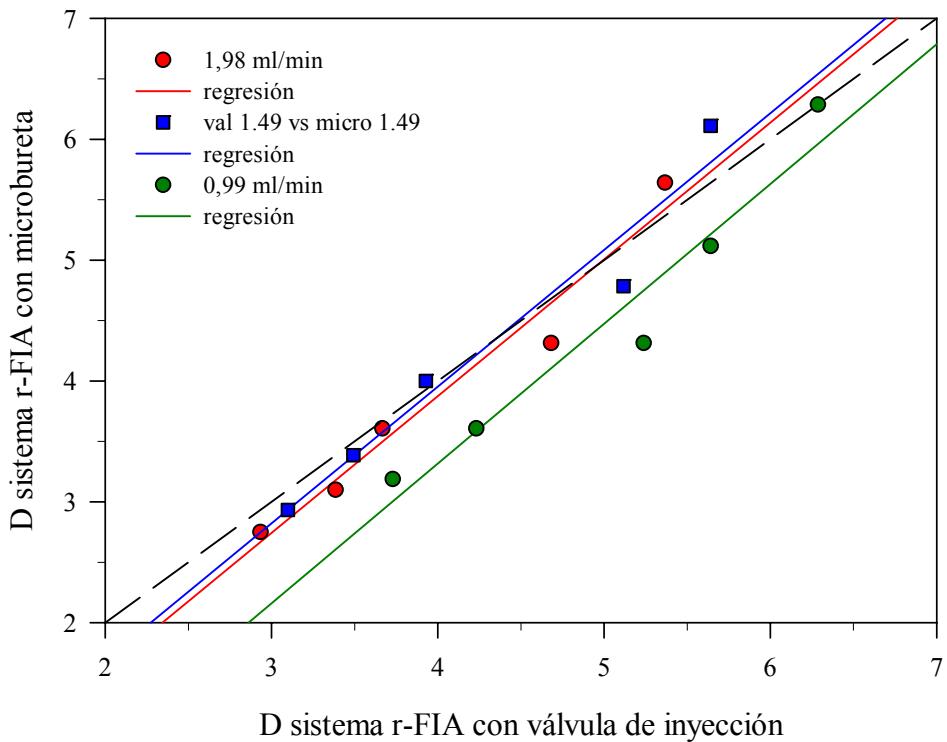
En el primer criterio estadístico se realiza la hipótesis de si las diferencias entre parejas son significativamente diferentes de cero para un nivel de significación del 95%. Si el estadístico calculado es inferior al valor crítico tabulado se acepta la hipótesis nula y no es posible establecer diferencias significativas entre las series de datos comparados. Los resultados se muestran en la tabla 4.2. El criterio estadístico aplicado evidencia que no existe diferencia entre ambos sistemas de inyección, excepto para el caudal menor. En este caso y referido únicamente a la válvula, se puede decir que a estos caudales existe

problema de reproducibilidad. Este hecho confirma los resultados observados en las figuras 4.5 (a, b).

**Tabla 4.2** Evaluación estadística de la dispersión en función de caudal, del volumen y del sistema de inyección para n=5. En la comparación por regresión lineal  $y=a+b\cdot x$ .

| Método Estadístico       | Caudal (ml/min) | Valor de los parámetros (95%)                   | ¿Diferencias significativas con el 95% de confianza? |
|--------------------------|-----------------|---|--|
| <i>test</i>              | 1,98            | $t_{cal}=1,11, t_{tab}=3,18; t_{cal} < t_{tab}$ | no   |
| <i>t-Student</i>         | 1,49            | $t_{cal}=0,09, t_{tab}=3,18; t_{cal} < t_{tab}$ | no   |
|                          | 0,99            | $t_{cal}=3,50, t_{tab}=3,18; t_{cal} > t_{tab}$ | sí   |
| <i>Regresión directa</i> | 1,98            | $a = -0,6 \pm 1,6; b = 1,1 \pm 0,4; r = 0,98$   | no   |
|                          | 1,49            | $a = -0,6 \pm 2,0; b = 1,1 \pm 0,5; r = 0,98$   | no   |
| <i>(micro vs válv)</i>   | 0,99            | $a = -1,3 \pm 2,6; b = 1,2 \pm 0,5; r = 0,96$   | sí   |

En la figura 4.6 se muestra la comparación de valores de dispersión por regresión lineal y en la tabla 4.2 los parámetros de calibración de las rectas de regresión obtenidas para 5 valores experimentales.



**Figura 4.6** Evaluación comparativa mediante regresión lineal de la dispersión en ambos sistemas de inyección.

Los valores de ordenada en el origen y pendiente no difieren significativamente (95% confianza) del valor teórico ( $a=0$  y  $b=1$ ). Aunque el valor del coeficiente de correlación en el caudal más bajo difiere significativamente de 1. Por tanto, se concluye que para el menor caudal (0,99 ml/min) existen diferencias significativas en la dispersión cuando se utiliza una válvula de inyección o una microbureta. Esta diferencia está asociada con la

menor repetitividad en la inyección que presenta la válvula frente a la microbureta, más que a la diferencia física del modo de inserción (§ 4.4.1.2).

Por tanto, de estos resultados se puede concluir la validez de la microbureta como dispositivo de inyección en flujo, presentando una mayor linealidad y reproducibilidad, en todas las condiciones estudiadas, respecto a la válvula de inyección.

## 4.4 Estudio de la respuesta con reacción química

### 4.4.1 Validación de la microbureta como sistema de inyección

El ion nitrito es analizado mediante la reacción de Griess-Ilosvay (§ 1.6.2). La muestra actúa como flujo portador, en este caso el patrón, y se mezcla con el reactivo inyectado (sulfanilamida y diclorhidrato de NED) para formar por reacción de diazotización y posterior copulación, un compuesto coloreado que se determina espectrofotométricamente [Sawyer et al., 1994]. La técnica utilizada en todos los estudios con reacción química es r-FIA.

#### 4.4.1.1 Optimización

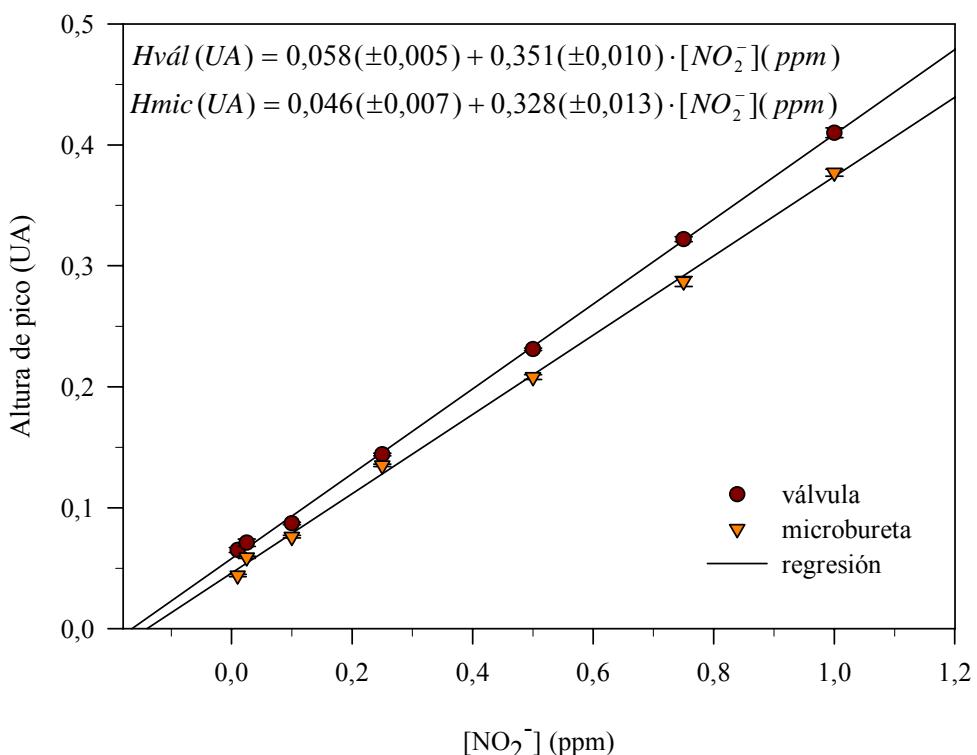
Inicialmente se ha procedido a la obtención de rectas de calibración en el sistema con microbureta (figura 4.2) fijando las siguientes condiciones experimentales: el tubo de reacción a 100 cm, el volumen del reactivo a 50  $\mu$ l y el caudal a 0,54 ml/min. Se ha escogido este sistema por la facilidad con que pueden ser modificadas las condiciones de operación con una mínima alteración física de éste. El intervalo de concentración estudiado ha sido 0,025-1,00 ppm de ion nitrito. En primera instancia, y aunque los calibrados han sido reproducibles, se han obtenido picos dobles y distorsionados para concentraciones inferiores a 0,25 ppm, denotando un grado de mezcla inadecuado en el sistema. Así mismo, el tiempo de análisis en estas condiciones ha sido 4 minutos, bastante alto para un sistema FIA. Con el fin de evitar estos problemas se procedió a optimizar las condiciones de operación. Se ha utilizado el método univariante que consiste en la modificación sucesiva de los parámetros que definen el sistema hasta encontrar las condiciones óptimas.

En todas las experiencias se ha utilizado como portador una disolución de 0,25 ppm de ion nitrito. En primer lugar y fijando las demás variables del sistema se ha optimizado el caudal, después la longitud del tubo de reacción y finalmente el volumen de reactivo inyectado. Los caudales estudiados han sido 0,49; 0,99; 1,49 y 1,99 ml/min. El caudal seleccionado como óptimo ha sido 1,5 ml/min dado que se ha observado la desaparición del doble pico y se ha reducido el tiempo de análisis a 1 min. A continuación y fijando este caudal se han estudiado distintas longitudes de tubo de reacción: 50, 100, 150 y 300 cm. La

longitud seleccionada como óptima ha sido 300 cm, ya que permitía conseguir un aumento de señal y un perfil de pico normal. Finalmente, se ha optimizado el volumen de reactivo, se han estudiado distintos volúmenes 10, 30, 50 y 62  $\mu\text{l}$ , y se ha observado un aumento no lineal de absorbancia con el volumen inyectado. Cuando el volumen de reactivo inyectado es del orden de 30  $\mu\text{l}$ , se obtienen picos gaussianos lo que evidencia que el grado de mezcla en las dos interfas muestra/reactivo (delantera y trasera) es óptimo.

#### 4.4.1.2 Comparación de la respuesta en los dos modos de inyección

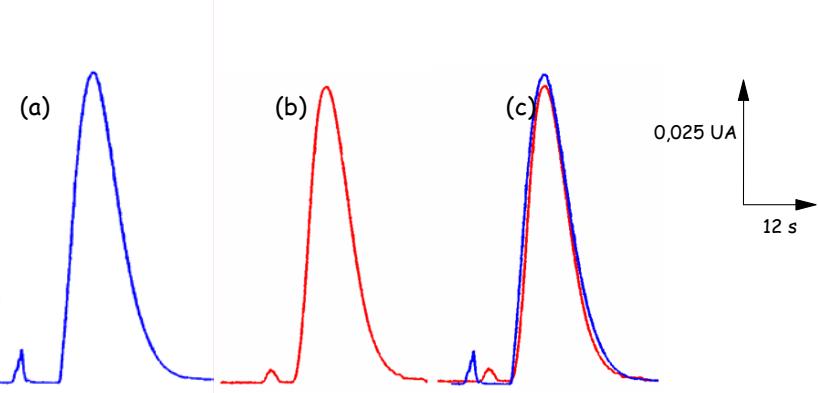
Utilizando como modelo la reacción de ion nitrito, se han realizado calibrados simultáneos con ambos sistemas de inserción de reactivo (válvula rotatoria de seis vías y microbureta), en un intervalo de concentración de 0,010-1 ppm. Las variables hidrodinámicas de ambos sistemas de flujo permanecen invariables y son las optimizadas anteriormente (§ 4.4.1.1).



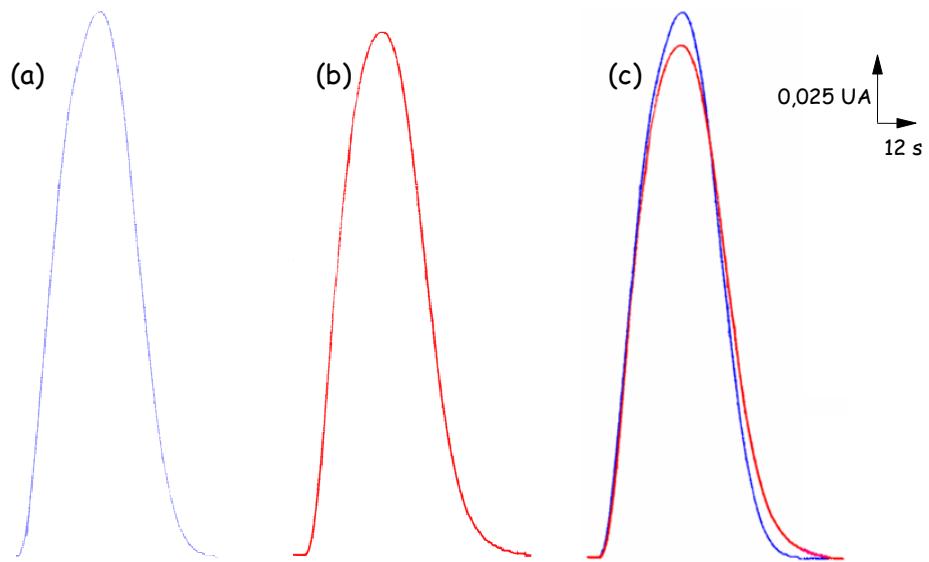
**Figura 4.7** Calibrados realizados con los dos sistemas de inyección, para  $L=300$  cm y  $Q=1,49$  ml/min. Los volúmenes de inyección son  $V_{\text{válv}}=35,4$   $\mu\text{l}$  y  $V_{\text{mic}}=35$   $\mu\text{l}$ .

En la figura 4.7 se muestran dos calibrados típicos obtenidos en ambos sistemas. La pendiente obtenida en el sistema con microbureta es siempre ligeramente inferior. El volumen de inyección de la válvula rotatoria ha sido de 35,4  $\mu\text{l}$  (figura 4.1), incluyendo el volumen muerto de ésta. Cuando la inyección se realiza con microbureta se dosifican 35  $\mu\text{l}$  (figura 4.2).

Con el objetivo de estudiar si existían diferencias significativas en el perfil de los picos de absorbancia obtenidos, se realizó un estudio comparativo para dos concentraciones extremas del intervalo estudiado. En la figura 4.8 se muestra el resultado obtenido por una concentración de ion nitrito de 0,1 ppm y en la figura 4.9 los resultados obtenidos para una concentración de 0,5 ppm.



**Figura 4.8** Perfiles obtenidos para una concentración de 0,100 ppm de ion nitrito. Inyección con (a) válvula, (b) microbureta y (c) superposición de picos.



**Figura 4.9** Perfiles obtenidos para una concentración de 0,500 ppm de ion nitrito. Inyección con (a) válvula, (b) microbureta y (c) superposición de picos.

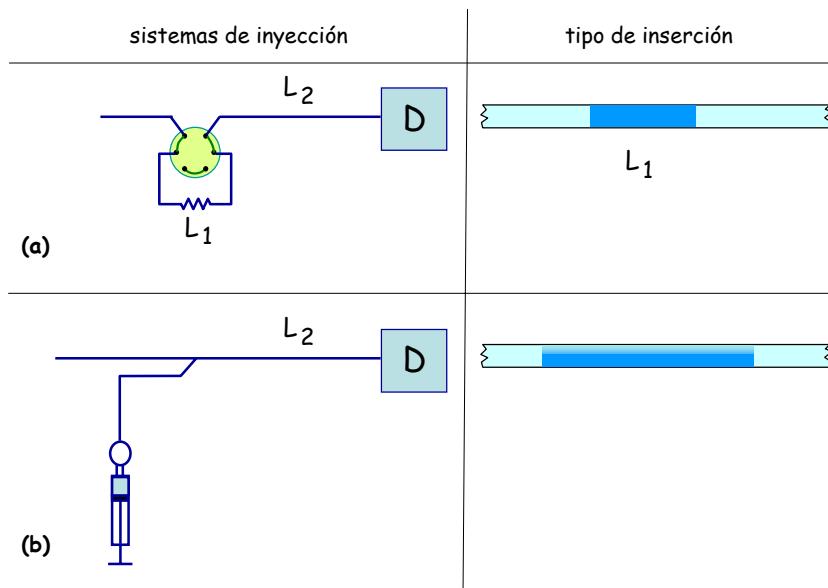
Se observa una forma de pico idéntica en los dos sistemas de inyección, aunque con una pequeña diferencia en la altura, menor en el caso de la microbureta como se puede apreciar en la superposición de picos en las figuras 4.8 y 4.9 (c). Esta diferencia de altura está relacionada con el mayor grado de mezcla obtenido con este dispositivo de inserción a volúmenes de inyección menores o iguales a 50  $\mu$ l (§ 4.3). Se observa también que es independiente del valor de concentración.

En la tabla 4.3 se muestra las características de los perfiles correspondientes a 0,1 ppm y 0,5 ppm de ion nitrito obtenidos con  $V_{\text{vál}}=34,5 \mu\text{l}$  y un  $V_{\text{mic}}=35 \mu\text{l}$ , para un caudal de 1,49 ml/min y una longitud del tubo de reacción de 300 cm. El error se ha calculado como el intervalo de confianza para un nivel de significación del 95%, y la repetitividad ha sido estimada como el error estándar relativo.

**Tabla 4.3** Resultados obtenidos en la comparación de perfiles (n=3). El error está calculado como  $I_{n-1}^{95\%}$ .

| Características pico               | 0,1 ppm de nitritos |                   | 0,5 ppm de nitritos |                   |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
|                                    | Válvula             | Microbureta       | Válvula             | Microbureta       |
| Altura pico (UA)                   | $0,086 \pm 0,001$   | $0,082 \pm 0,001$ | $0,230 \pm 0,001$   | $0,213 \pm 0,003$ |
| Anchura a $\frac{1}{2}$ altura (s) | $8,4 \pm 0,1$       | $7,2 \pm 0,1$     | $22,8 \pm 2,9$      | $26,8 \pm 1,7$    |
| Anchura en la base (s)             | $26,8 \pm 1,7$      | $24,0 \pm 0,1$    | $47,6 \pm 1,7$      | $60,8 \pm 4,5$    |
| Repetitividad (% RSD)              | 1,03 %              | 1,07%             | 0,77 %              | 0,54%             |

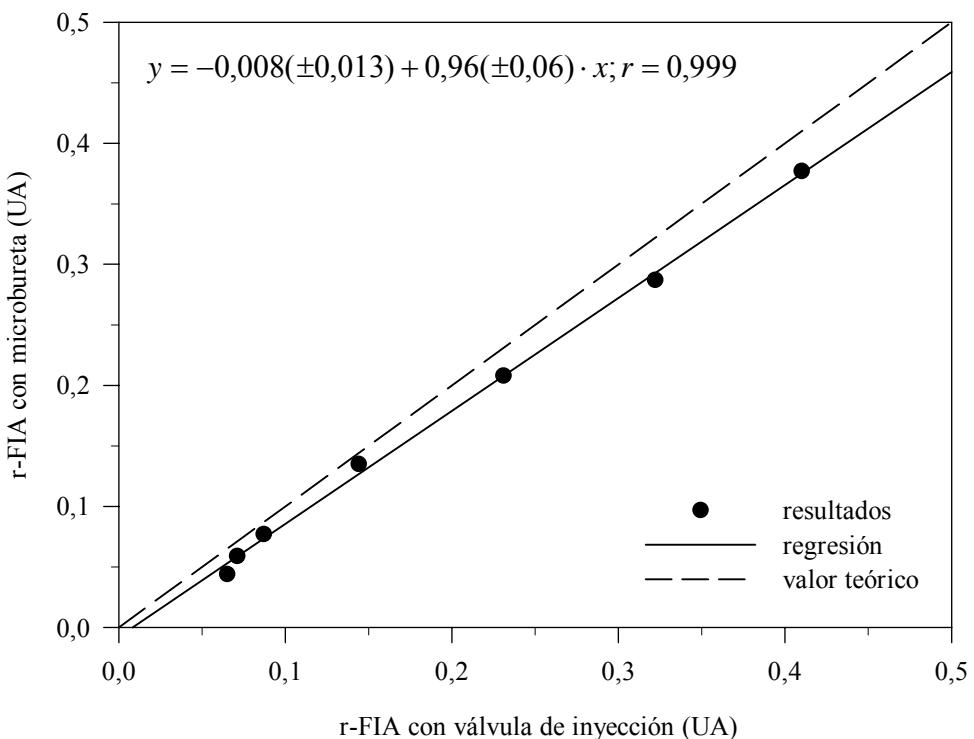
La comparación de perfiles permite concluir que no existen diferencias significativas entre los dos sistemas de inyección evaluados y las que hay son debidas a los factores inherentes a los procesos de inserción de reactivo (ver figura 4.10).



**Figura 4.10** Comparación de los dos sistemas de inyección. (a) Válvula de seis vías y (b) microbureta.

Para el sistema con válvula, la longitud de reacción es mayor ( $L_1 + L_2$ ) y el reactivo está horquillado por la muestra portadora (figura 4.10 (a)). En el caso de la microbureta, la inserción implica una mezcla análoga a la que se conseguiría con la introducción de un canal adicional a través de un punto de confluencia (figura 4.10 (b)). En sistemas en los cuales exista una diferencia significativa entre las propiedades reológicas del reactivo y la muestra sería aconsejable el uso, como método de inserción de muestra, de la microbureta.

Para corroborar estos resultados se ha aplicado el criterio estadístico de comparación de métodos por regresión lineal [Miller y Miller, 1993]. Se han comparado las señales analíticas correspondientes a los dos calibrados mostrados en la figura 4.7. En la figura 4.11 se muestran los resultados obtenidos para la regresión directa, microbureta frente a válvula de seis vías. Los valores de ordenada, pendiente y coeficiente de correlación cercanos respectivamente a cero y la unidad, verifican que no existen diferencias significativas con el 95% de confianza, ni en la regresión directa ni en la inversa.



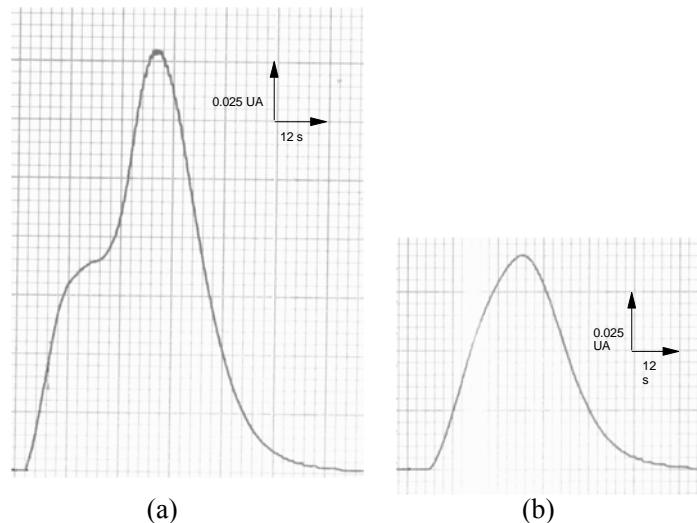
**Figura 4.11** Comparación de los dos sistemas de inyección por regresión directa.

#### 4.4.2 Sistema r-FIA adaptativo con microbureta

Después de evaluar y comprobar la posibilidad de utilizar una microbureta, controlada por ordenador, como elemento de inserción de reactivo en un sistema r-FIA, se ha procedido al estudio de una aplicación más completa basada en la versatilidad que aporta ésta como sistema de inyección. El objetivo ha sido implementar un sistema que permite, fijando el resto de variables hidrodinámicas del sistema (caudal y longitud de tubo de reacción), obtener respuesta en intervalos de concentración distintos, modificando únicamente el volumen de reactivo inyectado. Esta estrategia permite que el sistema se adapte de *forma inteligente* a las condiciones de operación, en función de las características individuales de cada muestra.

Con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para dos intervalos de concentración diferentes, dentro del global comprendido entre 0,0-3,0 ppm, se ha estudiado la respuesta obtenida frente a la variación del volumen de reactivo inyectado partiendo de las condiciones de operación fijadas previamente, en el § 4.4.1.1, un caudal de 1,49 ml/min y una longitud de tubo de reacción de 300 cm. Los intervalos de concentración establecidos son 0-0,100 ppm y 0,100-2 ppm de ion nitrito. Las condiciones operacionales de la zona de  $[\text{NO}_2^-] > 0,100$  ppm se fijan como óptimas a priori, iguales al estudio anterior ( $V_{\text{iny}} = 35 \mu\text{l}$ ) y, se estudia el volumen de reactivo que permite aumentar la resolución para concentraciones menores de 0,100 ppm.

Se ha determinado la influencia del volumen de reactivo y la concentración de ion nitrito en la señal, manteniendo fijos el caudal y la longitud del tubo de reacción. El estudio inicial ha consistido en realizar 8 calibrados distintos, incrementando sucesivamente el volumen de inyección. Los volúmenes estudiados están comprendidos en un intervalo entre 25-250  $\mu\text{l}$  y las concentraciones de ion nitrito entre 0,001-2,0 ppm. Los resultados obtenidos muestran que para concentraciones superiores a 0,1 ppm y volúmenes de reactivo mayores o iguales a 75  $\mu\text{l}$ , el grado mezcla es inadecuado. A concentraciones altas de ion nitrito el volumen de reactivo influye significativamente en el grado de mezcla y por tanto en la dispersión.

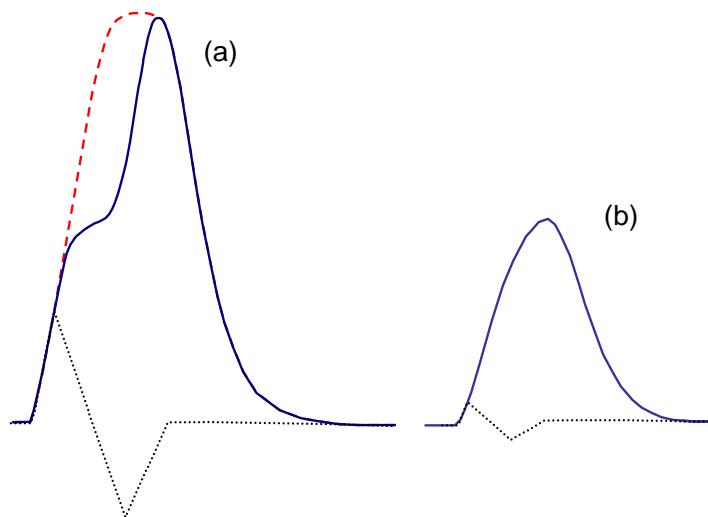


**Figura 4.12** Influencia del volumen de reactivo inyectado en la dispersión, la concentración de ion nitrito analizada es 0,250 ppm. (a)  $V_{\text{iny}} = 75 \mu\text{l}$  y (b)  $V_{\text{iny}} = 25 \mu\text{l}$ .

A título de ejemplo en la figura 4.12 se muestra la respuesta obtenida para 0,250 ppm y dos volúmenes diferentes de reactivo inyectados (75 y 25  $\mu\text{l}$ ). Cuando el volumen de reactivo es mayor o igual a 75  $\mu\text{l}$ , y hasta 250  $\mu\text{l}$ , sólo se obtienen picos óptimos (gaussianos) a concentraciones menores o iguales a 0,100 ppm. La forma anómala es debida a diferencias de índice de refracción entre las interfases de las soluciones en contacto, este fenómeno es

conocido como efecto Schlieren (§ 1.3.1). En este caso se produce una disminución de absorbancia al pasar la primera interfase patrón/reactivo por el detector, que provoca la formación de un *hombro* en el pico.

En la figura 4.13 se muestra el resultado de la superposición teórica de las dos señales para cada uno de los volúmenes de reactivo inyectado. La asociada con la absorción del colorante azoico cuando no se produce el efecto Schlieren, se muestra en línea discontinua roja, la debida a la diferencia de índices de refracción utilizando agua como portador en línea discontinua negra y, la señal experimental en línea continua azul.

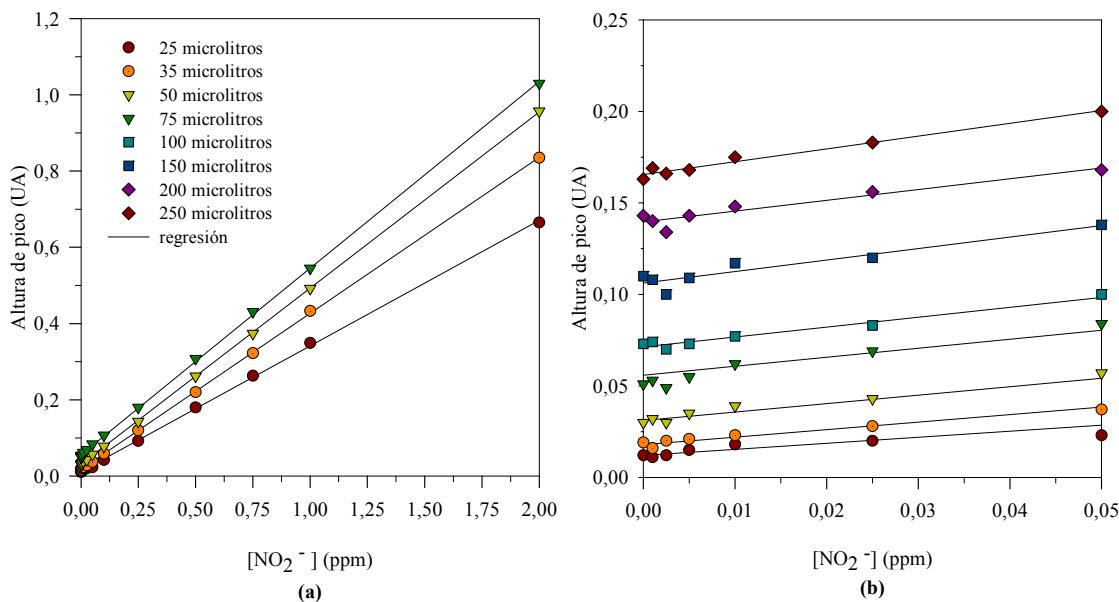


**Figura 4.13** Efecto Schlieren en función del volumen de reactivo inyectado en un sistema r-FIA. La concentración de ion nitrito analizada es 0,250 ppm. (a)  $V_{\text{iny}}=75 \mu\text{l}$  y (b)  $V_{\text{iny}}=25 \mu\text{l}$ . La línea azul es la señal experimental, la línea roja la señal simulada sino existe el efecto Schlieren y la línea negra es la señal simulada para un blanco cuando se produce una absorción anómala. La suma de las señales simuladas para el patrón y el blanco, coinciden con la señal experimental.

Por tanto, la señal experimental es debida a la superposición de dos señales, la asociada a la absorción del colorante y la provocada por la absorción anómala. Esta última es debida a la diferencia de índice de refracción entre la interfase delantera y el reactivo (pico positivo) y, el reactivo y la interfase trasera (pico negativo). Se ha observado que a mayor volumen de reactivo el efecto es más pronunciado, debido a una mayor tiempo de paso por el detector (figura 4.13 (a)). Para volúmenes pequeños se produce un mayor grado de mezcla, menor tiempo de paso por el detector, y la diferencia de índice de refracción no es tan importante (figura 4.13 (b)).

En la figura 4.14 (a) a se muestran las curvas de calibración obtenidas para los calibrados efectuados con volúmenes entre 25-75  $\mu\text{l}$  y todo el intervalo de concentraciones. Para concentraciones bajas de ion nitrito, menores de 0,1 ppm, se comprueba que al aumentar el volumen de reactivo aumenta la señal, lo que parece favorecer la sensibilidad (figura 4.14 (b)). No obstante, también aumenta la ordenada en el origen que corresponde a la señal del

blanco. Esta señal se debe a la existencia de diferencias en el índice de refracción entre la muestra y el reactivo lo que provoca una absorción mayor de la esperada debido al efecto Schlieren. El efecto del índice de refracción en este caso provoca absorciones que dependen del volumen inyectado.



**Figura 4.14** Resultados de los calibrados efectuados para los distintos volúmenes de inyección. (a) Concentraciones altas de ion nitrito,  $V_{iny}=25-75 \mu\text{l}$ , (b) concentraciones bajas de ion nitrito,  $V_{iny}=25-250 \mu\text{l}$ .

La influencia del índice de refracción es más evidente cuando el volumen de reactivo inyectado es mayor. Se observa que si el volumen de reactivo es 250  $\mu\text{l}$  se obtiene un valor de absorbancia mayor, pero la sensibilidad, definida como la pendiente de la recta de calibración [Miller y Miller, 1993], permanece casi constante respecto a volúmenes de reactivo menores: 100, 150 y 200  $\mu\text{l}$  como se puede comprobar en la figura 4.14 (b), donde se observa que en la zona baja de concentraciones un aumento de volumen desde 100 a 250  $\mu\text{l}$  no aumenta significativamente la sensibilidad (tabla 4.4), aunque para un volumen de 250  $\mu\text{l}$  se obtiene una mejor relación entre concentración y señal analítica.

**Tabla 4.4** Rectas de calibración correspondientes a la figura 4.12 (b) para volúmenes de reactivo  $\geq 100 \mu\text{l}$  y concentración de ion nitrito menor de 0,100 ppm.

| $V_{iny}$ microporeta ( $\mu\text{l}$ ) | Rectas de calibración ( $n=7$ )<br>$H \text{ (UA)} = a (\pm t_{(n-2)} s_a) + b (\pm t_{(n-2)} s_b) \cdot [NO_2^-] \text{ (ppm)}$ | $r$        |
|---|--|------------|
| 100                                     | $H = 0,071 (\pm 0,002) + 0,55 (\pm 0,11) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,99$ |
| 150                                     | $H = 0,106 (\pm 0,006) + 0,6 (\pm 0,3) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,97$ |
| 200                                     | $H = 0,139 (\pm 0,005) + 0,6 (\pm 0,2) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,98$ |
| 250                                     | $H = 0,165 (\pm 0,003) + 0,69 (\pm 0,12) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,99$ |

Se concluye que a este nivel de concentración el peso de la señal de fondo hace indistinguible el incremento de sensibilidad. Este hecho se ha comprobado al comparar el aumento de absorbancia cuando se han realizado inyecciones de reactivo en un canal portador de agua. En este caso se observó una dependencia casi lineal entre la absorción de fondo y el volumen de reactivo inyectado. Es decir, en las condiciones estudiadas se obtiene incremento de respuesta pero ésta no es debida solamente al grado de reacción sino, básicamente, al índice de refracción.

#### *4.4.2.1. Estudio volumen óptimo de reactivo para concentraciones altas*

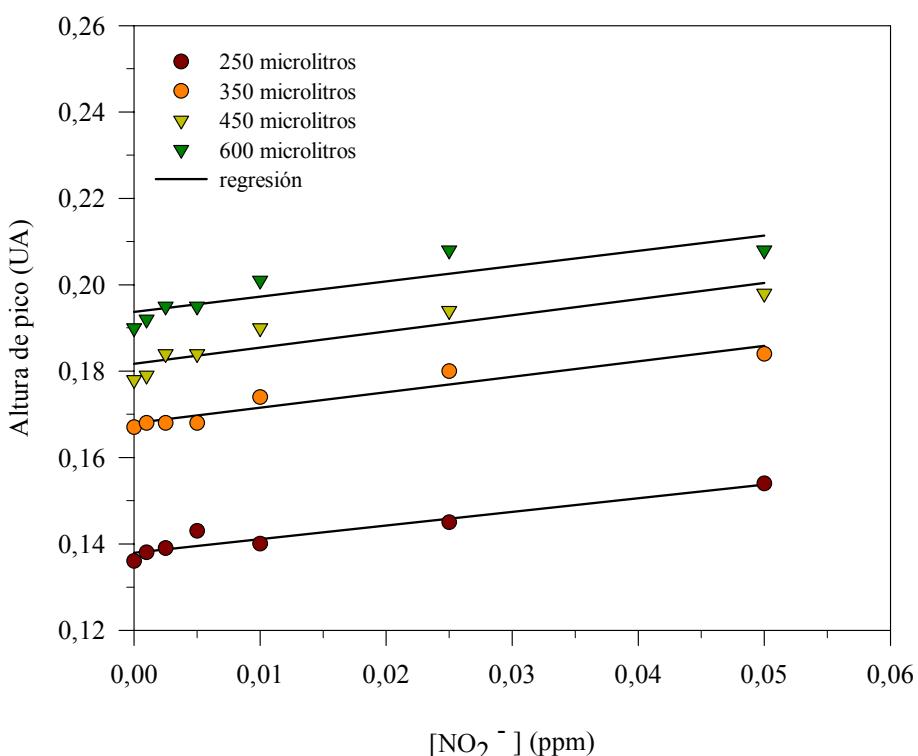
Para concentraciones de ion nitrito mayores de 0,100 ppm, las condiciones de operación ensayadas son adecuadas pero se ha considerado necesario acabar de optimizar el volumen de reactivo en este intervalo. Se realizaron nuevos calibrados comparativos con volúmenes de reactivo de 25 y 35  $\mu$ l, ampliando el intervalo de concentración hasta 3,0 ppm. Se ha observado que a mayor volumen de reactivo inyectado mayor es la sensibilidad del método. Finalmente, se escoge como óptimo un valor de 25  $\mu$ l de reactivo ya que el aumento de sensibilidad no es significativo y la señal analítica obtenida a concentraciones menores de 0,25 ppm es similar. Finalmente, se ha realizado la caracterización del método propuesto para este intervalo de concentraciones en las condiciones optimizadas: un volumen de inyección de 25  $\mu$ l, una longitud del tubo de reacción de 300 cm y un caudal de 1,49 ml/min (§ 4.4.3).

#### *4.4.2.2. Estudio volumen óptimo de reactivo para concentraciones bajas*

En la zona de concentración menor de 0,1 ppm se ha obtenido una respuesta baja después de restar el blanco, confirmándose que parte de la respuesta es ruido debido al efecto del índice de refracción y no señal debida a la reacción de ion nitrito. El efecto del índice de refracción ha provocado absorciones que dependen del volumen de reactivo inyectado. Se compararon las rectas de calibración (tabla 4.4) correspondientes a volúmenes de 100, 150, 200 y 250  $\mu$ l (figura 4.14 (b)) se han obtenido valores de pendiente, cuyo error es del mismo orden de magnitud. Esto indica que la sensibilidad es prácticamente constante para los cuatro volúmenes comparados. Este hecho se comprobó al comparar la absorbancia de los blancos con agua desionizada a volúmenes de reactivo grandes (100, 150, 200 y 250  $\mu$ l). Se observó una dependencia casi lineal entre la absorción de fondo y el volumen de reactivo inyectado. En estas condiciones, se obtuvo mayor respuesta pero ésta no era debida solamente al grado de reacción sino, básicamente, al índice de refracción. Estos resultados confirman que un aumento de volumen no se traduce en un incremento de sensibilidad y que, para bajas concentraciones, y volúmenes de reactivo mayores de 100  $\mu$ l, el efecto del índice de refracción es muy pronunciado.

Con estas condiciones, se ha de fijar el límite de cuantificación alrededor de 0,005 ppm. Para solventar este problema, la opción más razonable ha sido utilizar volúmenes mayores de reactivo y reducir el caudal para dar mayor tiempo de reacción, e incrementar así la señal. Con este objetivo se ha procedido a optimizar el sistema evaluando la respuesta en función de variaciones de caudal, volúmenes de reactivo mayores de 250  $\mu$ l y distintas longitudes de tubo de reacción.

Los caudales estudiados han estado comprendidos en un intervalo entre 1,0-2,0 ml/min, manteniendo constante e igual a 300 cm la longitud del tubo de reacción y variando el volumen de reactivo entre 250-350  $\mu$ l. Los resultados obtenidos evidenciaron que a menor caudal se favorece el grado de reacción, y la respuesta aumenta, pero ésta aparece distorsionada debido a oscilaciones del flujo. Se estudiaron también volúmenes mayores de reactivo en el intervalo de 250-600  $\mu$ l, manteniendo constante la longitud del tubo de reacción y el caudal, respectivamente a 300 cm y 1,49 ml/min. En la figura 4.15 se muestran las rectas de calibración obtenidas.



**Figura 4.15** Estudio de la respuesta para volúmenes grandes de reactivo y concentraciones de ion nitrito menores de 0,1 ppm. Los calibrados se han efectuado a un caudal de 1,5 ml/min y una longitud de tubo de reacción de 300 cm.

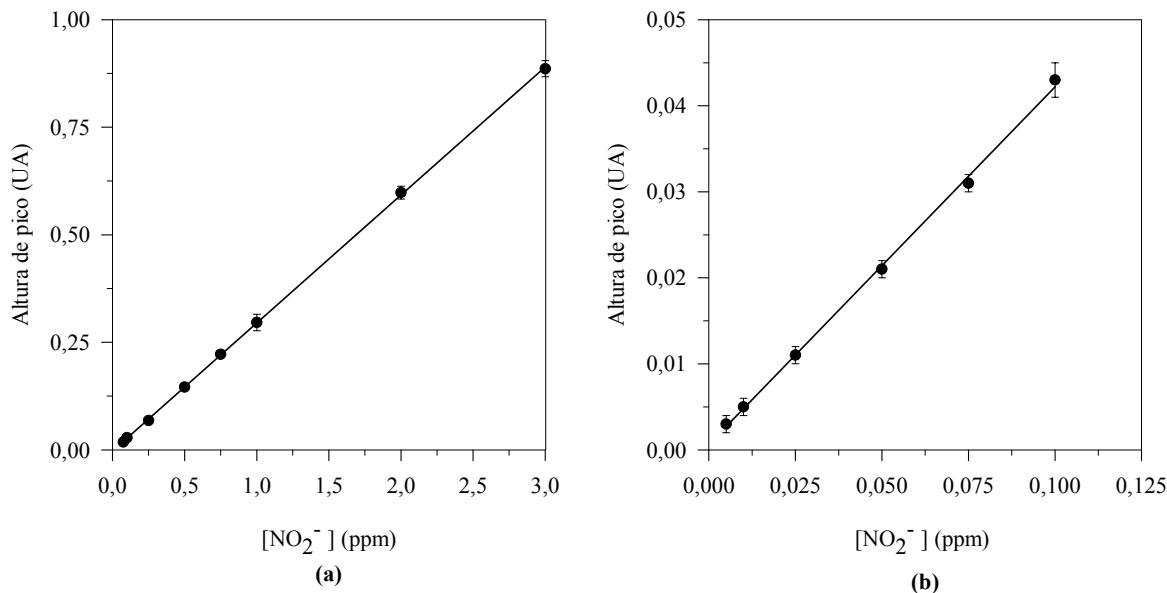
Finalmente, se ha estudiado el efecto de la longitud del tubo de reacción. Las distancias evaluadas han sido: 100, 150, 300 cm y el volumen de reactivo se ha variado entre 250-600  $\mu\text{l}$ . Los resultados obtenidos han confirmado que el límite de detección del método propuesto se encuentra alrededor de 0,005 ppm, ya que en todas las condiciones estudiadas las medidas de absorbancia para concentraciones inferiores de ion nitrito, no han sido distinguibles de las del blanco. Por tanto, llegar a mejorar ligeramente el límite de detección a costa de perder autoadaptabilidad no compensa. Finalmente, las condiciones implementadas han sido, un volumen de inyección de 350  $\mu\text{l}$ , un caudal de 1,49 ml/min y una longitud del tubo de reacción de 150 cm.

Durante la de caracterización del sistema propuesto, efectuado mediante el cálculo de los parámetros de calibración, se ha observado que la influencia de la diferencia de índice de refracción ha provocado una absorbancia mayor de la real en todos los casos. Este efecto no ha podido minimizarse experimentalmente [McKelvie et al., 1997] y ha sido necesario recurrir al cálculo matemático. Con el objetivo de restar este efecto del debido a la reacción de ion nitrito, se ha realizado en cada calibrado siempre el análisis de una serie de blancos con agua desionizada, y después se ha restado el valor medio del blanco de los valores de absorbancia relativos a los patrones. Por tanto, se ha considerado que el valor de absorbancia correcta es igual a la absorbancia del patrón de ion nitrito menos la absorbancia relativa al blanco [Schmidt et al., 1996]. Las rectas de calibración obtenidas han sido del tipo  $y=b\cdot x$ , los errores de la pendiente y la ordenada en el origen se han estimado como  $s_b \cdot t_{n-2}$  y  $s_a \cdot t_{n-2}$  con un nivel de significación del 95%. Cada uno de los puntos es la media de 5 determinaciones experimentales.

Tras este estudio y a partir de las rectas de calibración obtenidas en calibrados sucesivos efectuados para ambos intervalos de concentración, se ha determinado el límite de detección, la repetitividad y la reproducibilidad del sistema propuesto.

#### 4.4.3 Caracterización del sistema en los dos intervalos de aplicación

Una vez establecidas las condiciones de operación óptimas para los dos intervalos de concentración, se procedió a determinar los parámetros de calidad del método desarrollado. En la figura 4.16 (a) y (b) se muestran dos curvas de calibración típicas obtenidas para los dos intervalos de concentración en condiciones óptimas. Como se ha comentado antes, y dada la imposibilidad de eliminar el efecto Schlieren, ha sido sustraído el valor del blanco a las alturas de pico, de los distintos patrones, antes de realizar los cálculos.



**Figura 4.16** Calibrados típicos obtenidos en condiciones óptimas para los dos intervalos de concentración. (a) 0-3,0 ppm: Q= 1,5ml/min, L=300cm y V=25μl, (b) 0-0,1 ppm: Q=1,5ml/min, L=150cm y V=350μl. Las rectas de regresión correspondientes son  $H_{25\mu l}(UA)=0,01(\pm 0,02)+0,297(\pm 0,015)\cdot[NO_2^-](ppm)$  para el intervalo alto de concentración y  $H_{350\mu l}(UA)=0,006(\pm 0,001)+0,42(\pm 0,02)\cdot[NO_2^-](ppm)$ .

#### 4.4.3.1 Límites de detección

El límite de detección ha sido estimado según Caulcutt y Boddy [1983]. El límite de detección de un método puede ser definido como la concentración más pequeña que puede ser determinada por éste con un 95% de confianza. En métodos analíticos con problemas de ruido de fondo, en este caso debido a la diferencia de índice de refracción entre la muestra y el reactivo, es necesario estimar a partir de los blancos la concentración mínima detectable experimentalmente.

El límite de detección estimado se ha comprobado después. Inicialmente se ha calculado la desviación estándar de 10 parejas de blancos efectuados en calibrados diferentes ( $s_b=[\sum \text{dif}^2/n]^{1/2}$ ). Con esta desviación estándar multiplicada por el estadístico t-Student de 10 grados de libertad se ha calculado el criterio de detección (mínima respuesta detectable). Se ha multiplicado por dos y se ha sumado arbitrariamente un factor del 20% para asegurar que se está estimando correctamente el valor de absorbancia relativo a la mínima concentración de ion nitrito detectable. Con este resultado se ha calculado el valor de concentración mínimo detectable (§ 3.3.1.1). Se ha preparado una solución de esta concentración y se han realizado 10 análisis. Se ha calculado la desviación estándar de estos valores y a partir de este valor se ha determinado el valor de absorbancia mínimo detectable, utilizando para su cálculo la expresión de: *criterio de detección + t<sub>p</sub>·s<sub>p</sub>*. Finalmente, se ha calculado la concentración con este valor utilizando una de las rectas de calibración típicas obtenidas. Los resultados obtenidos han sido 0,024 ppm de ion nitrito.

para el intervalo de 0,0-3,0 ppm y 0,009 ppm para el intervalo de 0,0-0,1 ppm de concentración. Obteniéndose valores de límite de detección inferiores a los referenciados, en distintos sistemas, en la bibliografía. Como el de Oms et al. [1995] basado en la metodología SIA y, Gabriel et al. [1998] basado en la misma metodología y reacción, pero en un sistema FIA; así como, los basados en otras reacciones [Xingguo et al., 1996].

#### 4.4.3.2 Repetitividad y reproducibilidad

La repetitividad se ha determinado realizando 10 medidas de un estándar central dentro de un calibrado (figura 4.16). Para el intervalo de concentraciones de 0,0-3,0 ppm la concentración central escogida ha sido de 0,75 ppm y se calculó el error estándar relativo (RSD %). El valor obtenido fue RSD=0,52%, calculado con las lecturas corregidas de absorbancia. Para el intervalo de concentraciones de 0,0-0,1 ppm, la concentración escogida fue 0,075 ppm y el valor obtenido de RSD=1,35%. La repetitividad obtenida es buena para un método instrumental y, se confirma con el error estándar relativo, menor del 1,5%, obtenido en los dos intervalos.

**Tabla 4.5** Principales parámetros de calidad del sistema r-FIA para la determinación de ion nitrito. La repetitividad ha sido estimada para un estándar de 0,75 ppm y 0,075 ppm respectivamente.

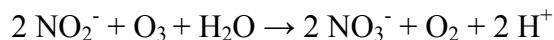
| Parámetro                              | Intervalo superior de concentración | Intervalo inferior de concentración |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Intervalo lineal                       | 0,0-3,0 ppm                         | 0,0-0,1 ppm                         |
| Límite de detección                    | 0,024 ppm                           | 0,009 ppm                           |
| Volumen de reactivo                    | 25 $\mu$ l                          | 350 $\mu$ l                         |
| Consumo de muestra                     | 1,5 ml min <sup>-1</sup>            | 1,5 ml min <sup>-1</sup>            |
| Repetitividad (%RSD, n=10)             | 0,52 %                              | 1,35 %                              |
| Reproducibilidad (ANOVA 1 vía)         | $F_{cal}=4,25 < F_{tab}=9,55$       | $F_{cal}=0,03 < F_{tab}=6,94$       |
| Frecuencia análisis (h <sup>-1</sup> ) | 60                                  | 60                                  |

La reproducibilidad del método propuesto ha sido estimada mediante comparación de las pendientes de calibrados realizados en días distintos en condiciones idénticas de operación. Se utilizó el análisis de varianza de un factor ANOVA. No se existiendo diferencias significativas entre calibrados con un 95% de confianza ya que  $F_{calculada} < F_{tabulada}$  en los dos intervalos de concentración estudiados (tabla 4.5).

## 4.5 Implementación del análisis de ozono

La técnica de difusión gaseosa asociada al análisis por inyección en flujo (DG-FIA) presenta dos ventajas respecto a otras técnicas de separación/preconcentración: (1) aumento de selectividad que permite seleccionar un tipo de componentes excluyendo otros y (2) preconcentración del analito, por tanto disminución del límite de detección.

La sensibilidad y selectividad de esta técnica aumentan si se utiliza la discriminación química basada en diferencias ácido/base, redox, complejación y otras propiedades particulares de las especies a ambos lados de la membrana. En este estudio ha sido aprovechada la propiedad oxidante del ozono para favorecer el proceso de difusión. El ozono se difunde a través de la membrana desde el canal dador y se introduce en un canal aceptor de ion nitrito. El ozono difundido oxida el nitrito a nitrato y se reduce a oxígeno:



La concentración final de ion nitrito se determina midiendo la absorción del colorante azoico formado tras su reacción con sulfanilamida y diclorhidrato de NED. De esta manera, un aumento de la concentración de ozono provoca una disminución de la absorbancia respecto a un blanco sin ozono.

### 4.5.1 Soluciones estándar de ozono

El ozono ha sido generado por paso de oxígeno a través de un ozonizador de laboratorio Sander modelo 301.7. Las distintas soluciones estándar de ozono se han obtenido por dilución de una solución saturada, obtenida por burbujeo del ozono producido en agua MilliQ acidificada con ácido sulfúrico a pH 2, en un frasco colector de 500 ml. Las soluciones estándar diluidas se prepararon también en agua MilliQ a pH 2 para minimizar la descomposición del ozono.

Debido a la rápida descomposición del ozono y a su volatilidad en solución es necesario determinar la concentración real de los estándares en el momento de su realización. En este estudio se utilizó la absorción en el UV a  $\lambda=260$  nm como método de referencia. Para el cálculo de la concentración de ozono se consideró un coeficiente de absorvidad molar ( $\varepsilon$ ) de  $3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [Straka et al., 1985] y se determinó la concentración utilizando la ecuación de Beer-Lambert,  $A=\varepsilon bc$ .

La determinación experimental de la concentración de los patrones de ozono se ha realizado mediante lectura directa de su absorbancia en el UV con una cubeta de cuarzo de camino óptico 1 cm, en un espectrofotómetro PV 8260 UV/VIS/NIR de Philips.

El uso de membranas microporosas para la difusión de ozono fue estudiado por Straka et al. [1985] con buenos resultados, obteniéndose una difusión cuantitativa de ozono y la eliminación de los interferentes. En el presente estudio se ha utilizado una membrana microporosa de PVDF de Millipore. Este polímero presenta una gran permeabilidad a moléculas pequeñas como el ozono y tiene además una elevada resistencia química y física. El proceso de difusión gaseosa se ha realizado en contracorriente para favorecer la difusión constante de ozono a lo largo de toda la membrana, de esta manera se genera un gradiente de concentración de ozono e ion nitrito permanente en toda superficie de la membrana.

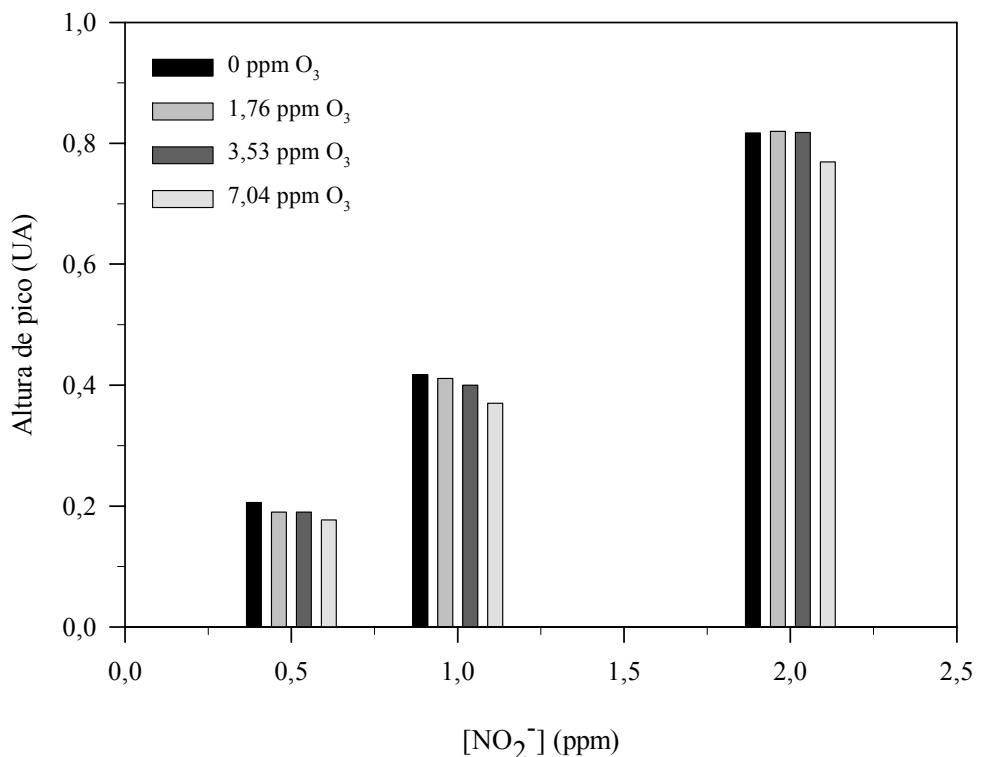
#### 4.5.2 Optimización de la etapa de difusión

El objetivo principal de esta parte del trabajo es la aplicación directa del sistema r-FIA descrito en el apartado anterior al análisis de ozono residual mediante la introducción de una etapa de difusión gaseosa. Se ha estudiado la respuesta obtenida frente a la variación de la concentración de ion nitrito en el canal aceptor, el volumen de reactivo y las condiciones hidrodinámicas. Después de optimizar estas variables se ha determinado el límite de detección, la repetitividad y reproducibilidad del método propuesto. También se ha estudiado la estabilidad de las soluciones estándar de ozono y se ha realizado el análisis de muestras de agua dopadas.

Se realizó un estudio inicial de la cinética de la reacción, donde se evaluó la variación de la respuesta para tres concentraciones de ion nitrito y ozono. El sistema fue una variante del mostrado en la figura 4.3. Con el objetivo de obtener mayor respuesta se substituyó la inyección de reactivo con microbureta por el paso continuo de éste trasformando el sistema en un analizador de flujo continuo con difusión gaseosa situada en el canal de portador. El caudal se mantuvo a 1,5 ml/min para las tres soluciones, reactivo, ion nitrito y ozono. Los resultados obtenidos demuestran que existe transferencia de ozono a través de la membrana. En la figura 4.17 se muestran los resultados obtenidos en todas las condiciones estudiadas. Se observa que la altura de pico disminuye al aumentar la concentración de ozono, mientras que la sensibilidad de los calibrados se mantiene constante en todas las condiciones estudiadas (tabla 4.6).

**Tabla 4.6** Variación de la pendiente en calibrados efectuados con distinta concentración de O<sub>3</sub> de fondo en el canal dador.

| [O <sub>3</sub> ] (ppm) | Pendiente $\pm$ s <sub>a</sub> $\cdot$ t <sub>n-2</sub> | Ordenada $\pm$ s <sub>b</sub> $\cdot$ t <sub>n-2</sub> | r      |
|-------------------------|---|--|--------|
| 0,0                     | 0,41 $\pm$ 0,07   | 0,01 $\pm$ 0,09  | 0,9999 |
| 1,76                    | 0,4 $\pm$ 0,1   | -0,01 $\pm$ 0,14                                       | 0,9998 |
| 3,52                    | 0,419 $\pm$ 0,006                                       | -0,019 $\pm$ 0,008                                     | 0,9999 |
| 7,04                    | 0,395 $\pm$ 0,04  | -0,02 $\pm$ 0,05                                       | 0,9999 |

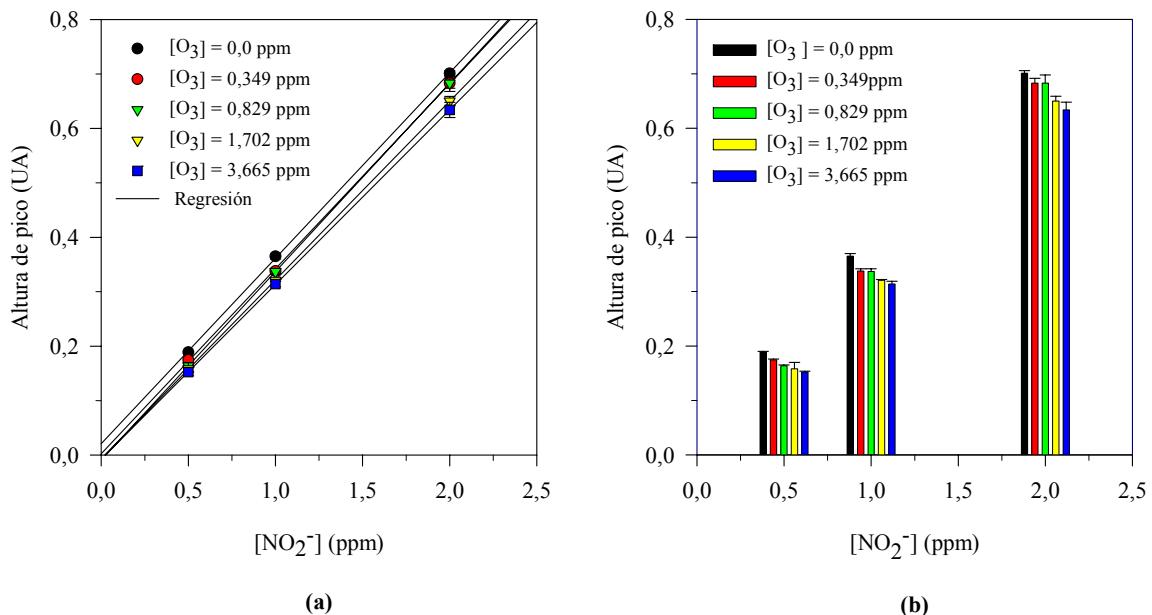


**Figura 4.17** Alturas de pico para tres  $[NO_2^-]$  analizadas en presencia de tres concentraciones de ozono en el canal aceptor.

Se obtuvo respuesta lineal para los 3 calibrados de ion nitrito realizados con fondo de ozono, comprobándose que la concentración de éste estaba en exceso respecto al ozono que se difundía a través de la membrana. Para determinar la concentración de ion nitrito óptima se realizaron una serie de calibrados múltiples con varias concentraciones de ozono de fondo, en las condiciones de análisis de los dos intervalos de concentración de ion nitrito descritas antes (§ 4.4.2).

#### 4.5.2.1 Estudio de la concentración de ion nitrito en el aceptor

Con el sistema GD r-FIA y utilizando las condiciones optimizadas en el apartado 4.4.2 para los dos intervalos de concentración de ion nitrito, se realizaron un total de nueve calibrados con distintas concentraciones de ozono de fondo. Las diferencias son el volumen de reactivo: 25  $\mu$ l para el intervalo 0,0-3,0 ppm y 350  $\mu$ l para el intervalo 0,0-0,1 ppm, y la longitud del tubo de reacción: 300 cm y 150 cm respectivamente. Las soluciones estándar de ozono se prepararon en todos los casos a partir de una solución de ozono saturada. Dependiendo del día en que se efectuaron los calibrados esta solución tenía una concentración diferente. Por este motivo las soluciones tienen concentraciones similares pero no coinciden exactamente. No obstante, en los calibrados efectuados en cada una de las condiciones se utilizaron los mismos estándares de ozono.



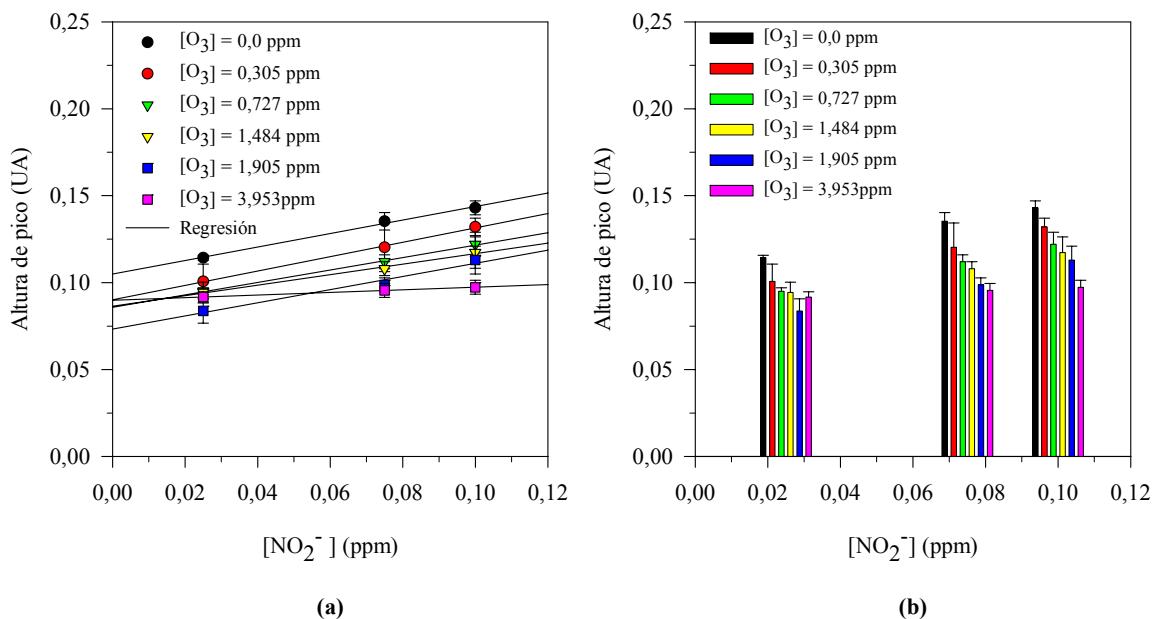
**Figura 4.18** Resultados obtenidos para los calibrados de ion nitrito en el intervalo 0,0-3,0 ppm. (a) Rectas de calibración para distintas concentraciones de ozono en el canal aceptor. (b) Valores de absorbancia en función de la concentración de ion nitrito y ozono.

En la figura 4.18 (a) se muestran los resultados obtenidos en el intervalo 0,0-3,0 ppm de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Se puede observar que la linealidad se conserva en todos los calibrados, obteniéndose pendientes similares. Como se puede observar en figura 4.18 (b), al aumentar la concentración de ozono disminuye la altura de pico, efecto más evidente a concentración baja de ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Por lo tanto se repite el resultado obtenido en el estudio preliminar con el sistema en continuo y se comprueba que para obtener mayor discriminación respecto a la concentración de ozono es necesaria una menor concentración de ion nitrito. Si se realiza la representación inversa, calibrado de ozono y concentración de ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> constante, no se obtiene relación lineal para ninguna de las tres concentraciones de ion nitrito. Lo que indica que las concentraciones de ion nitrito son muy altas.

En la figura 4.19 (a) se muestran los resultados obtenidos en el intervalo 0,0-0,1 ppm de ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> indican que se mantiene la relación lineal entre concentración de ion nitrito y altura de pico cuando los calibrados se realizan en presencia de ozono. En la figura 4.19 (b) se observa que disminuye la altura de pico cuando la concentración de ozono aumenta. Esta disminución es mayor a concentraciones altas de ozono.

En estas condiciones se obtiene relación de proporcionalidad entre concentración de ozono frente a altura de pico cuando la concentración de ion nitrito es 0,1 ppm. Pero con una baja sensibilidad,  $H(UA) = 0,130(\pm 0,004) - 0,008(\pm 0,002) \cdot [O_3]$  (ppm). Los resultados obtenidos indican que la concentración óptima de ion nitrito está entre 0,1-0,5 ppm. Concentraciones menores de 0,1 ppm limitan enormemente la sensibilidad respecto al ion nitrito y

concentraciones iguales o mayores a 0,5 ppm reducen la linealidad de la respuesta frente al ozono.



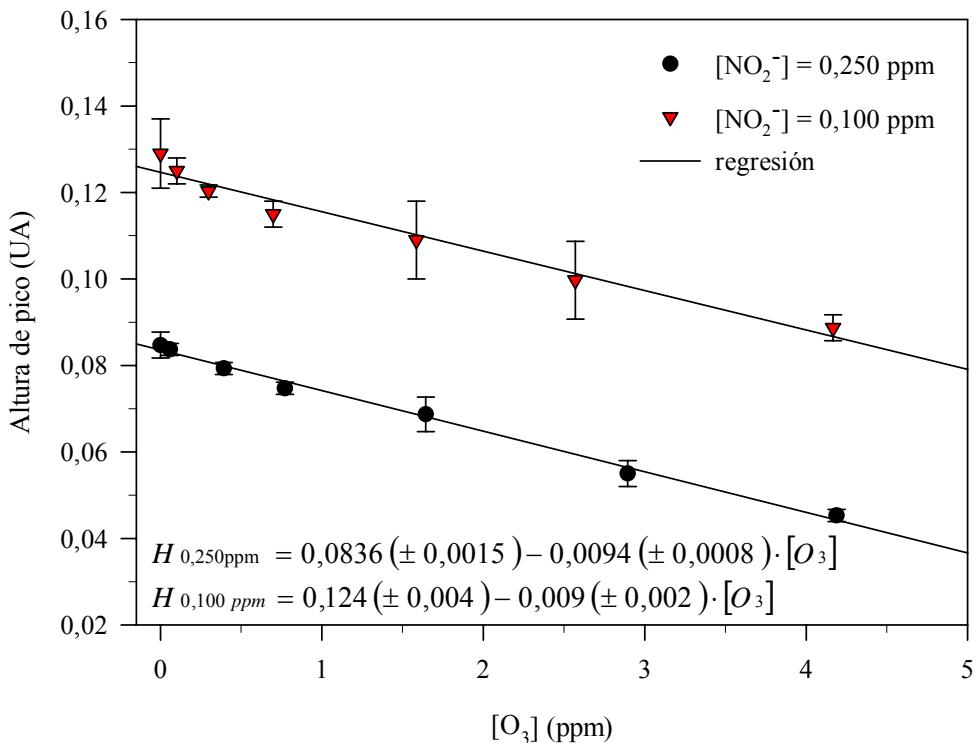
**Figura 4.19** Resultados obtenidos para los calibrados de ion nitrito en el intervalo 0,0-0,1 ppm. (a) Rectas de calibración para distintas concentraciones de ozono en el canal aceptor. (b) Valores de absorbancia en función de la concentración de ion nitrito y ozono.

### Calibrado fondo ion nitrito (0,1 y 0,250ppm)

Con el objeto de definir la concentración de ion nitrito óptima en este intervalo, se realizan dos calibrados de ozono utilizando una solución aceptora de 0,1 ppm y otra de 0,250 ppm. Las concentraciones de ozono en las soluciones estándar se encuentran en el intervalo 0,05-4,0 ppm, por ser las concentraciones habituales de ozono residual en aguas.

En la figura 4.20 se muestran los resultados obtenidos en ambas calibraciones. Se puede observar que para ambas concentraciones de ion nitrito se obtiene correlación lineal entre altura de pico y concentración de ozono.

Las sensibilidades son prácticamente iguales, pero la correlación que se obtiene para 0,250 ppm de ion nitrito es mejor que para 0,100 ppm. Por esta razón la concentración de ion nitrito en el canal portador queda fijada en 0,250 ppm.

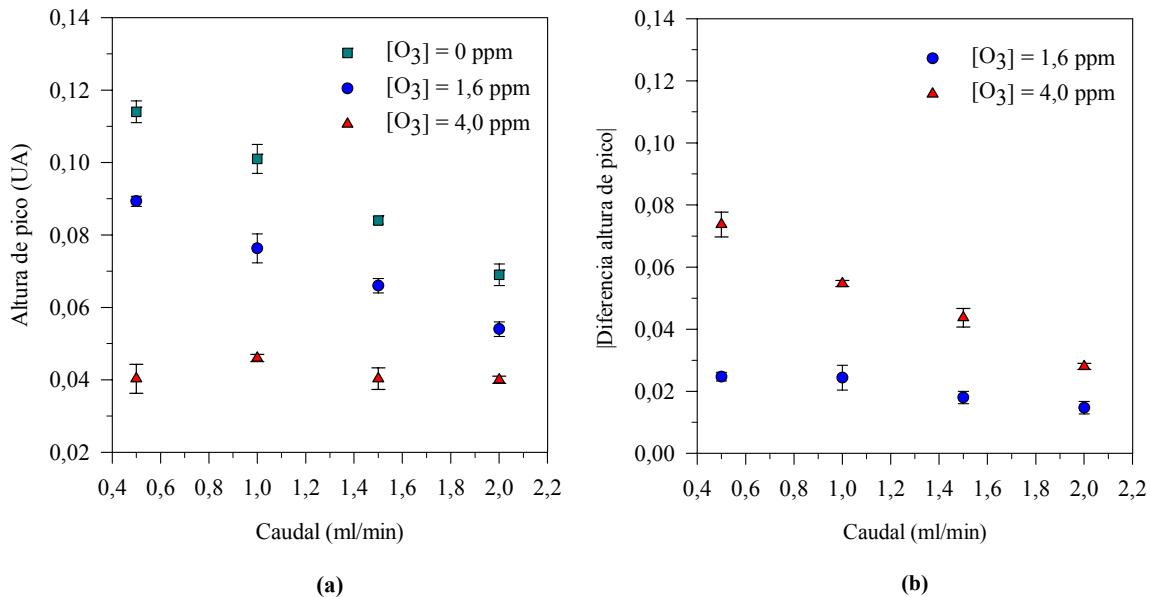


**Figura 4.20** Curvas de calibración obtenidas para dos concentraciones distintas de ion nitrito en el canal aceptor.  $[NO_2^-] = 0,1$  ppm y  $0,250$  ppm,  $Q=1,5$  ml/min,  $V_{iny}=350/25$   $\mu$ l. El error se ha calculado como  $I_{n-1}^{95\%}$ , para  $n=3$ .

#### 4.5.2.2 Efecto del caudal en la etapa de difusión

Después de optimizar la concentración de ion nitrito en el canal aceptor, se estudió la variación de la respuesta a cuatro caudales, tanto para el canal dador como para el aceptor, manteniendo constantes el volumen de reactivo (25 $\mu$ l) y la longitud del tubo de reacción (300 cm). Éstas son las condiciones óptimas del sistema r-FIA para análisis de ion nitrito en el intervalo de concentraciones 0,0-3,0 ppm. Los caudales estudiados fueron: 0,49; 0,99; 1,49; 1,99 ml/min y las determinaciones se realizaron por triplicado. El error asociado se ha calculado como el intervalo de confianza para un nivel del 95%. Los resultados se muestran en la figura 4.21.

En la figura 4.21 (a) se observa que la disminución de absorbancia sigue una proporcionalidad lineal respecto a la concentración de ozono en el canal dador y el caudal para la concentración de 1,6 ppm, mientras que para la  $[O_3] = 4,0$  ppm se mantiene constante. Este hecho se explica porque a concentraciones bajas domina la cinética de la reacción de ion nitrito frente al proceso de difusión porque la cantidad de ion nitrito que no ha reaccionado es alta. El efecto contrario se observa a concentraciones de ozono altas en este caso la concentración de ion nitrito después de la difusión es baja, por lo tanto el efecto del caudal no es importante.



**Figura 4.21** Estudio del efecto del caudal en la etapa de difusión; (a) alturas de pico para el blanco, 1,6 ppm de ozono y 4,0 ppm de ozono y (b) diferencia de absorbancia en valor absoluto respecto al blanco.

En la figura 4.21 (b) se muestra el valor de incremento de absorbancia frente al caudal. Se puede comprobar que el caudal afecta proporcionalmente al proceso de difusión al aumentar el tiempo de intercambio. Este efecto es más evidente a concentraciones altas, se observa que para una concentración de ozono de 4 ppm y un caudal de 0,5 ml/min se obtiene un incremento de absorbancia mayor que para la misma concentración pero a un caudal superior por ejemplo 2,0 ml/min. Para concentraciones menores el efecto del caudal es el mismo pero menos evidente ya que los incrementos de absorbancia obtenidos no son significativos. Por otro lado, el tiempo de análisis es inversamente proporcional al caudal, por ejemplo para 0,5 ml/min el tiempo de análisis necesario son 150 s y para 1,5 ml/min es de 60s. Finalmente, se establece un compromiso entre eficacia en la etapa de difusión y frecuencia de análisis, y se escoge como óptimo el caudal de 1,5 ml/min. En estas condiciones la difusión a concentraciones medias de ozono es adecuada y la frecuencia de análisis es alta (60 h<sup>-1</sup>).

#### 4.5.2.3 Rendimiento de la etapa de difusión

El rendimiento se ha determinado mediante comparación de la respuesta obtenida para el blanco ( $[\text{NO}_2^-]_{\text{aceptor}}=0,250$  ppm,  $[\text{O}_3]_{\text{dador}}=0,0$  ppm) frente a concentraciones variables de ozono en el canal dador. El cálculo se ha realizado con los resultados experimentales obtenidos en el primer calibrado (figura 4.20).

Para calcular el rendimiento se ha determinado la concentración de ozono difundida a través de la membrana desde el canal dador y se ha relacionado con la  $[\text{O}_3]_{\text{inicial}}$ . La

$[O_3]_{\text{difundido}}$  se ha calculado suponiendo que el 100% del ozono que atraviesa la membrana reacciona con el ion  $NO_2^-$  que circula por el canal aceptor (ecuación 4.1). La concentración de nitrito analizado después de la etapa de difusión se ha relacionado estequiométricamente con la cantidad de ozono que se ha difundido (ecuación 4.2). El rendimiento se ha calculado dividiendo la concentración de ozono difundido por la concentración inicial de ozono en el canal dador (ecuación 4.3).

$$[NO_2^-]_{\text{reaccionado}} = [NO_2^-]_{\text{inicial}} - [NO_2^-]_{\text{analizado}} \quad \text{ecuación 4.1}$$

donde, la  $[NO_2^-]_{\text{analizado}}$  se obtiene del análisis efectuado después de la etapa de difusión, y por la estequiometría de la reacción (reacción 4.1):

$$[O_3]_{\text{difundido}} = [NO_2^-]_{\text{reaccionado}} / 2 \quad \text{ecuación 4.2}$$

Finalmente, el rendimiento de la etapa de difusión es:

$$R (\%) = ([O_3]_{\text{difundido}} / [O_3]_{\text{inicial}}) \times 100 \quad \text{ecuación 4.3}$$

El rendimiento medio obtenido durante el calibrado fue 2,2%. Las variables que afectan al rendimiento son concentración de ozono y, la superficie y tiempo de intercambio [Canham et al., 1988]. La concentración varía a lo largo del calibrado mientras que superficie y tiempo permanecen constantes. Se han obtenido distintos rendimientos en función de la concentración de ozono, inversamente proporcionales a ésta. Este hecho se explica en función de las variables que limitan el proceso de difusión, ya que las variables físicas son constantes la difusión sólo depende de la concentración de ozono en el canal aceptor. Aunque la difusión sea directamente proporcional a la concentración, la difusión relativa a concentraciones mayores es pequeña cuando se compara respecto a un valor superior de concentración en el canal dador.

A pesar de que el rendimiento medio resulta bajo, es el adecuado para obtener una respuesta lineal entre la concentración de ozono y la disminución de absorbancia. Se ha de tener en cuenta que la concentración de ion nitrito en el canal portador es pequeña comparada con la de ozono, y que si el rendimiento fuese mayor se agotaría todo el ion nitrito de la solución aceptor. Además el análisis de ion nitrito en estas condiciones tiene una sensibilidad adecuada para el intervalo de concentración de ozono el que se quiere aplicar (0,06-4,0 ppm). Si se pretendiese disminuir el intervalo de linealidad y analizar concentraciones menores de ozono, podría estudiarse con más detalle la etapa de difusión para obtener un mayor rendimiento en ésta. De manera que se podría introducir una concentración de ion nitrito superior en el canal aceptor, lo que permitiría tener unas señales mayores, aunque un intervalo de respuesta lineal menor.

#### 4.5.3 Caracterización del sistema

Una vez definidas la concentración de ion nitrito y el caudal óptimos, se procedió a determinar los parámetros de calidad del método desarrollado. Se determinaron el límite de detección, la repetitividad y la reproducibilidad del método. También se estudio la estabilidad de los estándares de ozono.

##### 4.5.3.1 Límite de detección y repetitividad

El límite de detección se ha determinado experimentalmente estudiando la concentración mínima de ozono que provoca disminuciones de absorbancia significativas respecto al blanco. No puede calcularse en función de la respuesta del blanco ya que el valor de absorbancia máximo se obtiene para 0,0 ppm de ozono y, ésta disminuye al aumentar la concentración. Como criterio se ha establecido una diferencia de absorbancia mínima entre la respuesta del blanco y la concentración de ozono de 0,002 UA. Se ha de tener en cuenta que la sensibilidad media obtenida en los calibrados efectuados fue  $-0,0092(\pm 0,0012)$  UA/ppm. En la tabla 4.7 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 4.7** Resultados obtenidos en la determinación de límite de detección y repetitividad del método. En todos los casos  $n=10$  y  $I_{n-1}^{95\%}=(t_{n-1}^{95\%}/s_{n-1})/(n)^{1/2}$ . La desviación estándar relativa ha sido calculada como  $RSD(\%)=(s_{n-1}/\text{media}) \cdot 100$ .

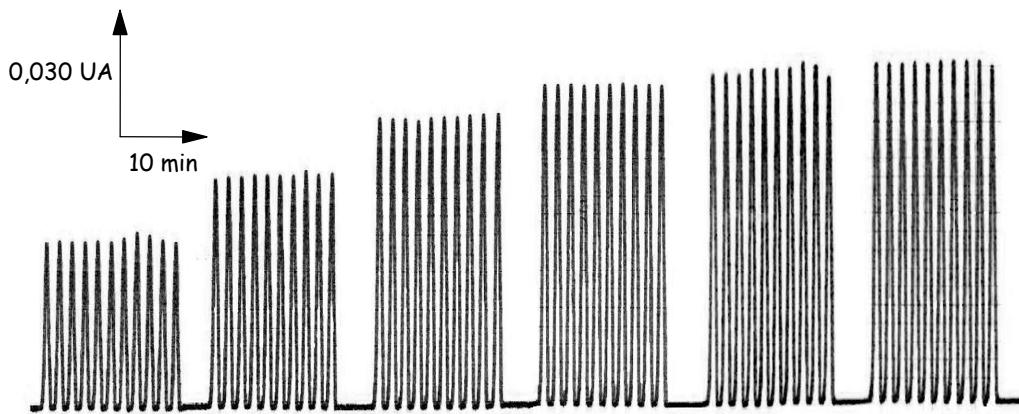
| [O <sub>3</sub> ] (ppm) | altura de pico $\pm I_{n-1}^{95\%}$ | Δ altura de pico | RSD (%) |
|-------------------------|-------------------------------------|------------------|---------|
| 0,000                   | 0,084 $\pm$ 0,001                   | -                | 0,94    |
| 0,044                   | 0,082 $\pm$ 0,001                   | 0,002            | 0,63    |
| 0,291                   | 0,079 $\pm$ 0,001                   | 0,005            | 0,65    |
| 0,844                   | 0,072 $\pm$ 0,002                   | 0,012            | 1,37    |
| 1,338                   | 0,068 $\pm$ 0,002                   | 0,016            | 1,45    |
| 2,764                   | 0,054 $\pm$ 0,001                   | 0,039            | 1,83    |
| 4,480                   | 0,039 $\pm$ 0,001                   | 0,045            | 2,18    |

El procedimiento ha consistido en realizar 10 replicados de todos los estándares analizados en un calibrado, y verificar a partir de cual se obtiene una disminución significativa de absorbancia. La concentración menor de ozono con la que se obtuvo una diferencia significativa fue 0,044 ppm.

El límite de detección obtenido 0,044 ppm es algo mayor al método DG-FIA propuesto por Straka et al. [1985], con un límite de detección de 0,03 ppm. El método propuesto es lineal en un intervalo de concentración mayor, con un LSRL superior en una década respecto al método anterior referenciado.

La repetitividad se determinó como la desviación estándar relativa para 10 replicados de cada una de las concentraciones analizadas en un calibrado. En la tabla 4.10 se muestran

los resultados obtenidos. Los valores de RSD (%) se encuentran entre 0,63-2,18 calculado con la media de las 10 lecturas de absorbancia. La repetitividad obtenida es buena para un método instrumental, ya que RSD sólo supera el 1,5% de error en las dos últimas concentraciones. En la figura 4.22 se muestran los resultados experimentales obtenidos para 0,044; 0,291; 0,844; 1,338; 2,764 y 4,448 ppm de ozono.



**Figura 4.22** Estudio de la repetitividad del método propuesto. De derecha a izquierdo: (a)  $[O_3]=0,044$  ppm, (b)  $[O_3]=0,291$  ppm (c)  $[O_3]=0,844$  ppm (d)  $[O_3]=1,338$  ppm (e)  $[O_3]=2,764$  ppm y (f)  $[O_3]=4,448$  ppm

#### 4.5.3.2 Estabilidad estándares de ozono

La estabilidad de las disoluciones de ozono se ha determinado realizando replicados de una concentración y midiendo la absorbancia a  $\lambda=260$  nm al comienzo y al final del análisis. En la tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos. Se realizaron medidas de absorbancia a tiempo cero y los 15 minutos después de realizar el último replicado.

**Tabla 4.8** Estabilidad de los estándares de ozono. La concentración de ozono se determinó por medida de absorbancia a  $\lambda=260$ nm.

| Abs <sub>t=0</sub> | Abs <sub>t=15</sub> | [O <sub>3</sub> ] <sub>t=0</sub> | [O <sub>3</sub> ] <sub>t=15</sub> | Δ[O <sub>3</sub> ] (%) |
|--------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| 0,003              | 0,004               | 0,044                            | 0,058                             | 31,8                   |
| 0,020              | 0,021               | 0,291                            | 0,305                             | 5,0                    |
| 0,058              | 0,055               | 0,844                            | 0,800                             | 5,2                    |
| 0,092              | 0,090               | 1,338                            | 1,309                             | 2,2                    |
| 0,190              | 0,188               | 2,764                            | 2,735                             | 1,1                    |
| 0,308              | 0,305               | 4,480                            | 4,422                             | 1,3                    |

La degradación del estándar se ha calculado como  $|[O_3]_{t=0} - [O_3]_{t=15}| / [O_3]_{t=0} \times 100$ . Se puede comprobar que el % de degradación es independiente de la concentración, con un valor medio de 3%. El % de degradación de la primera concentración no se ha tenido en cuenta porque el orden de magnitud de la medida es igual al error asociado debido a las limitaciones experimentales ( $0,003 \pm 0,001$  UA). La variación de concentración en los

estándares no afecta a la repetitividad (figura 4.22) ya que las diferencias de concentración son menores o iguales al límite de detección en todos los casos.

#### 4.5.3.3 Reproducibilidad

La reproducibilidad del método propuesto ha sido estimada mediante comparación de los pendientes de calibrados realizados en días distintos. Se utilizó el análisis de varianza de un factor ANOVA, no existiendo diferencias significativas entre calibrados con un 95% de confianza ya que  $F_{calculada} < F_{tabulada}$ . En la tabla 4.9 se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla 4.9** Estudio de reproducibilidad.

| Rectas de calibración (n=7)  | ANOVA de un factor |
|--|--------------------|
| $H (UA) = a (\pm t_{(n-2)} \cdot s_a) + b (\pm t_{(n-2)} \cdot s_b) \cdot [O_3] \text{ (ppm)}$ |                    |
| $H = 0,084 (\pm 0,002) - 0,0094 (\pm 0,0008) \cdot [O_3]$                                      | $r = 0,995$        |
| $H = 0,082 (\pm 0,002) - 0,0089 (\pm 0,0009) \cdot [O_3]$                                      | $r = 0,992$        |
| $H = 0,084 (\pm 0,002) - 0,011 (\pm 0,001) \cdot [O_3]$  | $r = 0,995$        |
| $H = 0,082 (\pm 0,001) - 0,0086 (\pm 0,0006) \cdot [O_3]$                                      | $r = 0,996$        |
| $H = 0,082 (\pm 0,002) - 0,0076 (\pm 0,0008) \cdot [O_3]$                                      | $r = 0,999$        |
| $H = 0,082 (\pm 0,002) - 0,0099 (\pm 0,0008) \cdot [O_3]$                                      | $r = 0,994$        |

A continuación, en la tabla 4.10 se resumen las principales características de método propuesto para el análisis de ozono mediante difusión gaseosa en un sistema r-FIA.

**Tabla 4.10** Principales parámetros de calidad del sistema GD r-FIA para la determinación de ozono.

| Parámetro                              | Valor                             |
|--|-----------------------------------|
| Intervalo lineal                       | 0,0 – 5,0 ppm                     |
| Límite de detección                    | 0,044 ppm                         |
| Volumen de reactivo                    | 25 $\mu$ l                        |
| Consumo de muestra                     | 1,5 ml min <sup>-1</sup>          |
| Consumo ion nitrito                    | 1,5 ml min <sup>-1</sup>          |
| Repetitividad (%RSD, n=10)             | 0,63 – 2,18                       |
| Reproducibilidad (ANOVA 1 vía)         | $F_{cal} = 0,32 < F_{tab} = 9,55$ |
| Frecuencia análisis (h <sup>-1</sup> ) | 60                                |

#### 4.5.4 Análisis de agua dopada con ozono

Para evaluar la resolución del sistema se realizó el análisis de dos muestras de agua dopadas. La primera fue agua de la red a la que se ajustó el pH a 2 con ácido sulfúrico y la segunda agua MilliQ al mismo pH. En la figura 4.23 se muestra el calibrado efectuado y el resultado obtenido para ambas muestras.

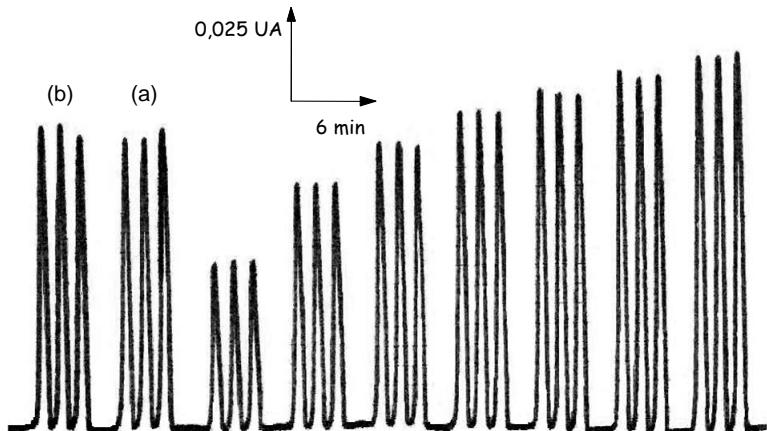


Figura 4.23 Calibrado y muestras de agua dopadas con ozono: (a) agua de la red, y (b) agua MilliQ.

La concentración real de ozono determinada espectrofotométricamente después de la preparación de la soluciones fue  $[O_3]_{red}=1,67$  ppm y  $[O_3]_{MilliQ}=1,75$  ppm. El resultado obtenido en el sistema DG-r-FIA fue  $[O_3]_{red}=1,50\pm0,16$  ppm y  $[O_3]_{MilliQ}=1,65\pm0,16$  ppm. El error se ha calculado como  $I_{n-1}^{95\%}$ . Se ha comprobado que la etapa de difusión de gases eliminaba las interferencias de la matriz de la muestra ya que se obtuvieron resultados comparables en los análisis del agua de red dopada y MilliQ en los dos métodos utilizados.

#### 4.6 Conclusiones

Ha sido validada la substitución de una válvula de seis vías en un sistema FIA monocanal de referencia por una microbureta automática, como elemento de inserción de muestra. Se comprobó la viabilidad de la substitución realizando pruebas sobre la difusión en ambos casos mediante la caracterización y comparación de la respuesta obtenida cuando no existe reacción química. No encontrándose diferencias significativas entre ambos sistemas de inyección. El nuevo método de inserción de muestra presenta las siguientes ventajas: no es necesaria una reconfiguración del sistema para variar el volumen de inyección, modificándose simplemente con un programa de inyección variable (la válvula de seis vías hace necesario cambiar el bucle de muestra), y se mejora el grado de mezcla de muestra y reactivo, ya que la microbureta inserta la muestra como si fuera un canal adicional mientras está en funcionamiento.

Es de destacar la potencialidad que presenta la utilización de la microbureta en el diseño de sistemas inteligentes de monitorización en continuo. Un adecuado estudio de los límites de fluctuación de la concentración de un analito permitiría prever diferentes intervalos de autocalibración. Como demostración de las posibilidades que aporta este tipo de inserción, se implementó un analizador de ion nitrito basado en la reacción de Griess-Ilosvay e implementado en la metodología r-FIA. Estableciéndose un sistema de análisis

autoadaptativo de ion nitrito en dos intervalos de concentración distintos, mediante variación del volumen de reactivo insertado. Se ha caracterizado el método desarrollado, estudiando para todas las condiciones, el límite de detección, la repetitividad y la reproducibilidad, confirmándose la viabilidad el método desarrollado.

Las ventajas que presenta esta modificación, en una metodología aplicada desde hace 20 años [Hansen, 1995] son numerosas:

- Suministra versatilidad en la metodología de análisis por inyección en flujo, ya que sin otra variación que el volumen de inyección permite realizar análisis en dos intervalos de concentración determinada. Los intervalos de trabajo optimizados en este estudio son los siguientes: de 0-0,1 ppm de ion nitrito con una desviación estándar relativa de 1,35% (RSD) y de 0-3,0 ppm con una desviación estándar relativa de 0,52% (RSD).
- No supone un aumento de coste excesivo respecto a los sistemas tradicionales, porque solamente varía el método de inyección que se realiza con una microbureta. Ésta es controlada por un ordenador que también se utiliza para adquisición de datos.
- En el método propuesto (rFIA) se procede a la inyección del reactivo, el volumen de éste es 25  $\mu$ l para la zona de concentraciones de superior y 350  $\mu$ l para la zona de concentraciones menor a 0,1 ppm. Ambos volúmenes son pequeños, si se comparan con el consumo de un sistema de flujo convencional, por tanto éste se minimiza. Adicionalmente se minimiza la generación de residuos. Este consumo menor permite aumentar el tiempo de funcionamiento autónomo del sistema.
- Los campos de aplicación de esta técnica son aquellos en los que se dispone de muestra en exceso. En este sentido, tiene un gran potencial en la monitorización de parámetros de interés medioambiental. La aplicación de una microbureta como sistema de inyección en FIA, tiene como ventajas adicionales la disminución del coste del análisis y el aumento del tiempo de funcionamiento autónomo del equipo.
- Los resultados obtenidos confirman que éste sistema de inyección es de aplicación general para el diseño de sistemas de análisis por inyección en flujo. Su potencial de autoadaptación permitiría diseñar aplicaciones muy interesantes. Como ejemplo, su inserción en el sistema de flujo que incorporan etapas de preconcentración permitiría, en función del límite de detección de la técnica de medida, modular el volumen de muestra a analizar.

Respecto a la aplicación del análisis de ozono puede concluirse que en el método propuesto se obtiene una sensibilidad media baja ( $-0,0092(\pm 0,0012)$  UA/ppm) pero el intervalo lineal se amplia respecto a otros métodos con un límite superior de respuesta lineal (LSRL) de 5,0 ppm. El método estándar tiene un LSRL de 0,5 ppm. Mientras que el método propuesto por Straka et al. [1985] tiene un LSRL de 0,4 ppm, pero una sensibilidad mayor. Por otro

lado, el límite de detección (LD) es superior al obtenido en otros métodos (0,044 ppm), aunque del mismo orden de magnitud. El método estándar y el método propuesto por Darby et al. [1995], tienen el LD menor entre 0,010 ppm y 0,020 ppm. Este último método está basado en la decoloración del mismo reactivo que el método estándar pero en un sistema DG-FIA.

Estos resultados no son una desventaja ya que la concentración de ozono residual normalmente está comprendida entre 0,05-5,0 mg/l [Straka et al., 1984]. Así, el sistema propuesto, aunque de baja sensibilidad, puede aplicarse en un amplio intervalo de concentración con la ventaja de no ser necesaria la dilución de la muestra. Lo que resulta especialmente útil en sistemas de monitorización en continuo. Además, presenta un LD mayor pero comparable a los otros métodos comentados.

## 4.7 Bibliografía

- Alegret, S.; Alonso, J.; Bartrolí, J.; Martínez-Fabregas, E.** "Flow-injection system for on-line potentiometric monitoring of ammonia in freshwater streams", *Analyst*, **114**, 1443-1447, (1989).
- Alegret, S.; Alonso, J.; Bartrolí, J.; del Valle, M.; Jaffrezic, N.; Duvalt-Herrera, Y.** "Flow-through pH-ISFET as detector in automated determination of ammonia", *Analytica Chimica Acta*, **231**, 53-58, (1990).
- APHA-AWWA-WEF**; "Standard methods for the examination of water and wastewater". 20th edition. Ed. APHA-AWWA-WEF, 4500- O<sub>3</sub>A (1999).
- Bartrolí, J.; Escalada, M.; Jiménez, C.; Alonso-Chamarro, J.** "Determination of total and free sulphur dioxide in wine by Flow Injection Analysis and gas-diffusion using p-aminoazobenzene as the colorimetric reagent", *Analytical Chemistry*, **63** (21) 2532-2535, (1991).
- Betteridge, D.; Sly, T.J.; Wade, A.P.** "Versatile automatic development system for flow injection analysis", *Analytical Chemistry*, **58**, 2258-2265. 1986.
- Canham, J.S.; Gordon, G.; Pacey, G.E.** "Optimization of parameters for gas-diffusion flow-injection systems", *Analytica Chimica Acta*, **209**, 157-163, (1988).
- Caulcutt, R.; Boddy R.** "Statistics for analytical chemists", E.d. Chapman and Hall, London-New York, (1983).
- Darby, J.L.; Chang, D.P.Y.; Coggins, P.S.; Chung, H.K.; Dasgupta, P.K.** "Automated measurement of aqueous ozone concentration", *Process Control and Quality*, **6** (4), 229-243, (1995).
- Gabriel, D; Baeza, J.; Valero, F.; Lafuente, J.** "A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on N/D criteria", *Analytica Chimica Acta*, **359**, 173-183, (1998).
- Hansen, E.H.** "Flow injection analysis: leaving its teen years and maturing a personal reminiscence of its conception and early development", *Analytica Chimica Acta*, **308**, 3-13, (1995).
- <http://www.flowinjection.com/flowinjection>, consultada en marzo de 2004.
- Kubán, P.; Janos, P.; Suban, V.** "Gas diffusion-flow injection analysis of free and total sulfur dioxide in wines by conductometry", *Collection of Czechoslovak chemical communications*, **63** (6), 770-782 (1998).
- Kubán, V.** "Gas diffusion/permeation flow injection analysis. Part I. Principles y instrumentation", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **23** (5), 323-354, (1992).
- Machado, E.L.; Dressler, V.L.; Martins, A.F.** "Spectrophotometric determination of ozone in ozonized air currents using a flow injection systems", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **6** (4), 343-348, (1995).
- McKelvie, I.D.; Peat, D.M.W.; Matthews, P.; Worsfold, P.J.** "Elimination of the Schlieren effect in the determination of reactive phosphorus in estuarine waters by flow-injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **351**, 265-271, (1997).
- Miller, J.C., Miller, J.N.**, "Estadística para Química Analítica", E.d. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., (1993).
- Oms, M.T., Cerdá, A.; Cerdá, V.** "Sequential injection analysis of nitrites and nitrates", *Analytica Chimica Acta*, **315**, 321-330, (1995).

- Onari, Y.** "Spectrophotometric determination and FIA of aqueous ozone based on the ozone decoloration reaction of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)aniline-iron(II) complex", *Bunseki Kagaku*, **43** (8), 635-639, (1994).
- Peris, M.; Ors, R.; Bonastre, A.; Gil, P.; Serrano, J.** "Advanced application of rule nets to the automation of chemical analysis systems", *Analytica Chimica Acta*, **354**, 249-253, (1997).
- Ruzicka, J.; Hansen E.H.** "Flow Injection Analysis. Part I: A new concept of fast continuous flow analysis", *Analytica Chimica Acta*, **78**, 145, (1975).
- Ruzicka, J.; Hansen E.H.** "Flow Injection Analysis", 2nd ed. E.d. Wiley-Interscience Publication, (1988).
- Sawyer L.N.; McCarty P.L.; Parfin, G.F.** Chemistry for Environmental Engineering. Ed Mc Graw Hill, (1994).
- Schmidt, H-L.; Becker, T.; Ogbomo, I.; Schuhmann, W.** "Flow-injection analysis systems with immobilized enzymes. Improvement of applicability by integration of coupled reactions, separation steps and background correction", *Talanta*, **43**, 937-942, (1996).
- Straka, M.R.; Gordon, G.; Pacey, G.E.** "Residual aqueous ozone determination by gas diffusion flow injection analysis", *Analytical Chemistry*, **57**, 1799-1803, (1985).
- Straka, M.R.; Pacey, G.E.; Gordon, G.** "Residual ozone determination by flow injection analysis", *Analytical Chemistry*, **56**, 1973-1975, (1984).
- Valcarcel, M; Luque de Castro, M.D.** "Análisis por inyección en flujo", Imprenta San Pablo. Murcia, Córdoba, (1984).
- Xingguo, C.; Ketai, W.; Zhide, H.; Zhengfng, Z.** "Kinetic flow injection spectrophotometric determination of nitrite by its catalytic effect on the oxidation of chlorophosphonazo-pN by bromate". *Analytical Letters*, **29**(11), 2015-2023, (1996).



**SIA autoadaptativo**



# Capítulo 5

---

## *Análisis de ion nitrito por inyección secuencial autoadaptativo*

---

### 5.1 Introducción

La creciente demanda actual de métodos analíticos que permitan la supervisión en continuo de procesos tanto industriales como medioambientales, ha conducido al desarrollo de nuevos sistemas analíticos que pueden trabajar de forma autónoma durante largos períodos de tiempo con poco mantenimiento y bajo consumo de reactivo. El análisis por inyección en flujo (FIA) satisface, gracias a su simplicidad y robustez, muchos de los requisitos necesarios para el diseño de este tipo de equipos. Este hecho ha favorecido su utilización en el diseño de sistemas supervisores [Baxter y Christian, 1996]. Así mismo, se pueden obtener ventajas adicionales explotando la potencialidad de autoadaptación de las técnicas continuas de flujo. En este sentido, los sistemas de flujo continuo pueden ser diseñados para modificar automáticamente sus parámetros operacionales adaptándose a los requisitos de la muestra. Generalmente, los analizadores basados en técnicas de flujo convencionales se diseñan como sistemas cerrados y dedicados, útiles para ser aplicados en el análisis de muestras con composiciones definidas. Cuando es necesario introducir modificaciones en las características de respuesta del sistema, esto solo puede ser realizado alterando, físicamente el diseño instrumental. Esta situación limita su aplicabilidad en régimen de funcionamiento automático y autónomo cuando se espera una alta variabilidad en la

concentración del analito a determinar. Esta desventaja se puede evitar fácilmente mediante el uso de una técnica alternativa llamada análisis por inyección secuencial (SIA), que confiere flexibilidad, robustez y un alto grado de capacidad de autoadaptación [Ruzicka y Marshall, 1990; Cladera et al., 1995].

Como se ha explicado en el apartado § 1.4.1, la técnica SIA se basa en la aspiración secuencial de pequeños volúmenes de muestra y de reactivo en un tubo de acumulación, que posteriormente son enviados, a través de un tubo de reacción, hacia el detector. Durante este transporte se producen la mezcla y la reacción utilizadas para generar la señal analítica. El equipo más sencillo consta de una válvula selectora múltiple, un sistema propulsor que gestiona los distintos fluidos y un detector adecuado para la determinación química a realizar. Todas las operaciones relacionadas con la gestión de líquidos se pueden automatizar usando una bureta automática y una válvula de la selección. El movimiento en ambas direcciones del pistón de la jeringa se traduce en el proceso de aspiración e impulsión, mientras que la longitud del movimiento del pistón regula los volúmenes de los líquidos. La secuencia de selección de las zonas de muestra/reactivo y las operaciones unitarias adicionales (inyección, lavado) se controlan con la ayuda de la válvula de la selección [Oms et al., 1995].

Una tendencia lógica para futuros desarrollos es la introducción de cierto grado de inteligencia en los sistemas analíticos [Peris et al., 1997]. La puesta en práctica de este nuevo concepto requiere el uso de instrumentación capaz de reconfigurarse automáticamente lo que resulta incompatible con la instrumentación habitualmente empleada en el diseño de los equipos FIA. La técnica SIA ha realizado avances en este sentido [Rius et al., 1995; Ruisánchez et al., 1997] aunque el problema adicional de desarrollar programas de control específicos a ralentizado la aplicación de estas estrategias de control en sistemas de flujo. Lenehan et al. [2002] en un *review* muy extenso sobre la técnica dicen que, hasta el momento, sólo existían tres referencias en las que se hubiesen desarrollado programas de control y adquisición de datos para SIA.

En este capítulo, se propone un sistema de análisis que demuestra las posibilidades de la técnica SIA en el diseño de sistemas de monitorización autoadaptativos e inteligentes para el control analítico de procesos. El sistema propuesto es especialmente adecuado para analizar, de forma muy sensible, muestras reales cuando los intervalos habituales de trabajo son muy amplios. El sistema tiene capacidad, además, para operar en régimen de funcionamiento autónomo durante largos períodos de tiempo. Se han realizado estudios preliminares de la respuesta del sistema sin reacción química y con reacción química. Para visualizar la potencialidad de los sistemas autoadaptativos, se ha propuesto, como demostrador, un sistema para el análisis de ion nitrito en dos intervalos de concentración

diferentes. El paso inicial es obtener la señal analítica correspondiente a la muestra. A continuación, el sistema, mediante un control *feedback* programado, decide si las condiciones operacionales son óptimas y, si es necesario, adopta automáticamente una nueva configuración (relación muestra/reactivo) y repite el análisis. El programa de gestión integrado del sistema selecciona automáticamente entre dos configuraciones alternativas, previamente diseñadas y optimizadas, que suministran la mejor sensibilidad posible en función del nivel de concentración del analito en la muestra. No es necesario ningún cambio físico adicional en los otros parámetros operacionales optimizados previamente. Este sistema puede ser muy útil en el control de una estación depuradora de aguas residuales urbanas (EDAR) con eliminación de nitrógeno. Las EDAR urbanas con eliminación de nitrógeno tratan agua que contiene generalmente concentraciones de ion nitrato menores de 30 ppm. Aunque la concentración de ion nitrito raramente alcanza 1 ppm si la planta funciona correctamente, una carga excesiva de ion amonio inhibe la oxidación biológica del nitrito a nitrato. Esto puede aumentar la concentración de nitrito en el reactor muy por encima de ese valor [Gabriel et al., 1998]. El sistema desarrollado permite la monitorización de este parámetro en cualquiera de las situaciones reales que se puedan plantear y facilita la adopción de las acciones necesarias para un control óptimo de la operación de la planta. La necesidad de controlar este parámetro en plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas [Cerdà et al., 1997], efluentes industriales [van Staden y van der Merwe, 1998] y en aguas naturales [Motomizu et al., 1997; Cerdà et al., 1998; Miró et al., 2000] demuestra la actualidad del tema. El método propuesto ha sido aplicado en la determinación de ion nitrito en muestras procedentes de una EDAR piloto. Se estudiaron dos situaciones diferentes: seguimiento de un estudio cinético de inhibición de ion nitrito a concentraciones muy elevadas (0-1500 ppm) en el funcionamiento del proceso de la planta y monitorización de un estudio de respirometría donde se siguió la degradación de ion  $\text{NH}_4^+$  a ion  $\text{NO}_2^-$ . En este caso el intervalo de concentración fue menor (0-20 ppm).

## 5.2 Descripción del sistema

### 5.2.1 Instrumentación

El equipo SIA utilizado aparece en la figura 5.1. El núcleo instrumental del sistema está constituido por un módulo realizado bajo encargo por EASI Technologies S.A que integra una microbureta que permite el desplazamiento del fluido en dos direcciones y a diferentes velocidades, un tubo de acumulación, un tubo de reacción y una válvula selectora de 6 vías. Como complemento se utiliza un sistema de detección y un ordenador para la gestión integrada de todo el sistema, en base al software desarrollado con este objetivo.

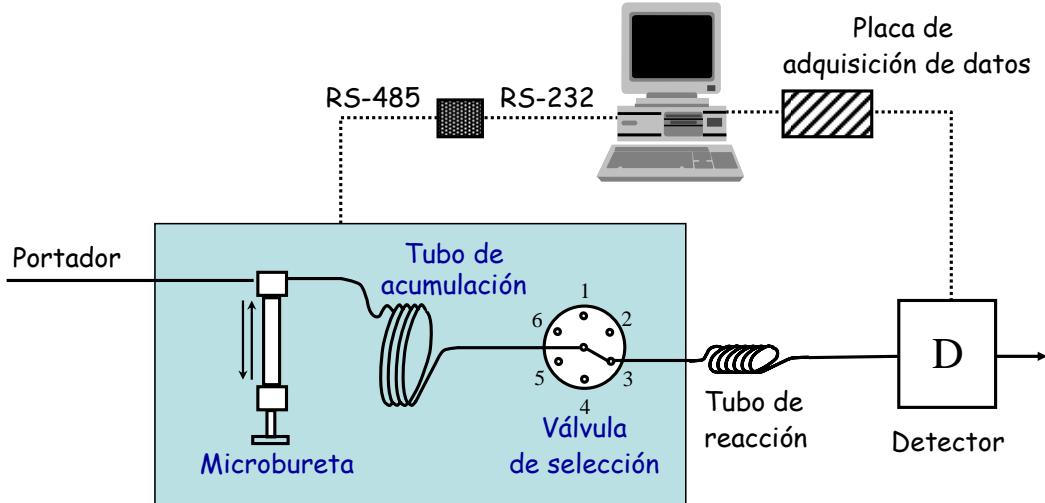


Figura 5.1 Esquema del sistema SIA de gestión de fluidos.

Inicialmente se aspiran el reactivo y la muestra (o patrones) hacia el tubo de acumulación. La válvula de 6 vías permite la selección de diferentes alícuotas de muestra y reactivos así como transportar la mezcla hacia el detector una vez transcurrido un tiempo prefijado (figura 5.2). El sistema de propulsión es la microbureta que permite aspirar e impulsar fluidos desde la izquierda o desde la derecha y también variar el caudal ya que el émbolo se mueve a diferentes velocidades.

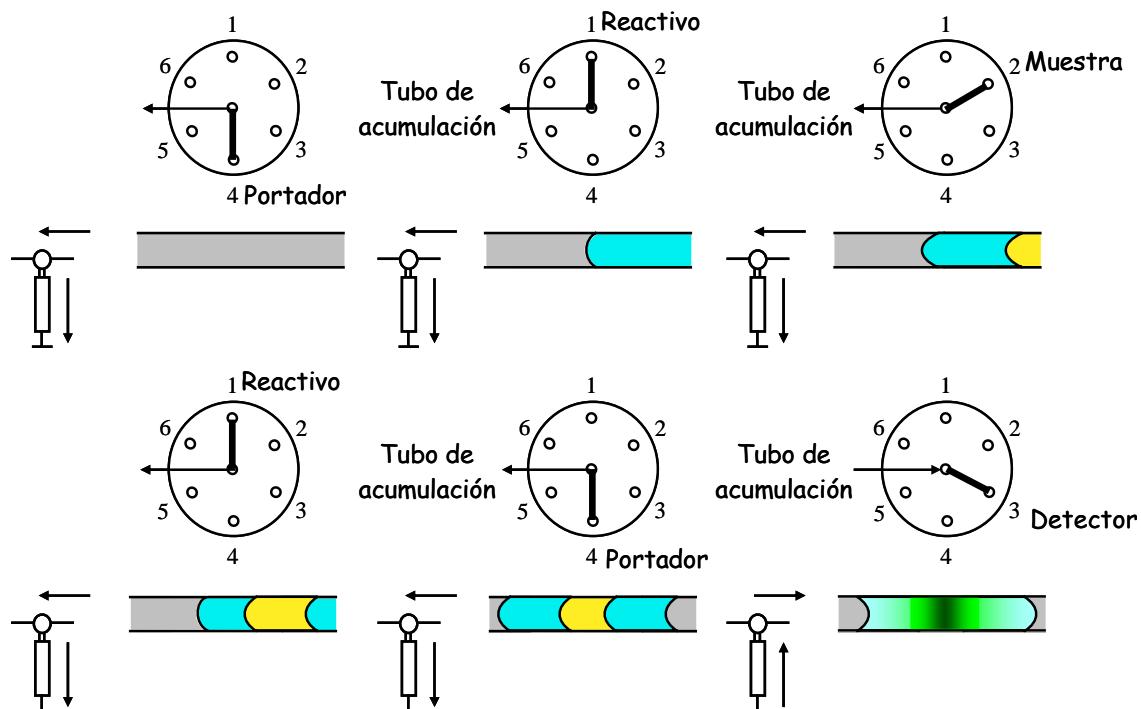


Figura 5.2 Esquema de la secuencia de acumulación e inyección de reactivo y muestra.

La comunicación entre los elementos principales del sistema, microbureta y válvula de selección, es digital en serie utilizando un bus RS-485, para el que se utiliza un conversor RS-485/RS-232 (modelo 1207, EASI Technologies S.A.), por necesidades de comunicación con el ordenador de gestión.

Las características físicas de los elementos que integran el sistema general SIA aparecen a continuación.

- *Microbureta:* XP 3000 Modular Digital Pump, CAVRO. El cabezal de ésta es exteriormente de PTFE e interiormente de Kel-F. La jeringa es de vidrio Pyrex y el cabezal del émbolo de Kel-F. La microbureta tiene un volumen de 2500  $\mu$ l, correspondientes a 3000 pasos.
- *Válvula selectora 1-6:* Modelo XL Series Smart Valve (SV), CAVRO, con las conducciones internas en PTFE.
- *Tubo de acumulación/reacción:* tubos de PTFE de Tecator de diversos diámetros internos y longitudes función de las diferentes condiciones experimentales. También se han utilizado tubos de teflón-PTFE y micro-line de polietileno ultrapuro de Tecny-Fluor, S.L.
- *Tubos de entrada/salida para la válvula de selección:* tubo de teflón-PTFE de Tecny Fluor, S.L de diámetro interno 0,97 mm y diámetro externo 1,57 mm, longitud variable en función de las condiciones experimentales. Tubo de PTFE de Tecator de diámetro interno 0,5/0,7 mm y diámetro externo 1,6 mm.
- *Detector:* espectrofotómetro de haz simple 4049 LKB Novaspec Biochrom.
- *Celda de flujo del colorímetro:* Hellma modelo 178.711 de 1cm de camino óptico y volumen interno 8  $\mu$ l.
- *Ordenador compatible 386 a 40 MHz*
- *Placa de adquisición de datos:* modelo ADDA-14 (Onda Radio S.A). La placa dispone de 16 entradas analógicas con 14 bits de resolución y 1 salida analógica con 14 bits de resolución. La conversión analógica-digital dispone de dos rangos de funcionamiento (de -8,5V a +8,5V y de 0 a +8,5V).

### **5.2.2 Programa de gestión de análisis por SIA**

#### **Objetivos**

El objetivo principal ha sido desarrollar un programa robusto y versátil que permita la automatización, basada en la metodología de flujo SIA de cualquier metodica sencilla.

## Características

El programa ha sido realizado en lenguaje C por las ventajas que este aporta. Permite trabajar a bajo nivel mediante la generación de códigos fuente de pequeño tamaño. No obstante presenta la desventaja de una pobre detección de errores de programación. El programa está realizado con subrutinas que permiten desde la comunicación con los distintos elementos del sistema (figura 5.1) hasta la adquisición de datos. El esquema general del programa con los módulos que lo componen se muestra en la figura 5.3.

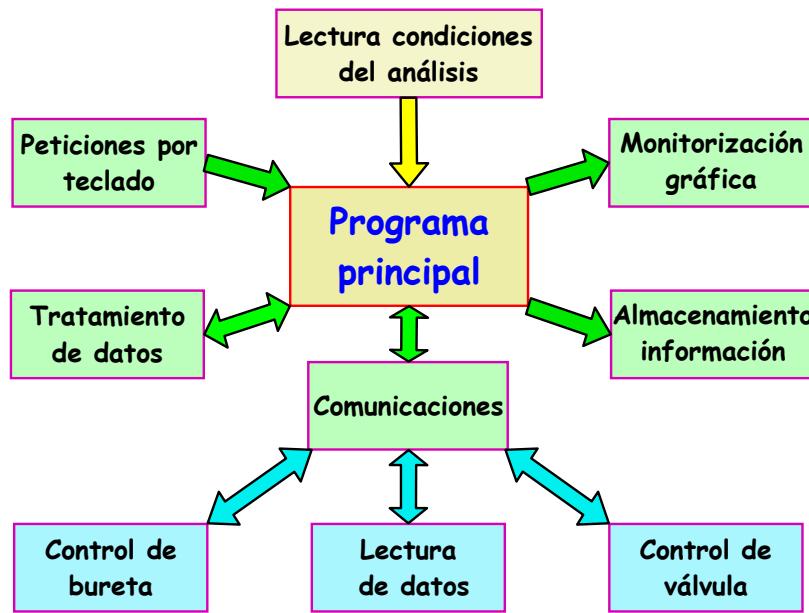


Figura 5.3 Módulos que componen el programa de gestión en SIA.

Cada módulo representado en la figura 5.3 tiene su utilidad y sus características concretas que serán comentadas brevemente a continuación. El programa completo se muestra en el apéndice 9.2.

- **Lectura condiciones del análisis.** Subrutina en la que se definen previamente los canales de operación para la válvula de selección y el volumen que será medido por cada uno de éstos, con el objetivo de obtener las diferentes configuraciones de reactivo y muestra necesarias para las distintas determinaciones.
- **Peticiones por teclado.** Se han tenido en cuenta las posibles necesidades de actuación sobre el sistema para realizar otras funciones complementarias al análisis principal como son ciclos de lavado, cambios de escala del pico obtenido por pantalla, entre otros. En la figura 5.4 se muestra el esquema de tratamiento de las peticiones por teclado. Para cada una de las peticiones se han programado funciones específicas.

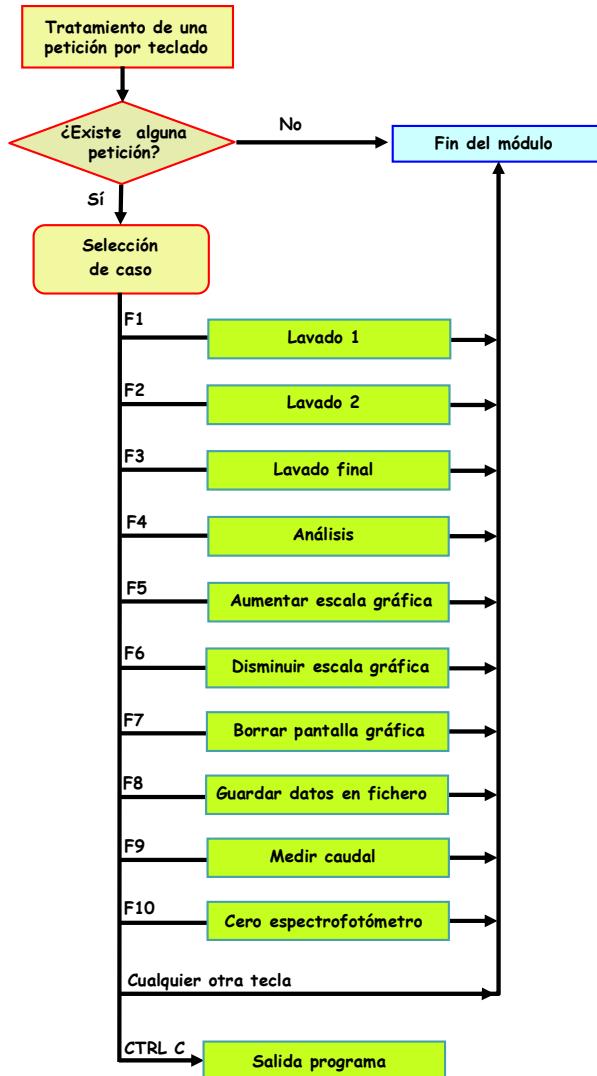


Figura 5.4 Tratamiento de peticiones en el programa de gestión.

- **Monitorización gráfica.** Se ha desarrollado todo un conjunto de funciones gráficas en C para DOS que permite efectuar el seguimiento de la respuesta obtenida. Se han desarrollado funciones para dibujar el pico y realizar cambios de escala por pantalla para adecuar ésta a la magnitud de la señal obtenida. La subrutina que dibuja el pico calcula además el máximo de éste (altura máxima) que es la señal analítica en la técnica SIA (§ 1.4.1).
- **Tratamiento de datos.** Se ha desarrollado una función que permite el tratamiento numérico de los datos registrados para disminuir el ruido de la señal medida. Se ha programado un filtro digital, BOXCAR [Binkley y Dassy, 1979] o de media móvil de siete datos. Se aplica una ventana móvil de siete puntos a los valores de absorbancia almacenados que definen el pico. Esta función se ejecuta dentro de la subrutina que permite el cambio de escala por pantalla.

- **Almacenamiento de información.** Se ha desarrollado un sistema de generación de ficheros de datos automática en función del día y la hora. Cada pico de absorbancia puede ser guardado en memoria mediante una petición por teclado.
- **Comunicaciones.** Se han desarrollado todas las comunicaciones necesarias para la operación del sistema de gestión de fluidos. Estas comunicaciones permiten el control de la bureta y la válvula de selección así como la lectura de los datos a través de una placa de adquisición analógica/digital. La comunicación entre bureta o válvula de selección con el ordenador se realiza con una función que envía una orden desde el programa y espera una respuesta. Este tipo de tratamiento es necesario para trabajar en tiempo real y que el sistema funcione sin bloquearse. La subrutina permite esta conmutación a enviar y escuchar y además establece unos límites de lecturas para evitar el bloqueo si no existe comunicación.
  - **Control bureta.** Se ha desarrollado una función que permite el control de la microbureta. La subrutina permite la comunicación con la microbureta y la lectura de la respuesta de ésta como medida de control. El programa no permite ninguna actuación hasta que se completa una ejecución y la microbureta contesta que está libre.
  - **Control válvula.** La comunicación con la válvula es más complicada porque además de leer la respuesta se han establecido unas subrutinas específicas que la evalúan para que no existan bloqueos. Además se ha integrado una función que determina la posición de la válvula antes de realizar una orden. De esta manera se asegura su correcto funcionamiento y permite el seguimiento por pantalla de la secuencia de cada análisis.
  - **Lectura de datos.** Se ha desarrollado una subrutina que permite la comunicación con la placa de adquisición de datos realizando las lecturas de potencial obtenidas del colorímetro y su conversión posterior a medidas de absorbancia. La conversión se realiza mediante una recta de calibración presente en la subrutina de adquisición, desde donde ha sido ejecutada previamente la subrutina de conversión A/D.

Finalmente en la figura 5.5, se muestra el diagrama de flujo general del programa (*software*) desarrollado.

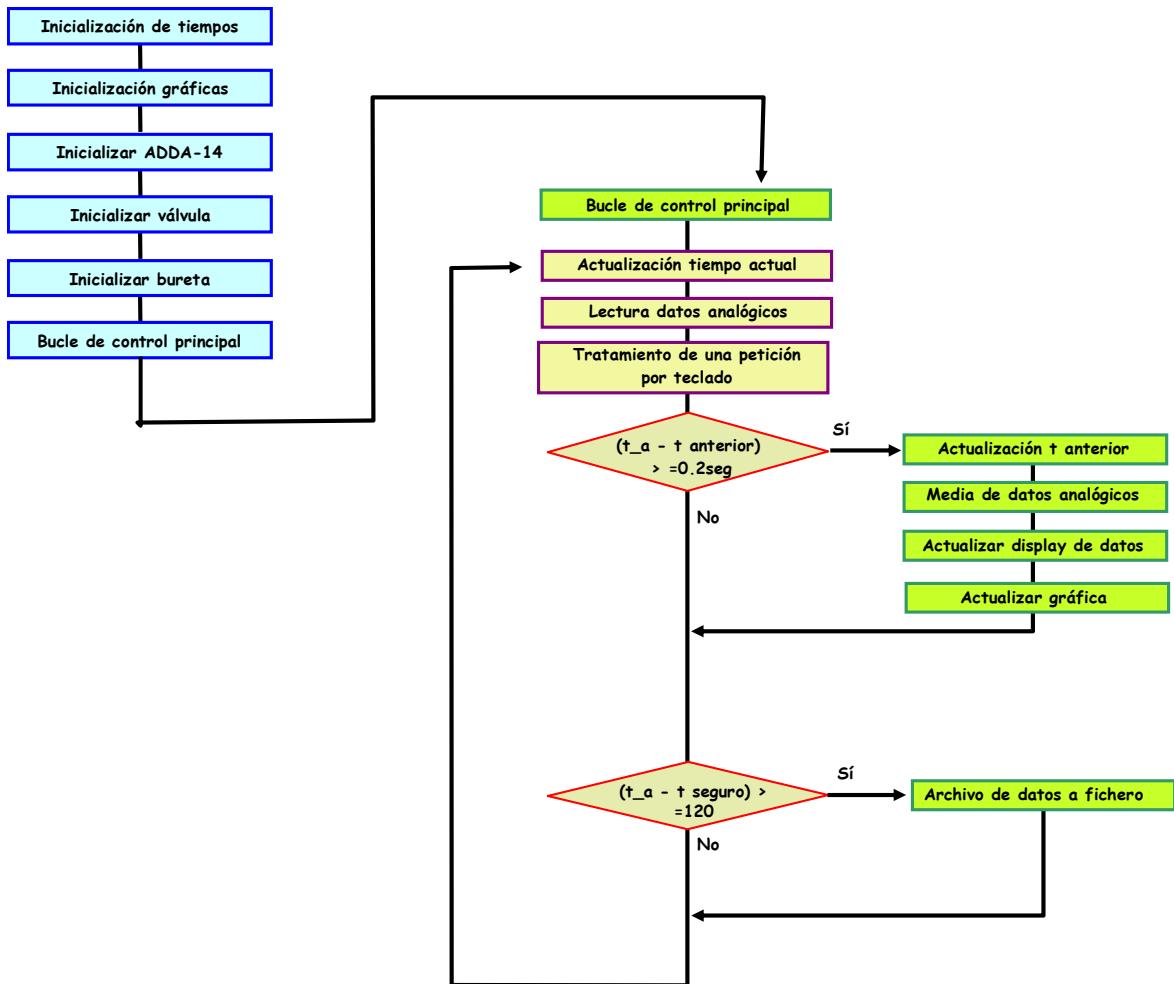


Figura 5.5 Diagrama general del programa.

### 5.3 Estudio de la respuesta sin reacción química

#### 5.3.1 Estudios previos

Se ha realizado un estudio preliminar para estimar la exactitud y precisión de la microbureta utilizada como dispositivo de medida y movimiento de líquidos en el sistema SIA. El objetivo de estas pruebas es determinar el volumen mínimo dispensado/aspirado por la bureta y comprobar si la velocidad de operación de la microbureta influye en el volumen dispensado/aspirado. Ha sido necesario conocer el volumen operativo mínimo porque se pretende trabajar con volúmenes muy pequeños.

### *5.3.1.1 Precisión y exactitud*

Se han determinado la precisión y exactitud de la microbureta para verificar si se cumplen las especificaciones comerciales y establecer si el volumen mínimo real aspirado/impulsado es repetitivo. Se ha realizado el estudio de la variación del error estándar relativo en función del volumen para obtener esta información. Respecto a la exactitud, se ha encontrado que es  $\leq 0,05\%$  lo que para una jeringa de 2500  $\mu\text{l}$  y 3000 pasos supone una diferencia entre medidas de  $\pm 1,25 \mu\text{l}$ . La precisión es  $<1\%$  lo que supone para las características anteriores un volumen mínimo del orden de 25  $\mu\text{l}$ .

### **Precisión**

Para estimar la resolución de la microbureta se ha utilizado el sistema SIA descrito en la figura 5.1. En las experiencias se ha usado un tubo de acumulación de longitud 80 cm y diámetro interno de 1,5 mm. Respecto a la longitud del tubo de reacción, es de 80 cm y tiene un diámetro interno de 0,7 mm. Como trazador de trabajo se ha utilizado una disolución de rojo de fenol en medio básico que absorbe a 550 nm y se ha preparado como se especifica en el § 3.2.1.

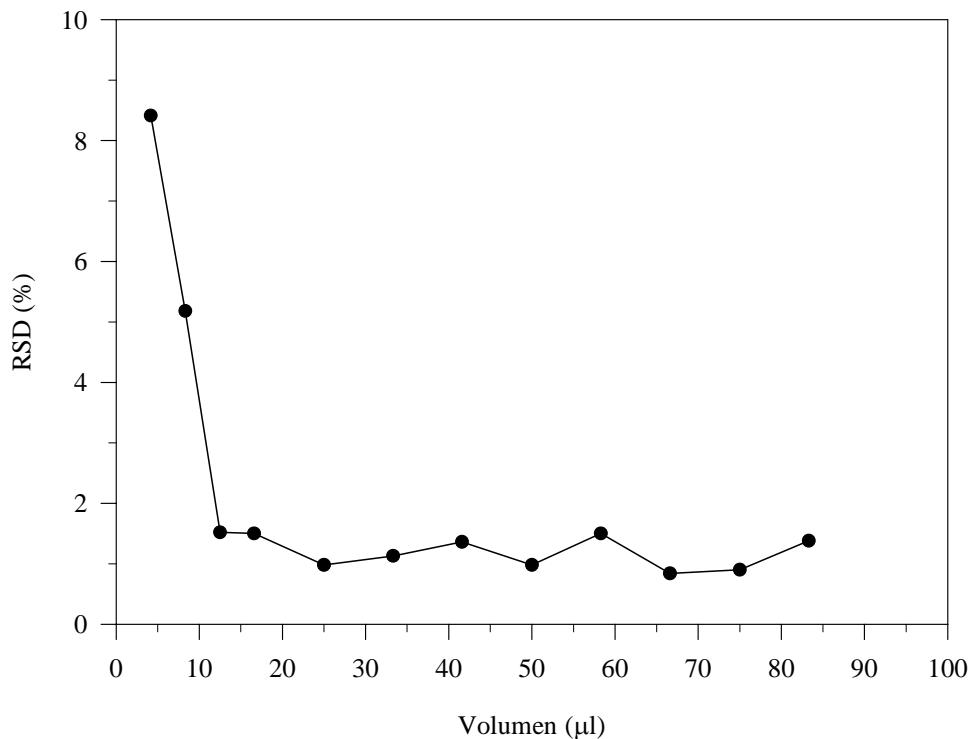
Se han realizado 20 inyecciones consecutivas de cada uno de los volúmenes comprobados desde 4,16  $\mu\text{l}$  hasta 83,3  $\mu\text{l}$ , correspondientes a 5 y 100 pasos de microbureta respectivamente. Para realizar estas inyecciones de colorante se aspira el número de pasos asociados a cada volumen, se llevan al tubo de acumulación y después se impulsan hacia el detector por otro canal utilizando como portador agua destilada. La velocidad de movimiento del émbolo (20) equivale a un caudal de 4,40 ml/min. La secuencia de funcionamiento de la válvula de selección ha sido descrita en la figura 5.2.

La figura 5.6 es una representación del error estándar relativo, calculado como  $\text{RSD} (\%) = (s_{n-1}/\text{media}) \cdot 100$ , en función del volumen medido e injectado después. Se puede observar que la repetitividad es aceptable para un sistema instrumental porque para la mayoría de volúmenes es menor del 1,5%. Se ha comprobado que el volumen mínimo que resulta repetitivo es el correspondiente a 15 pasos de microbureta es decir 12,5  $\mu\text{l}$  y que tiene un error asociado de 1,52%. Por tanto este será el volumen mínimo que se utilizará en el trabajo experimental.

### **Exactitud**

Para determinar la exactitud del valor del volumen utilizado se han realizado valoraciones de un volumen dispensado determinado, obtenidas como suma de una serie de aspiraciones de volúmenes menores. La solución aspirada es una disolución de trishidroximetilamino-

metano (Tris) 0,1 M y el agente valorante HCl 0,0125 M previamente estandarizado. Se ha utilizado el mismo sistema experimental (figura 5.1) y las mismas condiciones experimentales.



**Figura 5.6** Estudio de la repetitividad.

Se ha comprobado la exactitud para los dos primeros volúmenes que tienen RSD menor: 12,5  $\mu$ l y 16,6  $\mu$ l. El procedimiento ha consistido en realizar 200 medidas de 12,5  $\mu$ l para obtener un volumen final de 2500  $\mu$ l. Se ha realizado 10 veces y se ha valorado después cada una de las alícuotas obtenidas. Para el volumen de 16,6  $\mu$ l se ha procedido igual pero el número de medidas realizadas ha sido 150 para obtener un volumen de 2490  $\mu$ l. Como estos volúmenes son muy pequeños se han diluido siempre en 25 ml de agua destilada.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 5.1. Se ha calculado, estadísticamente, el error correspondiente a cada volumen como el intervalo de confianza con un nivel de significación del 95%, y el error estándar relativo asociado. Se comprueba que, si se considera el error asociado a la determinación la exactitud es mayor de 1,25  $\mu$ l (valor nominal), de acuerdo con el error asociado al volumen determinado experimentalmente.

**Tabla 5.1** Estudio de la exactitud, n=10. Cada una de ellas correspondientes a 200 y 150 aspiraciones de volúmenes variables en función del caudal.

| Número de pasos | Volumen ( $\mu$ l) $\pm$ I <sub>n-1</sub> 95% | RSD (%) |
|-----------------|---|---------|
| 15              | 12,11 $\pm$ 0,03                              | 0,34    |
| 20              | 16,22 $\pm$ 0,04                              | 0,31    |

### 5.3.1.2 Estudio de la influencia del caudal en el volumen aspirado

Después de comprobar la precisión y repetitividad de la microbureta del sistema SIA, se ha realizado un último estudio para determinar si la velocidad de movimiento del émbolo afecta al volumen medido. Se ha procedido igual que antes realizando una serie de valoraciones de volúmenes aspirados a diferentes caudales.

Se ha trabajado con los volúmenes correspondientes a 15 y 20 pasos de microbureta es decir, 12,5 y 16,6  $\mu\text{l}$ . Se han realizado 5 valoraciones en cada caso de un volumen total de 2500 y 2490  $\mu\text{l}$ . A cada una de estas alícuotas de tris 0,1 M se le ha añadido 25 ml de agua destilada y se ha valorado con HCl 0,0125 M. Las condiciones experimentales han sido las anteriores (§ 5.3.1.1) y los caudales han sido 4,40 ml/min y 1,78 ml/min determinados previamente. En la tabla 5.2 se muestran los resultados obtenidos en función de caudal y del volumen medido. Los errores han sido calculados como antes con  $I_{n-1}^{95\%}$  y el error estándar relativo con RSD (%). Los resultados obtenidos confirman de nuevo la repetitividad de la microbureta.

**Tabla 5.2** Estudio de la influencia del caudal, n=5.

| Caudal (ml/min) | Número de pasos | Volumen ( $\mu\text{l}$ ) $\pm I_{n-1}^{95\%}$ | RSD (%) |
|-----------------|-----------------|--|---------|
| 1,78            | 15              | 12,20 $\pm$ 0,05                               | 0,30    |
| 4,40            | 15              | 12,207 $\pm$ 0,014                             | 0,09    |
| 1,78            | 20              | 16,23 $\pm$ 0,06                               | 0,30    |
| 4,40            | 20              | 16,33 $\pm$ 0,13                               | 0,79    |

Se ha aplicado un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos factores sin replicados) a los volúmenes calculados (tabla 5.3). El resultado obtenido es que no existen diferencias significativas entre volúmenes medidos a diferente caudal porque que  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tabulada}}$ . Pero si existen diferencias entre volúmenes  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tabulada}}$ .

**Tabla 5.3** Estudio de la diferencias entre caudales, caudal 1 de 4,40ml/min y caudal 2 de 1,78 ml/min.

| Nº pasos | Caudal 1           | Caudal 2         | ANOVA de 2 factores   |
|----------|--------------------|------------------|---|
| 15       | 12,207 $\pm$ 0,014 | 12,20 $\pm$ 0,05 | entre columnas existen diferencias<br>$F_{\text{cal}} = 7685,4 < F_{\text{tab}} = 161,45$ |
| 20       | 16,33 $\pm$ 0,13   | 16,23 $\pm$ 0,06 | entre filas no existen diferencias<br>$F_{\text{cal}} = 1,324 < F_{\text{tab}} = 161,45$  |

### 5.3.2 Estudio de la respuesta sin reacción química

El objetivo del trabajo ha sido establecer las condiciones de operación que permiten la identificación de dos interfas en contacto sin reacción química. Utilizando un volumen mínimo y una secuencia colorante/agua/colorante.

Las variables estudiadas que definen el sistema son: caudal, longitud y diámetro de los tubos de acumulación y reacción. Así como la relación de volúmenes de colorante y agua. Las características físicas del tubo de acumulación definen el volumen máximo que es posible aspirar y el grado de dispersión alcanzado en el sistema. Por otro lado, cabe esperar que en función de los valores seleccionados puedan aparecer problemas de sobrepresión en el sistema. Las características del tubo de reacción son importantes porque la dispersión también es función de su longitud y diámetro. Respecto a la secuencia de colorante y agua, su optimización, permitirá la separación e identificación de las interfas en la secuencia acumulada.

El método seguido para la optimización de las condiciones experimentales ha sido basado en una variación sucesiva, de las variables físicas que definen el sistema, y un estudio posterior de las distintas relaciones de colorante y agua.

En la introducción (§ 1.4.1) se ha explicado, de modo general, el funcionamiento de un sistema SIA y el funcionamiento de la válvula de selección, en el § 5.2.1. La secuencia de funcionamiento de la parte química del programa es la misma en todas las experiencias (figura 5.2). La única diferencia está en los canales por los que se aspiran las distintas soluciones y, en cada caso, la relación de volúmenes de colorante y agua acumulados. De una manera general, las tres partes principales de la secuencia de trabajo son: un ciclo de lavado para ambientar todos los canales con las diferentes soluciones, después se realiza el ciclo correspondiente a la secuencia de acumulación de colorante y agua, y su posterior envío hacia el detector a través del tubo de reacción. Para terminar, se realiza un nuevo ciclo de lavado que limpia todos los canales y los deja preparados para el siguiente ensayo.

- **Ciclo de lavado.** Este ciclo está constituido por los etapas siguientes:

1. cambio caudal a 1,78 ml /min
2. válvula posición 4, carga 180  $\mu$ l de colorante
3. válvula posición 6, expulsa 180  $\mu$ l de colorante  
*\* secuencia 2,3 repetida 3 veces*
4. bureta carga 2500  $\mu$ l de agua por la izquierda
5. válvula a posición 3
6. bureta empuja el agua hacia el detector

- **Ciclo de acumulación.** La secuencia es la siguiente:
  1. cambio del caudal de trabajo 1,78 ml /min o 0,5 ml/min
  2. válvula a posición 4
  3. aspiración del 1<sup>er</sup> volumen de colorante
  4. válvula a posición 2
  5. aspiración del volumen de agua
  6. válvula a posición 4
  7. aspiración del 2º volumen de colorante
  8. válvula a posición 5
  9. aspiración de un volumen de agua (para evitar contaminación entre canales)
  10. válvula a posición 3
  11. la bureta carga 2500 µl de agua por la izquierda y empuja por la derecha toda la secuencia acumulada hacia el detector (entonces comienza a actuar la parte gráfica del programa)
- **Ciclo de lavado final.** Este ciclo final permite el vaciado y limpieza de todos los canales con agua y de este modo los deja preparados hasta otro periodo de funcionamiento.
  1. cambio del caudal de trabajo a 4,40 ml /min
  2. bureta carga 2500 µl por la derecha
  3. válvula a posición 1
  4. bureta descarga por canal 1  
*\* secuencia 2,3,4 repetida dos veces*
  5. bureta carga 2500 µl por la derecha
  6. válvula a posición 2
  7. bureta descarga por canal 2  
*\* secuencia 5,6,7 repetida dos veces*
  8. bureta carga 2500 µl por la derecha
  9. válvula a posición 3
  10. bureta descarga por canal 3  
*\* secuencia 8,9,10 repetida dos veces*
  11. bureta carga 2500 µl por la derecha
  12. válvula a posición 4
  13. bureta descarga por canal 4  
*\* secuencia 11,12,13 repetida dos veces*
  14. bureta carga 2500 µl por la derecha
  15. válvula a posición 5
  16. bureta descarga por canal 5

**\* secuencia 14,15,16 repetida dos veces**17. bureta carga 2500  $\mu$ l por la derecha

18. válvula a posición 6

19. bureta descarga por canal 6

**\* secuencia 17,18,19 repetida dos veces****5.3.2.1 Estudio de la relación colorante-muestra y las condiciones de operación**

El objetivo principal de este estudio es la evaluación de la respuesta del sistema SIA, sin reacción química, en función de las condiciones de operación. Se ha estudiado el efecto de las variables físicas como caudal, diámetro y longitud del tubo de acumulación. También se ha estudiado la relación colorante/agua y, el número y tamaño de estas interfaes. El objetivo final es definir las condiciones que permitan tener dos interfaes colorante/agua separadas totalmente.

En primer lugar se ha procedido al estudio de la respuesta obtenida para un volumen de 50  $\mu$ l de colorante y relaciones variables colorante/agua. Las condiciones iniciales de operación utilizadas en el sistema SIA, figura 5.1, se muestran en la tabla 5.4.

**Tabla 5.4** Condiciones iniciales SIA sin reacción química.

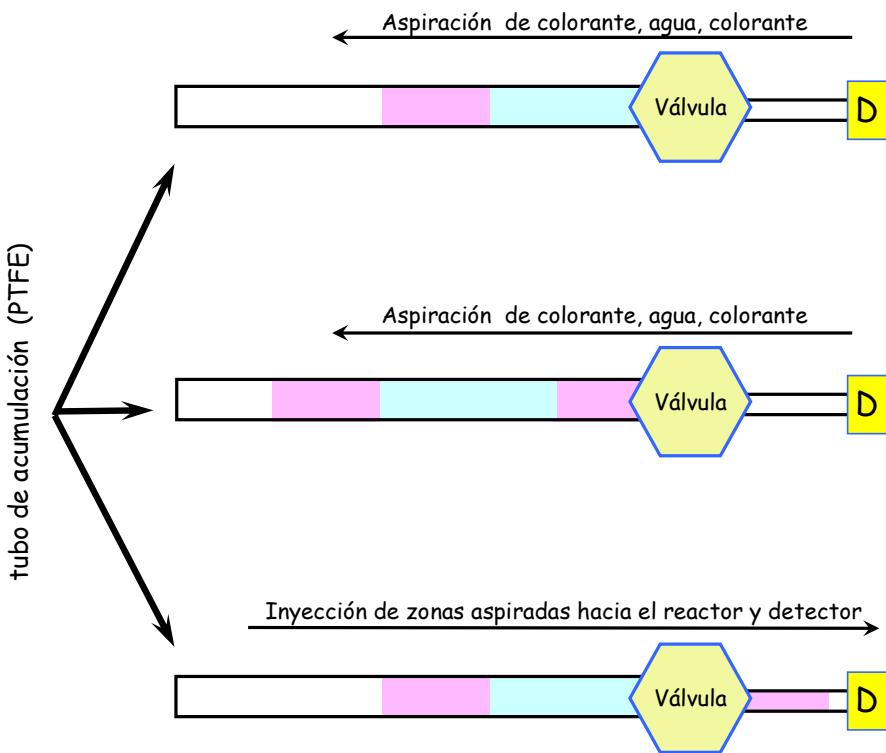
| <b>Condiciones iniciales del sistema SIA</b> |             |
|--|-------------|
| Caudal                                       | 1,78 ml/min |
| Longitud tubo de acumulación                 | 153 cm      |
| Diámetro interno tubo de acumulación         | 0,8 mm      |
| Volumen tubo de acumulación                  | 0,503 ml    |
| Longitud tubo de reacción                    | 31,5 cm     |
| Diámetro interno tubo de reacción            | 0,7 mm      |

El colorante utilizado es una disolución de rojo de fenol en medio básico que absorbe a 550 nm (§ 3.2.1). Se han ensayado las relaciones de colorante y agua que aparecen en la tabla 5.5. La experiencia con cada una de estas relaciones se ha repetido 5 veces. En la misma tabla se muestra la media los valores obtenidos y el intervalo de confianza, expresado como  $I_{n-1}^{95\%}$ . Se han probado dos relaciones distintas y se ha ensayado de dos modos distintos, con agua y sin agua al final del ciclo.

**Tabla 5.5** Resultados de las primeras pruebas, #adiciones de agua como portador.

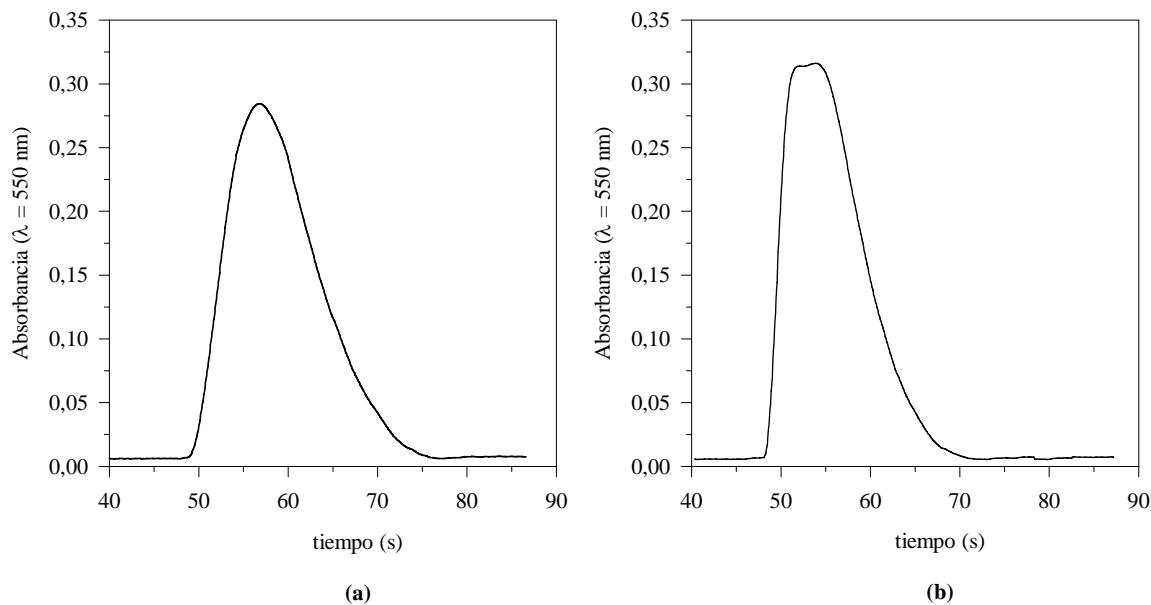
| <b>Relación colorante/agua/colorante</b> | <b>Absorbancia <math>\pm I_{n-1}^{95\%}</math></b> |
|--|--|
| 50/100/50/100 (agua) #                   | 0,279 $\pm$ 0,007                                  |
| 50/100/50                                | 0,320 $\pm$ 0,006                                  |
| 50/250/50/100 (agua) #                   | 0,214 $\pm$ 0,008                                  |
| 50/250/50                                | 0,301 $\pm$ 0,006                                  |

En la figura 5.7, se muestra un esquema de la secuencia de aspiración y acumulación de los volúmenes estudiados de colorante y agua, en el tubo de acumulación. La microbureta, cuando aspira, ejerce un flujo en sentido inverso y cuando impulsa lo hace en sentido directo (§ 1.4.1). En el esquema, el detector está situado a la derecha y la microbureta a la izquierda del tubo de acumulación.



**Figura 5.7** Secuencia de aspiración de colorante y agua.

Se ha comprobado que la adición de agua al final de una secuencia provoca un mayor grado de dispersión. Esta fracción de agua hace la misma función que el fluido del canal portador en los sistemas de inyección en flujo (FIA) estudiados antes en el capítulo 4. En estas condiciones no se han conseguido picos diferenciados, es decir, no se ha podido discriminar entre interfases. En la primera relación se ha obtenido un sólo pico, en la segunda también pero más achatado, en la tercera secuencia un pico con bajada menos pronunciada y en el cuarto dos picos solapados. En la figura 5.8 se observa un ejemplo de las dos primeras relaciones estudiadas (tabla 5.5).



**Figura 5.8** Picos obtenidos para un mismo volumen de colorante y distintas relaciones colorante/agua:  
(a) C50/A100/C50/A100  $\mu$ l y (b) C50/A100/C50  $\mu$ l.

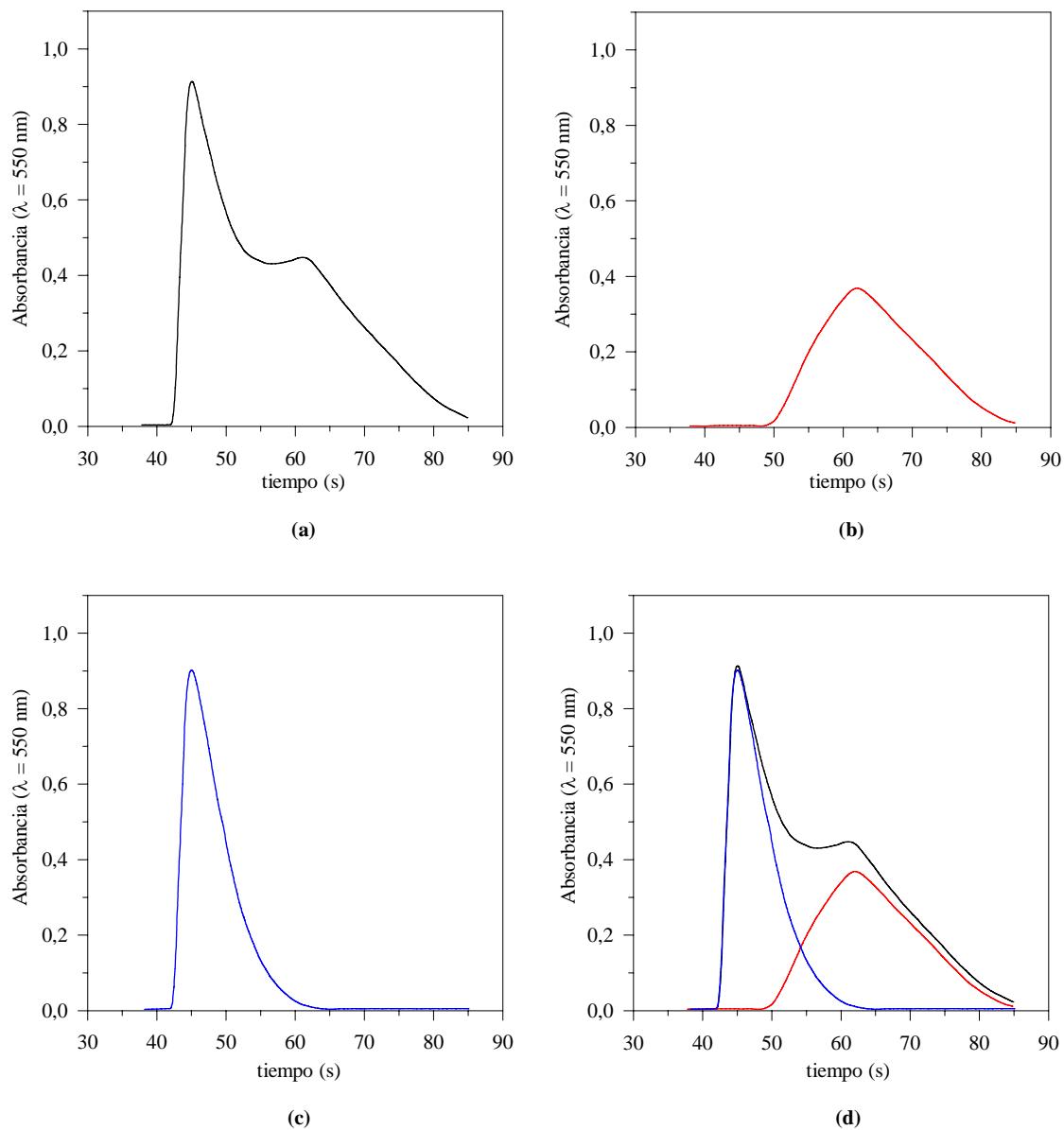
### 5.3.2.2 Optimización de la separación de interfases

#### Influencia del tubo de acumulación

El objetivo de esta experiencia es identificar la influencia del aumento de longitud y diámetro del tubo de acumulación, en la separación efectiva entre interfases. Por esta razón se probaron dos volúmenes diferentes de colorante 200 y 25  $\mu$ l, y un volumen central de agua mayor de 500  $\mu$ l. El resto de variables no fueron modificadas. En la tabla 5.6 se muestran las nuevas condiciones estudiadas.

**Tabla 5.6.** Variación de las características del tubo de acumulación.

| Segundas condiciones del sistema SIA |              |
|--------------------------------------|--------------|
| Caudal                               | 1,78 ml/min  |
| Longitud tubo de acumulación         | 410 cm       |
| Diámetro interno tubo de acumulación | 0,97 mm      |
| Volumen tubo de acumulación          | 3030 $\mu$ l |
| Longitud tubo de reacción            | 31,5 cm      |
| Diámetro interno tubo de reacción    | 0,7 mm       |



**Figura 5.9** Respuesta obtenida para  $Q=1,78\text{ml/min}$  y las relaciones: (a)  $\text{C25/A500/C25/A12,5 }\mu\text{l}$ , (b)  $\text{C25/A500/A25/A12,5 }\mu\text{l}$ , (c)  $\text{A25/A500/C25/A12,5 }\mu\text{l}$  y (d) superposición de repuestas.

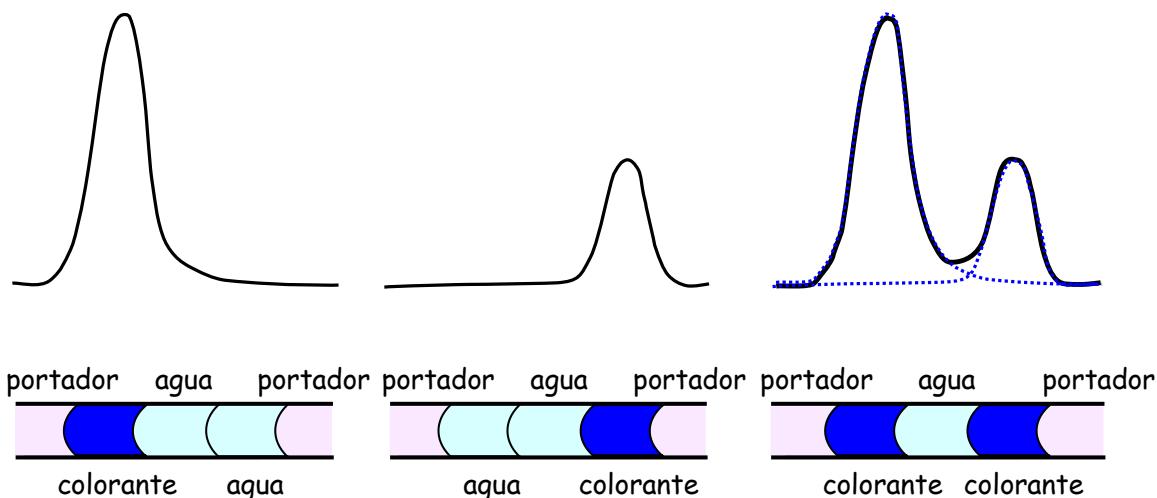
Sólo para el menor volumen de colorante (25  $\mu$ l) se ha obtenido separación entre interfases. Es decir la relación de volúmenes tiene un peso más importante en la respuesta, que la longitud del tubo de acumulación y su diámetro. El pico global obtenido para las dos interfases todavía no está lo suficientemente separado. Aunque tiene dos partes diferenciadas (figura 5.9 (a)). Un estudio particular de cada una de estas interfases ha permitido asociar éstas con cada una de las partes del pico total (figura 5.9 (b) (c) (d)). La relación de volúmenes estudiada ha sido: **25C-A/500A/25C-A/12,5A**  $\mu$ l, con variaciones en el primer y tercer volumen, según se aspiró agua o colorante. Si se comparan los valores de absorbancia y los tiempos del máximo del pico se comprueba que coinciden y es posible asociarlos correctamente con el pico global (tabla 5.7). Se observa que los valores de los

máximos del pico total son un poco superiores a los parciales debido a una menor dispersión del colorante hacia el centro de la secuencia.

**Tabla 5.7** Resultados obtenidos para  $Q=1,78$  ml/min y la secuencia 25/500/25/12,5  $\mu$ l. El resto de condiciones experimentales aparecen en la tabla 5.6.

|                     | máx 1 | t máx 1 | máx 2 | t máx 2 | máx 1/máx 2 |
|---------------------|-------|---------|-------|---------|-------------|
| <b>Pico total</b>   | 0,913 | 45      | 0,470 | 61      | 1,943       |
| <b>Pico primero</b> | 0,902 | 45      | --    | --      |             |
| <b>Pico segundo</b> | --    | --      | 0,368 | 61      | 2,451       |

A título de ejemplo y para explicar los resultados obtenidos, en la figura 5.10 se muestra un esquema de la respuesta ideal en condiciones óptimas y la interfase asociada a cada pico. Se observa que la primera fracción de colorante aspirado corresponde al pico más pequeño porque es el segundo en salir y sufre mayor dispersión. Esta primera fracción penetra más en el tubo de acumulación y después recorre una distancia mayor en su envío hacia el detector. El primer pico es mayor porque corresponde al segundo volumen de colorante aspirado. En este caso, la dispersión que sufre es menor porque apenas penetra en el tubo de acumulación. Se ha de señalar que el volumen de colorante en cada fracción es idéntico. Las secuencias de aspiración e inyección se realizan en sentidos contrarios, primero son acumuladas las distintas fases de derecha a izquierda y después enviadas hacia el detector (inyectadas) de izquierda a derecha.

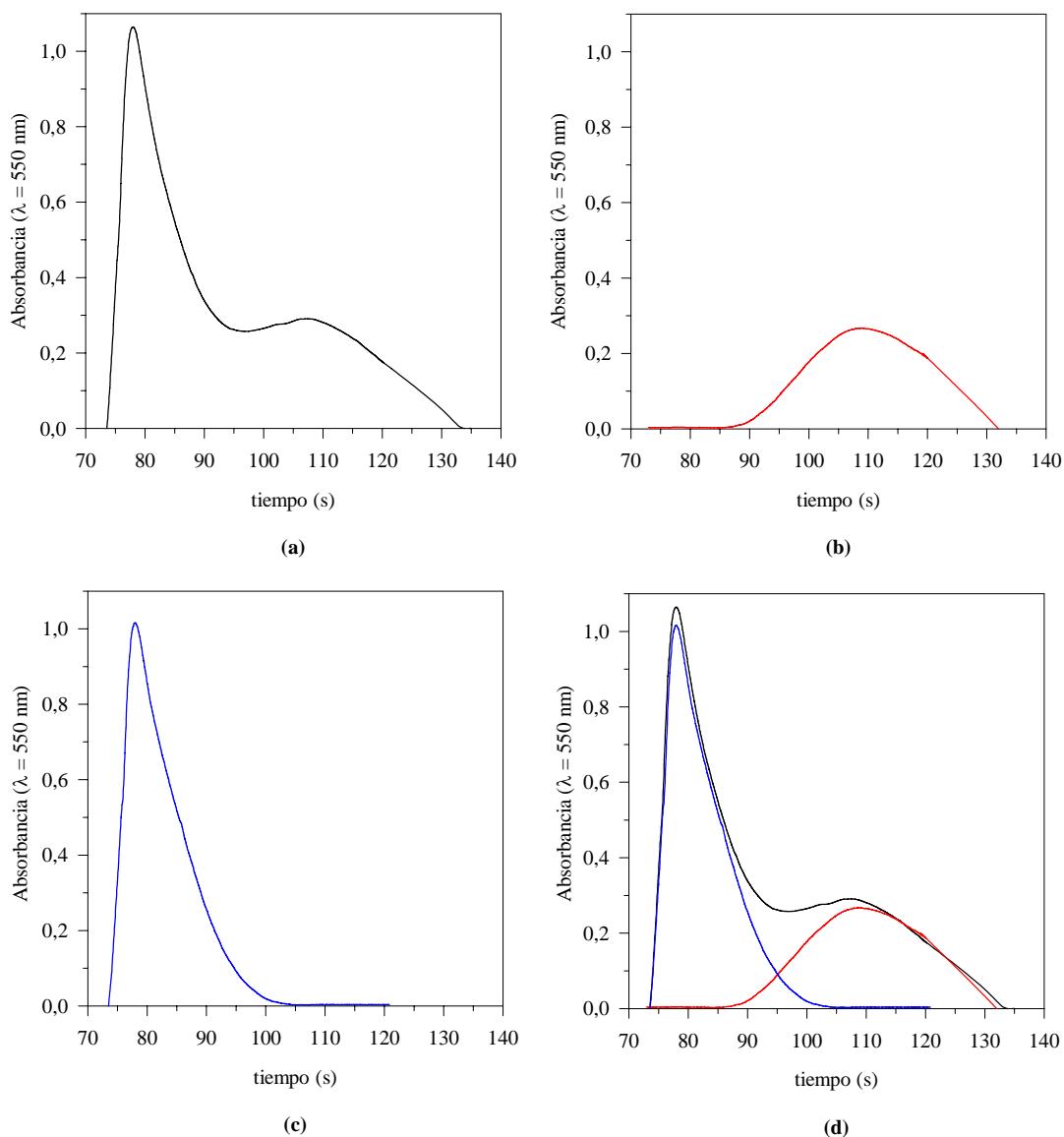


**Figura 5.10** Respuesta ideal para los picos e interfases correspondientes a la secuencia **colorante/agua/colorante/agua**. En este caso el portador también es agua y la etapa es de la inyección.

### Influencia del caudal

Se ha estudiado el efecto de la variación de caudal en la separación de las interfases. Las condiciones de operación son las mismas que figuran en la tabla 5.6 excepto el caudal que se ha disminuido a 1,02 ml/min. La relación de volúmenes es la misma que en la

experiencia anterior: 25/500/25/12,5  $\mu\text{l}$  de colorante/agua/colorante/agua. Se ha observado que una disminución del caudal provoca una aumento de dispersión en las dos fracciones de colorante, obteniéndose picos más achatados. Este hecho, es más pronunciado en el primer volumen de colorante aspirado que corresponde al segundo pico. A este caudal se consigue mayor separación entre picos porque disminuye la mezcla entre las interfases. En la figura 5.11 se pueden observar los resultados obtenidos.



**Figura 5.11** Respuesta obtenida para  $Q=1,02 \text{ ml/min}$  y las relaciones: (a) C25/A500/C25/A12,5  $\mu\text{l}$ , (b) C25/A500/A25/A12,5  $\mu\text{l}$ , (c) A25/A500/C25/A12,5  $\mu\text{l}$  y (d) superposición de respuestas.

Se ha obtenido más separación entre interfases respecto al caudal superior, pero ésta no es total. Se puede observar que la dispersión ha aumentado para el segundo pico, primer volumen aspirado, pero para el primer pico es prácticamente igual. Esta diferencia es debida a que la disminución del caudal provoca un aumento del tiempo de residencia del

primer colorante aspirado. En la tabla 5.8 se muestran los valores de absorbancia obtenidos y los tiempos de salida de los picos. Es posible asociar los picos individuales en el global mediante comparación del tiempo del máximo.

**Tabla 5.8** Resultados obtenidos para  $Q=1,02$  ml/min y la secuencia 25/500/25/12,5  $\mu\text{l}$ . El resto de condiciones experimentales aparecen en la tabla 5.6.

|                     | <b>máx 1</b> | <b>t máx 1</b> | <b>máx 2</b> | <b>t máx 2</b> | <b>máx 1/máx 2</b> |
|---------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------------|
| <b>Pico total</b>   | 1,064        | 78             | 0,291        | 108            | 3,656              |
| <b>Pico primero</b> | 1,016        | 78             | --           | --             |                    |
| <b>Pico segundo</b> | --           | --             | 0,265        | 111            | 3,834              |

A pesar del volumen de agua de separación (500  $\mu\text{l}$ ) y de la disminución del caudal no se ha obtenido una separación completa de las dos interfases por este motivo se disminuye el diámetro del tubo de acumulación.

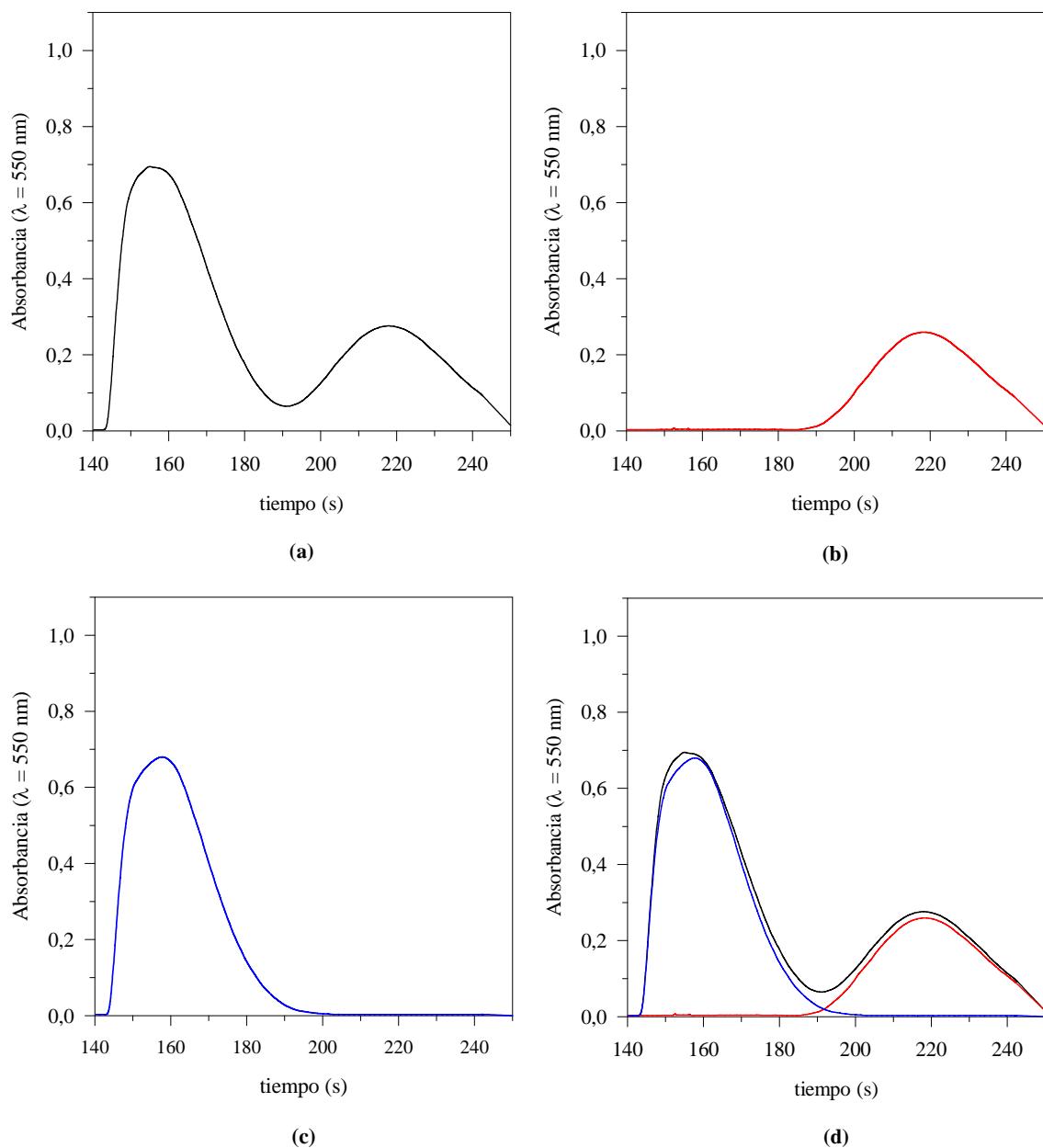
### **Disminución del diámetro del tubo de acumulación**

Con el objetivo de aumentar más la separación entre interfases se ha disminuido el diámetro anterior de 0,97 mm a 0,5 mm. También se ha modificado el diámetro del tubo de reacción, pero se han mantenido las longitudes de ambos. En estas condiciones y un caudal de 1,78 ml/min aparecen sobre presiones en el sistema; la bureta no ejercía la presión suficiente para desplazar los líquidos. Por este motivo se decidió disminuir el caudal a 0,5 ml/min y reducir la longitud del tubo de acumulación a la mínima, que permitiera acumular los volúmenes necesarios. Al realizar este cambio fue necesario modificar la velocidad de adquisición de datos para poder sincronizar la salida del pico con su registro. En la tabla 5.9 aparecen las condiciones experimentales utilizadas a partir de este momento en todas las experiencias.

**Tabla 5.9** Condiciones óptimas. Variación simultánea del tubo de acumulación y el caudal.

| <b>Condiciones finales SIA</b>       |  |                   |
|--------------------------------------|--|-------------------|
| Caudal                               |  | 0,5 ml/min        |
| Longitud tubo de acumulación         |  | 310 cm            |
| Diámetro interno tubo de acumulación |  | 0,5 mm            |
| Volumen tubo de acumulación          |  | 609 $\mu\text{l}$ |
| Longitud tubo de reacción            |  | 36 cm             |
| Diámetro interno tubo de reacción    |  | 0,5 mm            |

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.12. La relación de volúmenes de colorante y agua es la misma que en los subapartados anteriores. Se puede observar en los picos la correspondencia de cada pico parcial (b) y (c) con el total (a), así como en (d) la combinación de todos.



**Figura 5.12** Respuesta obtenida a  $Q=0,5$  ml/min y las relaciones: (a) C25/A500/C25/A12,5  $\mu$ l, (b) C25/A500/A25/A12,5  $\mu$ l, (c) A25/A500/C25/A12,5  $\mu$ l y (d) superposición de picos.

En la tabla 5.10 aparecen los valores de absorbancia obtenidos para cada uno de los máximos. Se observa que la medida de absorbancia relativa al primer pico es menor que en los caudales anteriores, ya que en estas condiciones la dispersión ha aumentado. Aunque su valor sigue coincidiendo entre el pico global y el primer pico sólo.

**Tabla 5.10** Resultados obtenidos en condiciones óptimas, para la secuencia 25/500/25/12,5  $\mu$ l, a un  $Q=0,5$  ml/min y con un tubo de acumulación de diámetro 0,5 mm. El resto de condiciones aparecen en la tabla 5.9.

|                     | máx 1 | t máx 1 | máx 2 | t máx 2 | máx 1/máx 2 |
|---------------------|-------|---------|-------|---------|-------------|
| <b>Pico total</b>   | 0,695 | 148     | 0,280 | 174     | 2,482       |
| <b>Pico primero</b> | 0,680 | 148     | --    | --      |             |
| <b>Pico segundo</b> | --    | --      | 0,259 | 174     | 2,625       |

Se comprueba que la absorbancia en el segundo pico es prácticamente igual que en el pico global lo que indica que la separación entre fases ha aumentado y la dispersión del colorante hacia la parte central ha disminuido. Esto se comprueba si se comparan las diferencias de máximos obtenidas en el pico global respecto a las individuales en cada caso (tablas 5.7, 5.8 y 5.10). Se observa que la diferencia es mínima para las últimas condiciones ensayadas, mostradas en la tabla 5.9. Es decir la dispersión individual de cada interfase ha aumentado, ya que los máximos de absorbancia han disminuido. Pero se ha conseguido que la dispersión del colorante hacia el centro disminuya, ya que ha aumentando la separación entre las interfases. Las experiencias realizadas han permitido visualizar la influencia de las diferentes variables del sistema de flujo sobre la interpenetración de zonas. Esta información servirá de base para el desarrollo de sistemas con reacción química.

Los parámetros que influyen en la separación efectiva de interfases son simultáneamente volumen de agua entre fases, caudal y diámetro del tubo de acumulación. Es necesario un compromiso entre los tres para asegurar la separación completa entre interfases. Ésta se asegura con volúmenes pequeños de colorante respecto a los de agua y, caudales y diámetros pequeños.

#### 5.4 Determinación de ion nitrito

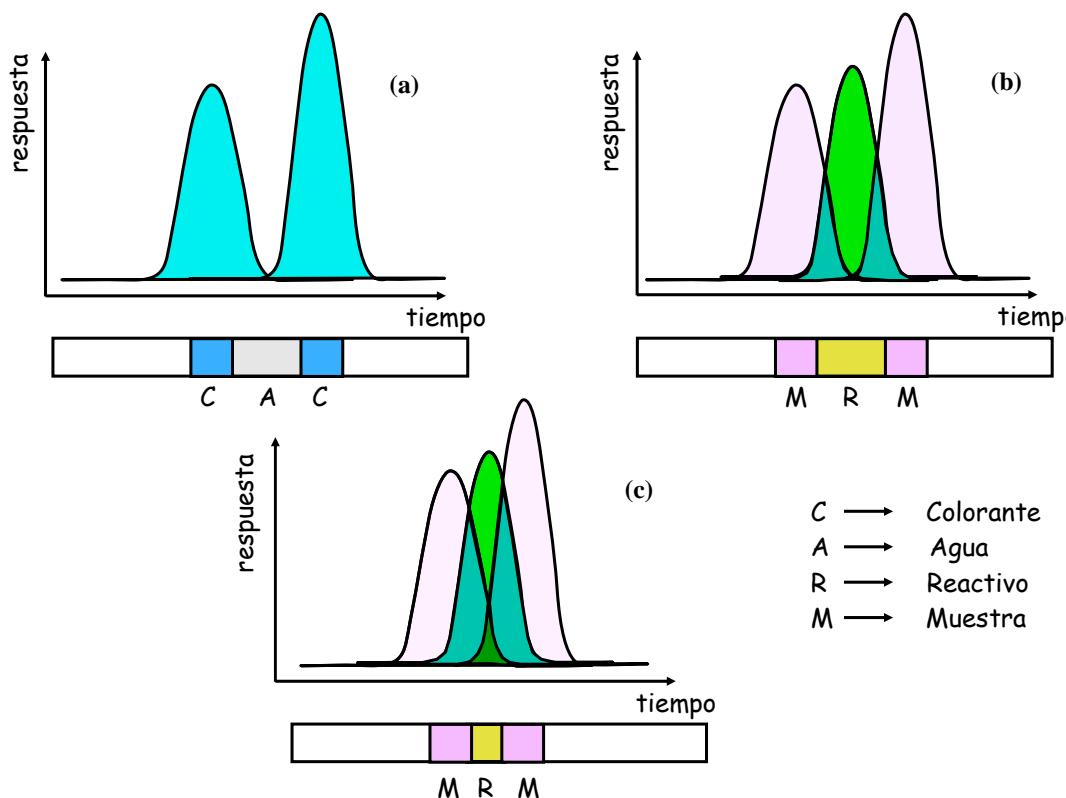
El objetivo principal de este estudio es la validación de toda la infraestructura desarrollada, tomando como reacción modelo la utilizada en la determinación de ion nitrito. Esta reacción también fue empleada (ver capítulo 4) en el estudio del sistema FIA con microbureta.

Se ha procedido al desarrollo e implementación de un sistema para la determinación de ion nitrito basado en la técnica SIA. Las condiciones de operación utilizadas en todo el experimental desarrollado a continuación, son las optimizadas en el apartado 5.3, y recogidas en la tabla 5.9. El programa de gestión utilizado es el mismo que en el estudio sin reacción química. Únicamente se han variado las condiciones relativas a la parte química del proceso, en concreto, la relación de volúmenes de reactivo y muestra así como el orden de aspiración de éstos.

En sistemas con reacción química, las señales correspondientes a cada interfase difieren significativamente de las obtenidas en el § 5.3.2. No obstante, la información obtenida para sistemas sin reacción suministrará ya un punto de partida válido para iniciar el estudio.

La secuencia general de inserción de las soluciones mimetizará la del sistema r-FIA implementado en el capítulo 4. La introducción de la zona de reactivo entre dos zonas de

muestra generará dos interfaces muestra/reactivo. El patrón de mezcla de cada una de ellas va a diferir en función del proceso de dispersión que sufra.



**Figura 5.13** (a) Respuesta obtenida en sistemas sin reacción química, (b) respuesta en sistemas con reacción química y volumen grande de reactivo y, (c) respuesta en sistemas con reacción química y volumen pequeño de reactivo.

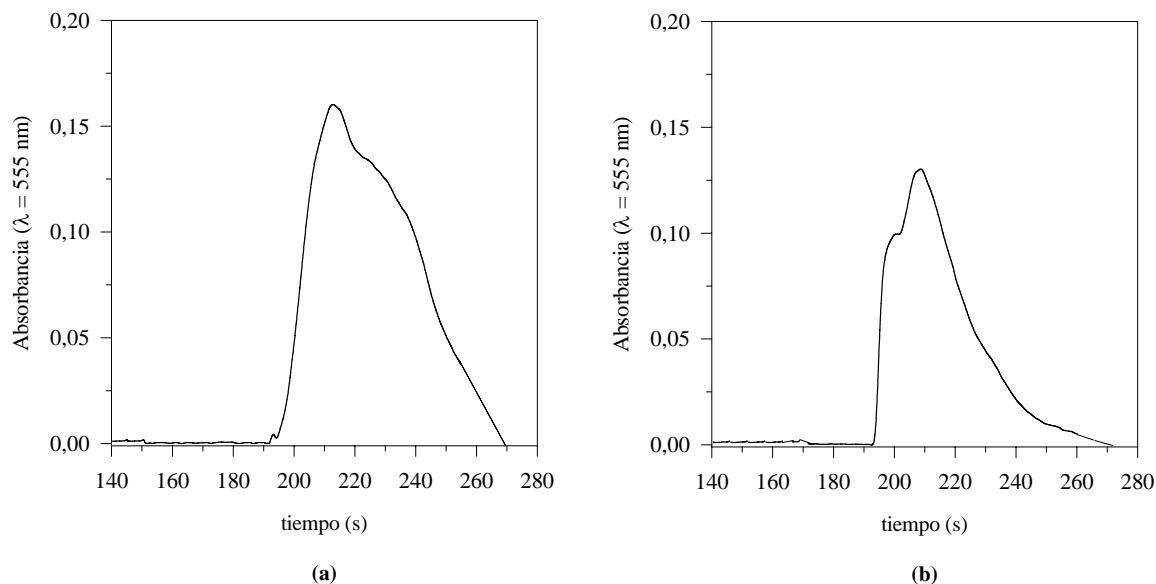
En vista de las condiciones en las cuales no se produce solapamiento de señal (figura 5.13 (a)) en sistemas sin reacción, se puede concluir que si se pretende obtener un único pico, es necesario reducir el volumen de reactivo (figura 5.13 (b)). En sistemas con reacción química, y seguimiento del producto de la reacción, la aparición de éste último sólo tendrá lugar en las zonas de interfase muestra-reactivo. La reducción del volumen de reactivo (figura 5.13 (c)) facilitará la interpenetración de las dos interfaces donde tiene lugar la reacción y por tanto la obtención de un único pico. Con este objetivo se han estudiado diferentes relaciones de volúmenes muestra/reactivo/muestra tomando como frontera superior las fijadas para el sistema sin reacción.

#### 5.4.1 Caracterización de interfaces en la secuencia muestra/reactivo/muestra

Para realizar las distintas pruebas se ha utilizado una disolución de ion nitrito de 0,2 ppm. Se ha seleccionado por ser un patrón de concentración intermedia. A continuación se muestran los resultados preliminares obtenidos.

Se ha comenzado verificando la respuesta para la relación optimizada para sistemas sin reacción química es decir, la relación de volúmenes de 25/500/25/12,5  $\mu$ l pero en este caso

patrón/reactivo/patrón/portador. El volumen de portador al final de la secuencia es el mismo siempre, y en este caso también es agua destilada. Con esta relación aparentemente no se ha obtenido respuesta diferenciada entre interfases. Parece ser que se produce la difusión del producto formado en el reactivo lo que provoca la obtención de un sólo pico. Cuando se disminuye el volumen de reactivo a 200  $\mu\text{l}$  y se mantienen los volúmenes de patrón también se obtiene un sólo pico aunque de menor altura. En la figura 5.14 se muestra las respuestas obtenidas.



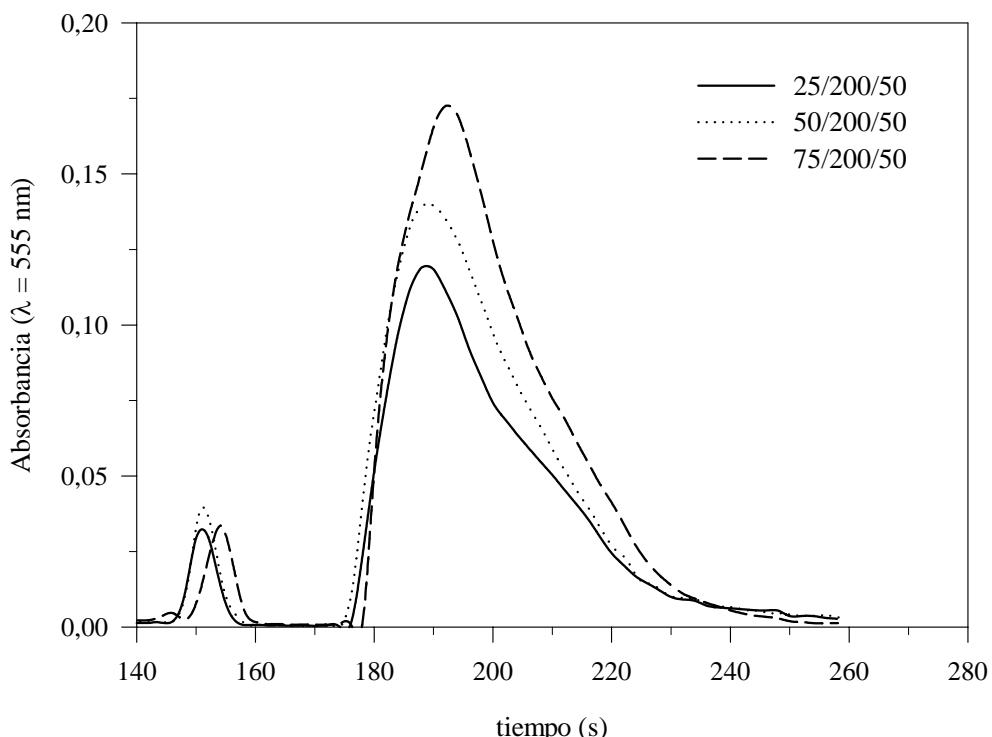
**Figura 5.14** Respuesta obtenida para las relaciones: (a) P25/R500/P25 y (b) P25/R200/P25.

Para intentar obtener más información que facilite la interpretación de estos resultados se han ensayado relaciones en distintas series en las que el volumen de muestra ha aumentado y el de reactivo se ha mantenido constante. Se han estudiado tres volúmenes de reactivo diferentes: 100, 200 y 300  $\mu\text{l}$  en las relaciones que aparecen en la tabla 5.11. Se ha ido incrementando, para cada uno de ellos, el volumen de patrón intentando conseguir mayor respuesta. El volumen de portador, agua destilada, ha sido 12,5  $\mu\text{l}$  en todos los casos. A partir de este punto se omitirá esta información que se ha mantenido invariable en todos los estudios realizados a continuación.

**Tabla 5.11** Relaciones de volumen estudiadas para la secuencia muestra/reactivo/muestra.

| Muestra ( $\mu\text{l}$ ) | Reactivo ( $\mu\text{l}$ ) | Muestra ( $\mu\text{l}$ ) |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 25                        | 200                        | 50                        |
| 50                        | 200                        | 50                        |
| 75                        | 200                        | 50                        |
| 50                        | 300                        | 50                        |
| 75                        | 300                        | 50                        |
| 50                        | 100                        | 50                        |
| 75                        | 100                        | 50                        |

En todos los casos, se han obtenido dos picos como respuesta siendo siempre de menor altura el primero de ellos. Se ha comprobado que un aumento del volumen de reactivo proporciona un ligero aumento de señal que afecta al segundo pico mientras que el primero permanece casi constante. A título de ejemplo, en la figura 5.15, se muestra la respuesta obtenida con diferentes volúmenes de patrón y un volumen fijo de 200  $\mu\text{l}$  de reactivo.



**Figura 5.15** Respuesta obtenida para un volumen de reactivo de 200  $\mu\text{l}$  y distintos volúmenes de patrón.

El ligero aumento de señal obtenido, así como, la desaparición de esta por debajo de la línea base en la zona entre los dos picos lleva a la conclusión de que existen problemas de desajuste entre los índices de refracción de las soluciones empleadas.

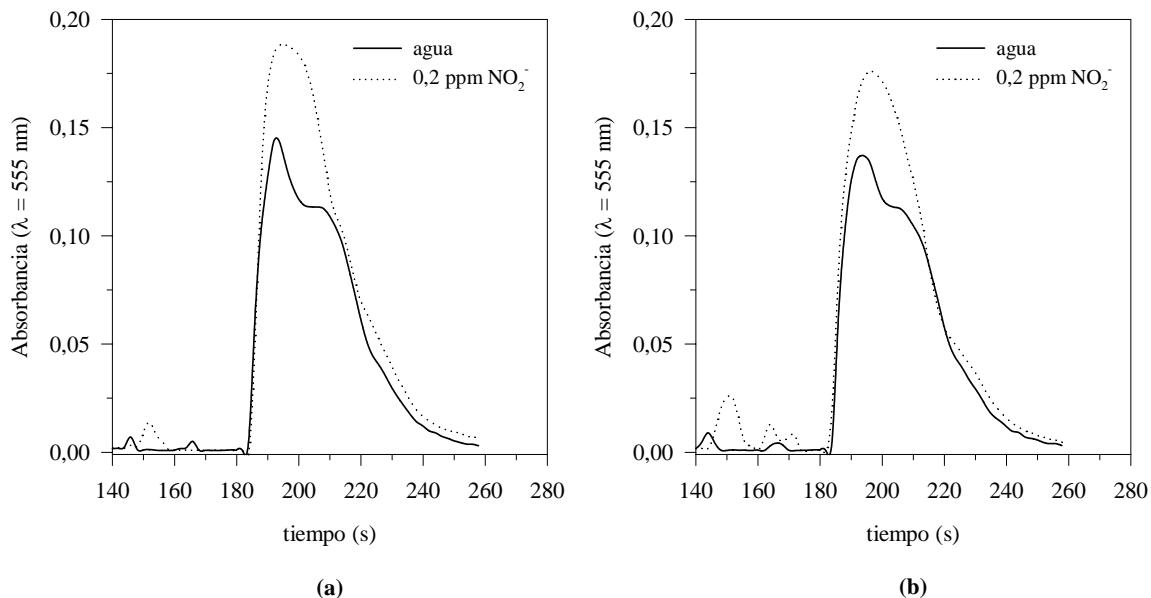
#### 5.4.1.1 Efecto del índice de refracción

Se ha estudiado del efecto del índice de refracción en la respuesta realizando una serie de ensayos con distintas relaciones de patrón y reactivo, duplicados con agua destilada en lugar de patrón. Las relaciones estudiadas aparecen en la tabla 5.12.

**Tabla 5.12** Relaciones estudiadas para verificar la influencia del índice de refracción en la respuesta.

| Muestra ( $\mu\text{l}$ ) | Reactivos ( $\mu\text{l}$ ) | Muestra ( $\mu\text{l}$ ) |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 50                        | 100                         | 50                        |
| 25                        | 200                         | 50                        |
| 75                        | 200                         | 50                        |
| 50                        | 300                         | 50                        |
| 75                        | 300                         | 50                        |

Como se comprueba en la figura 5.16 la respuesta obtenida para el agua es importante aunque menor a la obtenida para la concentración de nitritos de 0,2 ppm. Se ha observado que un aumento de volumen de muestra produce un aumento de la respuesta en ambos casos.



**Figura 5.16** Respuesta obtenida para la secuencia muestra/reactivo/muestra, con volumen de reactivo de 300  $\mu$ l, (a) Relación 50/300/50  $\mu$ l y (b) relación 75/300/50  $\mu$ l.

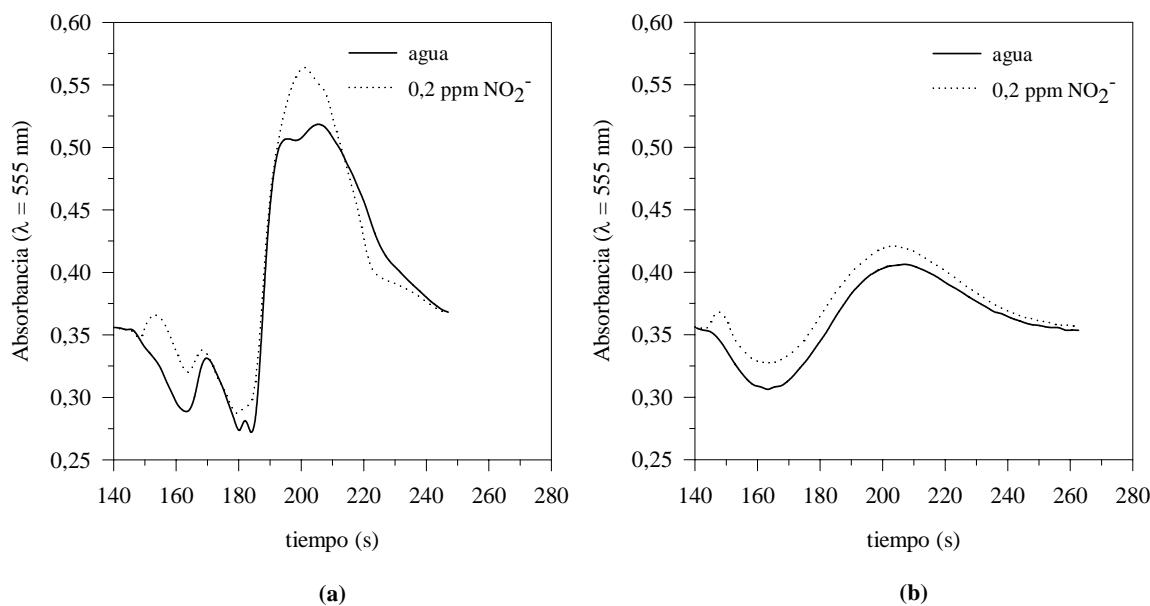
La diferencia de absorbancia entre el pico de patrón y el pico con agua está asociada con la existencia de reacción química. Este tipo de respuesta debida al efecto del índice de refracción en las medidas de absorbancia, ha sido explicado en el § 1.3.1. La respuesta obtenida para los otros volúmenes de reactivo (100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l) es similar y se ha comprobado que existe también diferencia respecto al agua.

#### 5.4.1.2 Efecto del portador en la respuesta

Para observar, en toda su extensión, el efecto del índice de refracción en la señal y dado que el sistema espectrofotométrico utilizado no permite realizar lecturas de desviaciones negativas de absorbancia, se decidió alterar el proceso de medida fijando la línea base a un valor por encima de cero (0,350 UA). De los resultados obtenidos se comprueba inmediatamente que el primer pico es debido mayoritariamente al efecto del índice de refracción y que el segundo es mayor de lo normal debido también a esta diferencia. La diferencia de índices de refracción entre las interfases, viene determinada por la composición del reactivo que contiene un 10% de ácido fosfórico, sulfanilamida y diclorhidrato de NED (§ 3.2.1).

Con estos resultados se evidencia, que el efecto del índice de refracción, es más pronunciado cuando el grado de dispersión en el sistema es menor (sistema SIA frente al r-FIA) y cuando los volúmenes de muestra son pequeños en comparación con los de reactivo. En este último caso, la dispersión de la muestra hacia el portador favorece la inexistencia de señal debida a la reacción. Cabría destacar que la diferente viscosidad entre las disoluciones patrón y reactivo parece reducir la dispersión en las interphas. Para minimizar este efecto se substituyó el agua de la solución portadora por  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10%.

En la figura 5.17 se muestra el resultado obtenido para dos experiencias realizadas con distinto portador: agua destilada y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 %. La relación de muestra y reactivo es igual en ambos casos, 50/300/50  $\mu\text{l}$ . En un caso se ha realizado la aspiración de agua y en el otro, de un patrón de ion nitrito de concentración 0,2 ppm.



**Figura 5.17** Estudio de distintos portadores en la respuesta obtenida para la secuencia muestra/reactivo/muestra de 50/300/50  $\mu\text{l}$ . (a) Agua desionizada y (b)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 %.

Comparando ambas respuestas se observa que si el portador es  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10% se obtiene una señal menos distorsionada. En estas condiciones, parece reducirse drásticamente la influencia del índice de refracción pero se mantiene la baja interpenetración de las interphas patrón-reactivo. Esto limita el desarrollo de la reacción y, hace que las diferencias entre el blanco y la muestra sean pequeñas. A la vista de los resultados y las dificultades existentes para alterar esta situación se decidió minimizar en lo posible este problema cambiando el orden de selección de las distintas soluciones. Con este objetivo se procedió a estudiar una secuencia alternativa reactivo/muestra/reactivo.

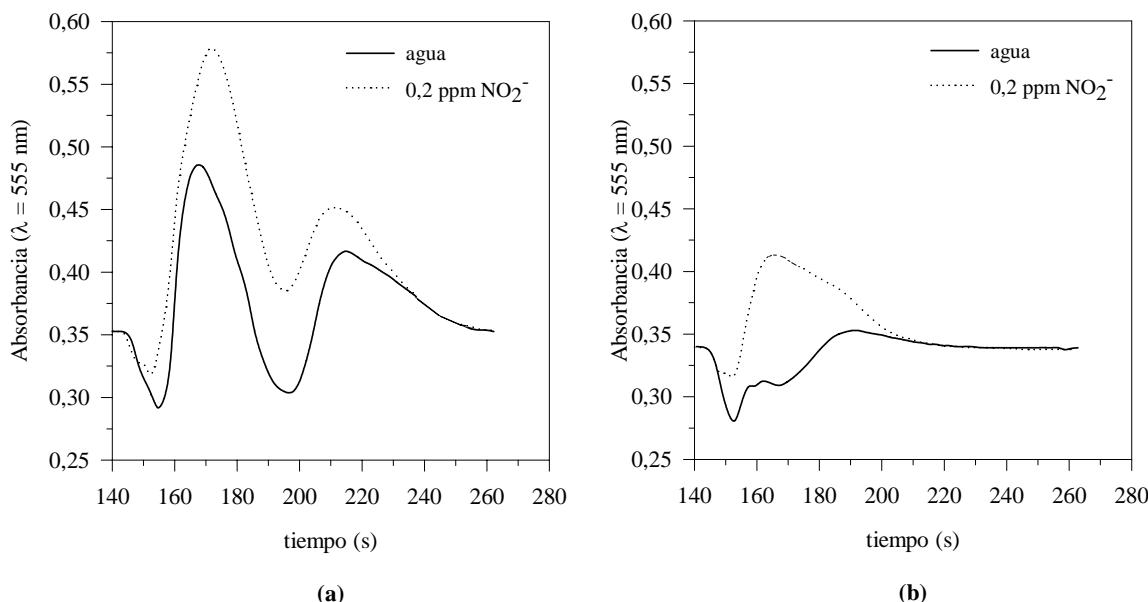
#### 5.4.2 Caracterización de interfases en la secuencia reactivo/muestra/reactivo

Se han estudiado una serie de relaciones de volúmenes diferente y se han ensayado utilizando agua destilada como portador. Las relaciones estudiadas figuran en la tabla 5.13. Se ha podido comprobar que, si se utiliza agua como portador, el efecto del índice de refracción también se produce para esta secuencia.

**Tabla 5.13** Relaciones estudiadas para la relación reactivo/muestra/reactivo.

| Reactivo (μl) | Muestra (μl) | Reactivo (μl) |
|---------------|--------------|---------------|
| 50            | 300          | 50            |
| 50            | 450          | 50            |
| 25            | 300          | 25            |
| 25            | 450          | 25            |
| 25            | 400          | 25            |
| 25            | 350          | 25            |
| 25            | 200          | 25            |
| 25            | 150          | 25            |
| 25            | 125          | 25            |
| 25            | 100          | 25            |

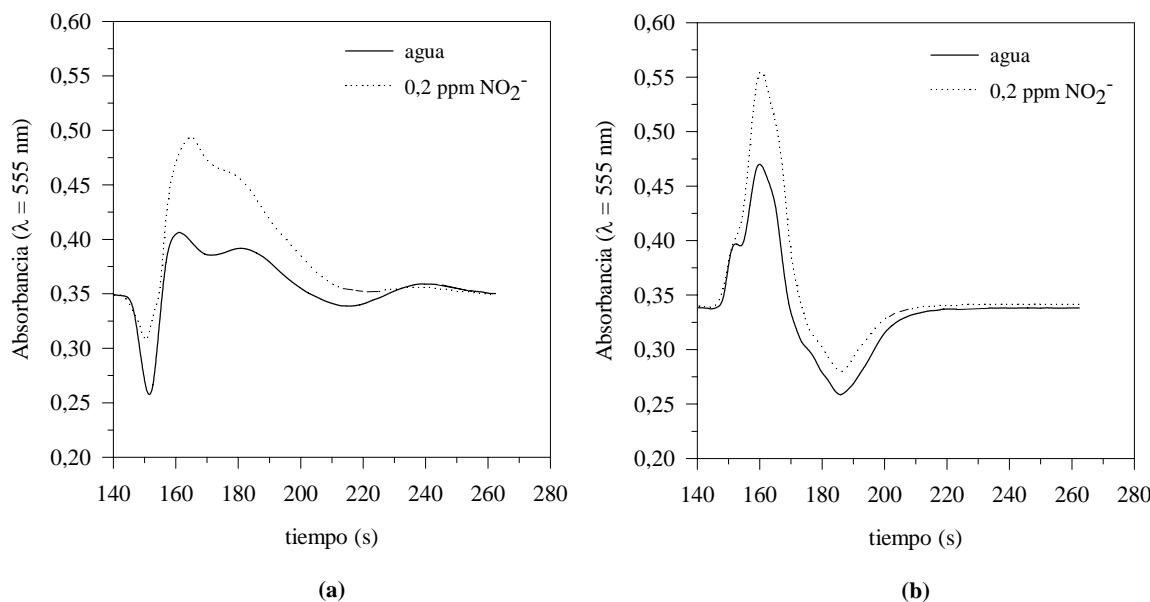
Para volúmenes de reactivo y muestra elevados se obtienen unas oscilaciones más pronunciadas que disminuyen al reducir los dos. Como ejemplo en la figura 5.18 se puede observar este fenómeno para dos relaciones diferentes, la primera de volúmenes mayores que la segunda. En todos los casos se observa la misma tendencia, al disminuir los volúmenes disminuye la respuesta pero también el efecto negativo del índice de refracción.



**Figura 5.18** Efecto del índice de refracción para la relación reactivo/muestra/reactivo: (a) 50/300/50 μl y (b) 25/150/25 μl.

### 5.4.2.1 Efecto del índice de refracción

Para minimizar este fenómeno, se ha estudiado la substitución del agua en la disolución portadora por  $H_3PO_4$  10 %, de la misma manera que se hizo para la secuencia muestra/reactivo/muestra. En este caso se ha utilizado una relación de volúmenes 25/125/25  $\mu$ l.



**Figura 5.19** Efecto del portador en la respuesta para la secuencia reactivo/muestra/reactivo en la relación 25/125/25  $\mu$ l, utilizando como portador: (a) agua desionizada y (b)  $H_3PO_4$  10 %.

En la figura 5.19 se observa la diferencia que existe al utilizar agua y ácido como portadores para esta relación de volúmenes. Como puede observarse se verifica una inversión en la configuración de la señal. Con un portador de agua, aparece en primer lugar el pico negativo mientras que con ácido el primer pico es positivo. Este hecho demuestra claramente, de acuerdo con lo señalado en el § 1.3.1, que se está ante un fenómeno de absorción parásita debida a variaciones del índice de refracción. Atendiendo a la menor complejidad de la señal obtenida utilizando el portador ácido, se decidió trabajar con él a partir de este momento. Además se observa una mayor diferencia entre la respuesta del blanco y el patrón para la secuencia reactivo/muestra/reactivo con portador ácido (figura 5.19 (b)) que para la secuencia muestra/reactivo/muestra (figura 5.17 (b)) con el mismo portador.

## 5.5. Optimización del sistema en dos intervalos de concentración

Asumida la imposibilidad de eliminar completamente este efecto, se decidió reducir más los volúmenes utilizados para minimizarlo y se procedió a establecer un sistema operativo para la determinación de ion nitrito.

Fijadas las condiciones de operación en los mismos valores recogidos en la tabla 5.9 (§ 5.3.2.2) y utilizando como disolución portadora  $H_3PO_4$  10%, se procedió a optimizar la secuencia de volúmenes reactivo/muestra/reactivo para obtener un sistema robusto, versátil y autoadaptativo para la determinación de ion nitrito en dos intervalos de concentración diferenciados. El concepto de autoadaptación se pretende alcanzar introduciendo como variable únicamente la modificación de volúmenes en la relación estudiada.

Han sido realizados cuatro calibrados para definir la relación de volúmenes óptima. Se ha utilizado concentraciones de ion nitrito desde 0-10 ppm y cada punto experimental corresponde a la media de 3 valores de absorbancia. En todos los calibrados ha sido realizado un blanco con agua y se ha efectuado la resta del blanco a todos los valores de absorbancia para tener sólo en cuenta el valor relacionado específicamente a la reacción química. De este modo se anulan los efectos indeseables de las variaciones de índice de refracción en la señal obtenida. De todas formas, esta corrección sólo se ha realizado al trazar la recta de calibrado numérica y no en la gráfica. Las cuatro relaciones estudiadas, en los distintos calibrados, se muestran en la tabla 5.14.

**Tabla 5.14** Relaciones utilizadas en la optimización de la secuencia reactivo/muestra/reactivo.

| Reactivo ( $\mu$ l) | Muestra ( $\mu$ l) | Reactivo ( $\mu$ l) |
|---------------------|--------------------|---------------------|
| 25                  | 150                | 25                  |
| 50                  | 150                | 50                  |
| 25                  | 50                 | 25                  |
| 12,5                | 25                 | 12,5                |

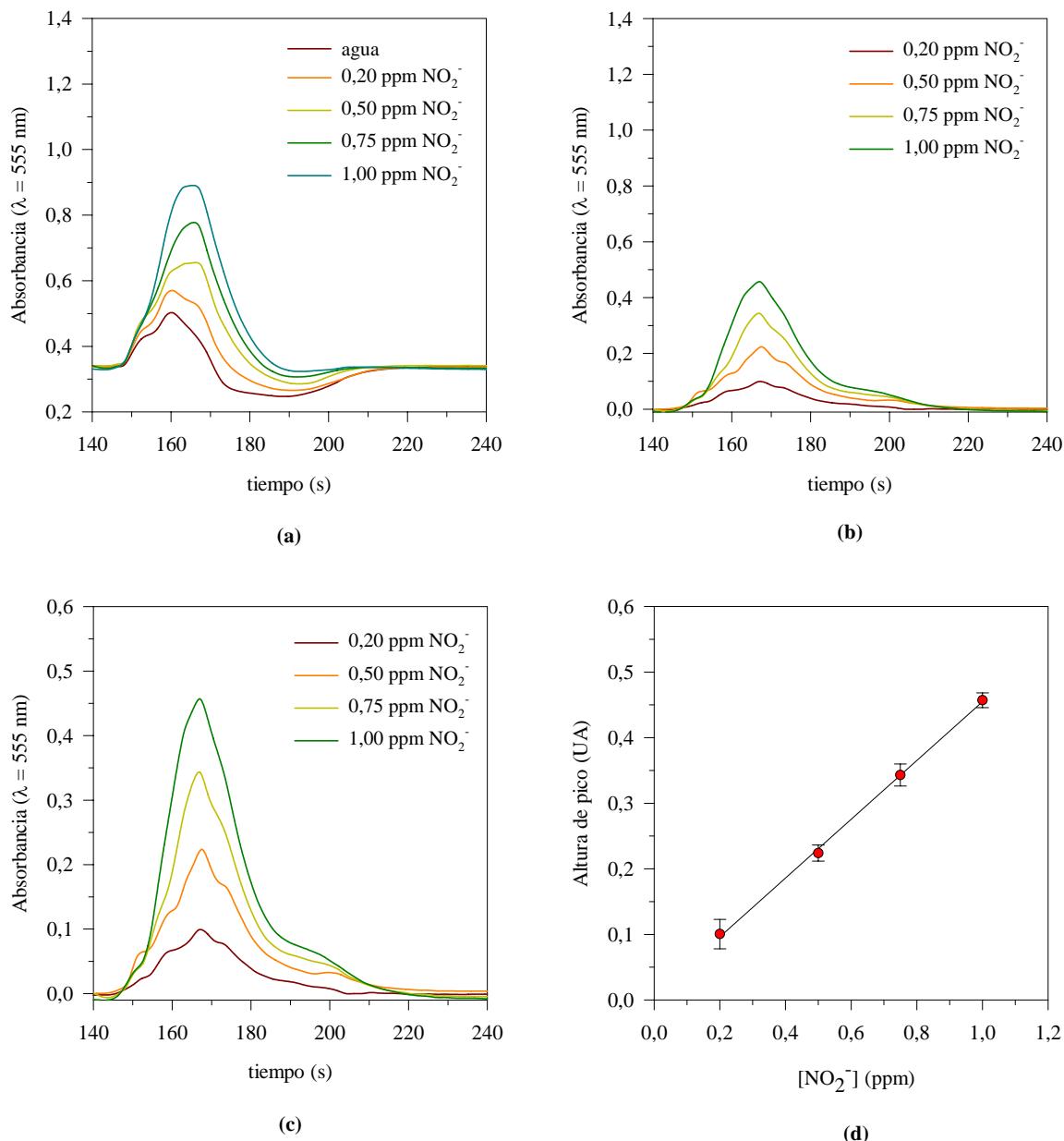
Las dos primeras relaciones se han estudiado para evaluar si, en los patrones de baja concentración, existe aumento de respuesta al aumentar el volumen de reactivo manteniendo constante el volumen de muestra. Las dos últimas se han ensayado para estudiar su utilización en la determinación de concentraciones mayores de ion nitrito, hasta 10 ppm.

### 5.5.1 Intervalo 0,0-3,0 ppm de ion nitrito

#### 5.5.1.1 Relación reactivo/muestra/reactivo 25/150/25

Se ha realizado un calibrado con la relación de volúmenes 25/150/25  $\mu$ l y se ha obtenido la respuesta de absorbancia que aparece en la figura 5.20 (a). En la figura puede comprobarse que los efectos del índice de refracción son más notorios en las concentraciones menores y en especial para el agua, mientras que, al aumentar la concentración, el efecto va perdiendo importancia debido al aumento de la absorbancia relativa a la reacción química.

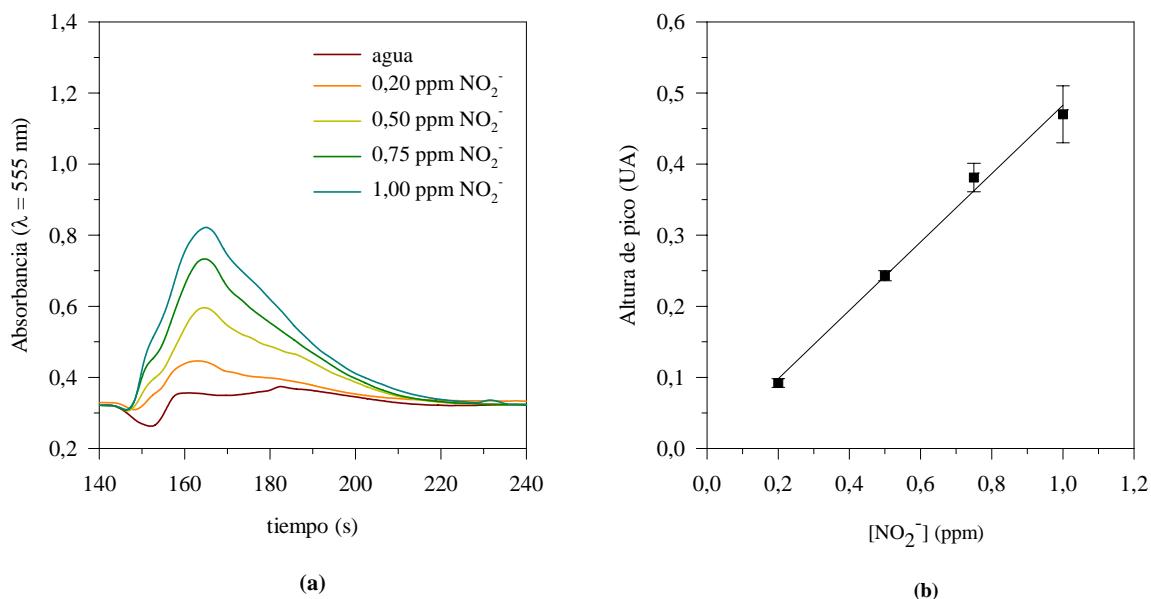
Como ya se ha comentado antes, el valor de absorbancia real para cada concentración será la diferencia entre el blanco y la absorbancia experimental relativa a cada patrón (figura 5.20 (b) y (c)). Este cálculo previo será realizado en todos los casos estudiados antes de obtener la curva de calibración correspondiente. En la figura 5.20 (d) se presenta la recta de calibración obtenida donde se comprueba la relación lineal entre absorbancia y concentración a pesar de las interferencias. Los puntos de la recta corresponden a tres replicados de cada patrón y su error viene expresado como el intervalo de confianza  $I_{n-1}^{95\%}$  con un nivel de significación del 95%. Los parámetros de calibración correspondientes se muestran en la tabla 5.15.



**Figura 5.20** (a) Respuesta obtenida para la relación 25/150/25  $\mu\text{l}$ , (b) picos obtenidos menos el blanco, (c) igual que b en la escala de la recta de calibrado y (d) recta de calibración correspondiente.

Con el objetivo de validar la utilización como disolución portadora de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10% se ha realizado, en estas condiciones, un calibrado utilizando agua como portador. Los resultados obtenidos aparecen en la figura 5.21 (a). Se observa que los picos son más distorsionados y el efecto de la diferencia de índice de refracción es más evidente para concentraciones bajas y en concreto para el agua, mientras que a concentraciones más altas éste aparece minimizado y los picos no presentan tanta distorsión.

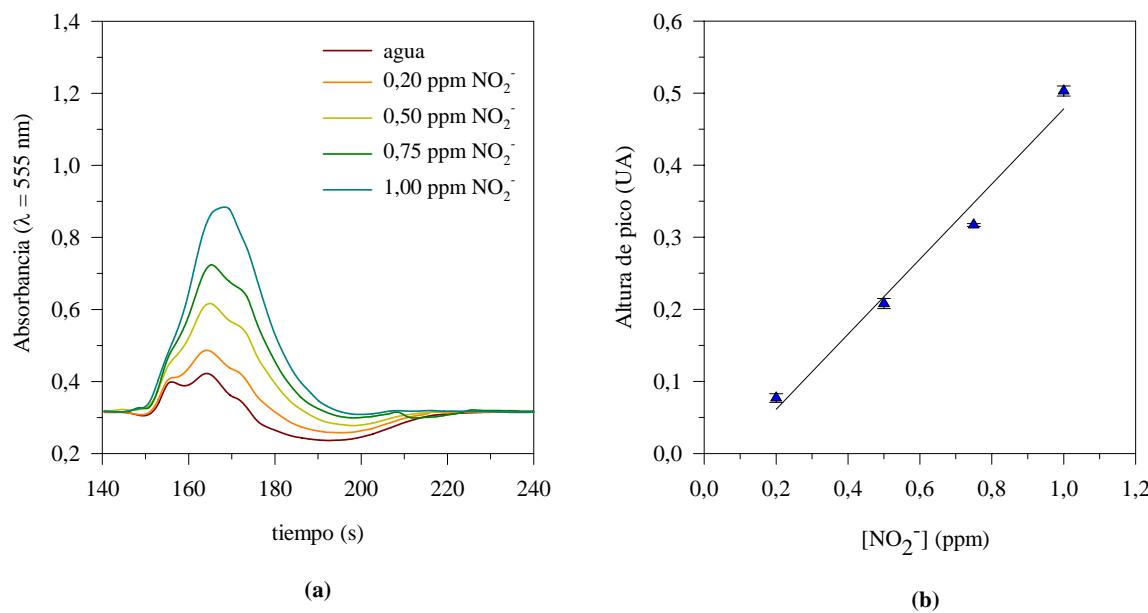
En la figura 5.21 (b) se muestra la recta de calibración correspondiente y los parámetros de ésta en la tabla 5.15. Cada punto corresponde a la media de tres replicados y el error viene determinado por  $I_{n-1}^{95\%}$ . A pesar de ser más pronunciado visualmente el efecto del índice de refracción no se obtienen resultados significativamente diferentes, aunque la correlación y la precisión son peores que cuando se utiliza  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10%.



**Figura 5.21** (a) Resultados obtenidos para la relación 25/150/25  $\mu\text{l}$  con agua como portador y (b) recta de calibrado correspondiente.

#### 5.5.1.2 Relación reactivo/muestra/reactivo 50/150/50

Esta relación ha sido estudiada con el objetivo de comprobar si un aumento del volumen de reactivo, manteniendo constante el de muestra, produce un aumento de la señal. De los resultados obtenidos, se puede concluir que el valor de absorbancia es prácticamente igual al obtenido con 25  $\mu\text{l}$  de reactivo. La respuesta para esta relación se muestra en la figura 5.22 (a). Se puede comprobar que, al aumentar el volumen de reactivo a 50  $\mu\text{l}$ , se han obtenido unos picos más distorsionados en los que se evidencia una mayor influencia del efecto del índice de refracción.



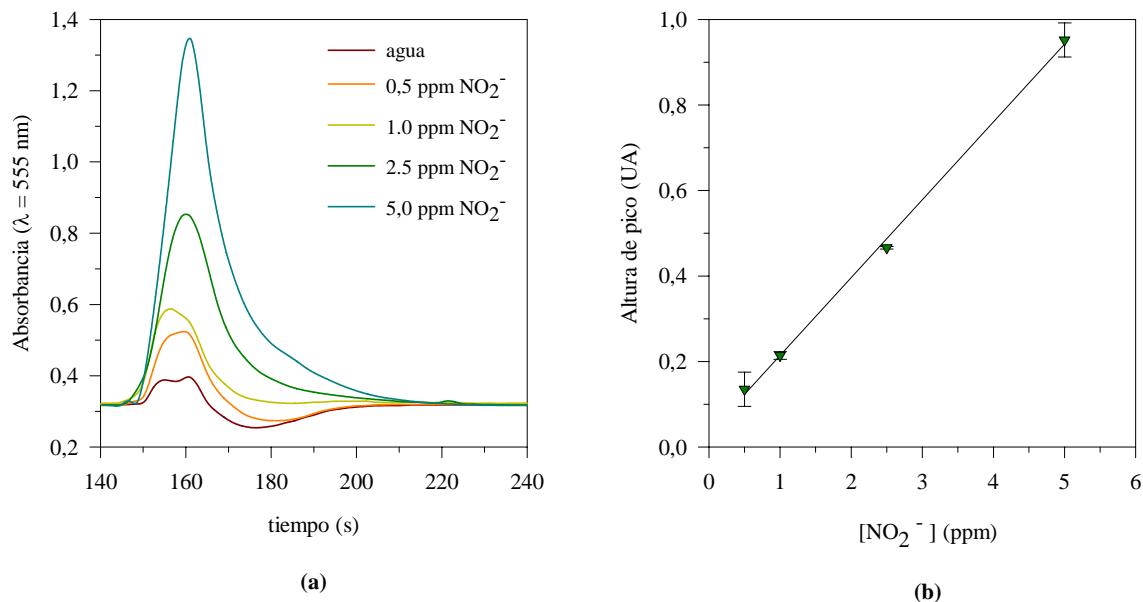
**Figura 5.22** (a) Respuesta obtenida para la relación 50/150/50  $\mu\text{l}$  y (b) recta de calibración correspondiente.

A pesar que la diferenciación de los patrones respecto al agua ha aumentado en estas condiciones, la recta de calibración obtenida es peor (tabla 5.15), como se puede observar en la figura 5.22 (b). Cada punto ha sido determinado por triplicado y el error asociado calculado como  $I_{n-1}^{95\%}$ . No se ha conseguido mejorar la respuesta respecto a la relación anterior.

## 5.5.2 Intervalo 0,0-20,0 ppm de ion nitrito

### 5.5.2.1 Relación reactivo/muestra/reactivo 25/50/25

Se ha probado esta relación de volúmenes para evaluar la respuesta cuando la concentración de nitritos es superior a 1,0 ppm ya que podría verificarse una pérdida de linealidad de la recta de calibrado a concentraciones superiores. Se ha comprobado que la respuesta obtenida es buena a altas concentraciones, siendo los picos gaussianos y no presentando distorsiones. Además con esta relación y para concentraciones a partir de 1,0 ppm, el efecto del índice de refracción se minimiza hasta desaparecer y puede comprobarse que la respuesta obtenida es sólo función de la reacción de nitritos (figura 5.23 (a)). En la figura 5.23 (b) se presenta la recta de calibración correspondiente. Cada valor experimental es la media de tres replicados y su error ha sido calculado como el intervalo de confianza,  $I_{n-1}^{95\%}$ . La ecuación de la recta de calibración se muestra en la tabla 5.15.



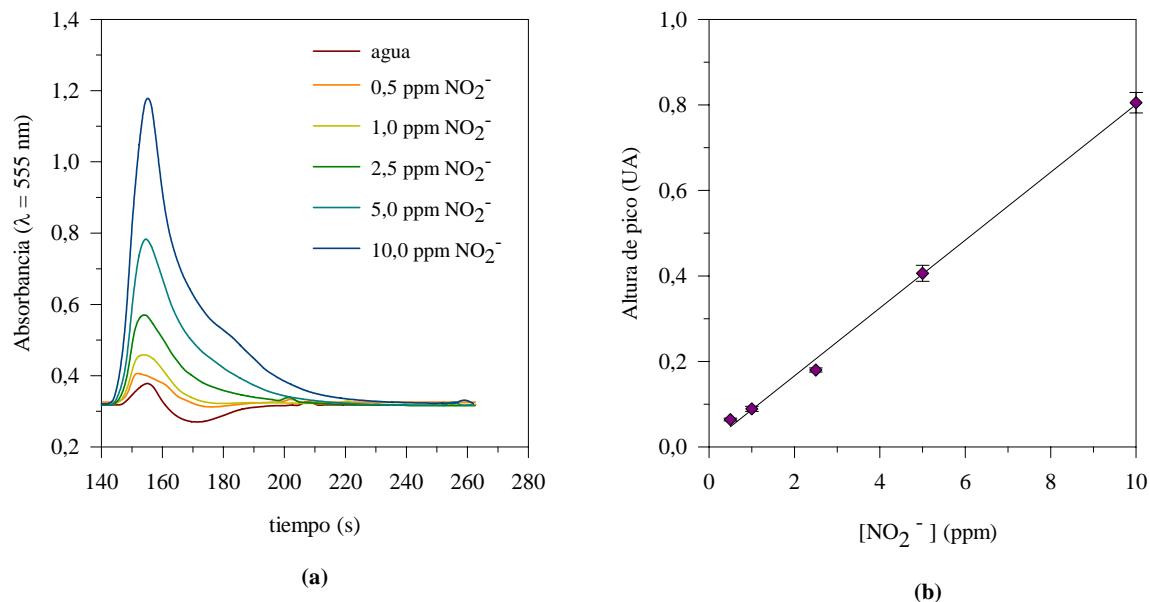
**Figura 5.23** (a) Respuesta obtenida para la relación 25/50/25  $\mu\text{l}$  y (b) recta de calibración correspondiente.

Se comprueba que para esta relación de volúmenes no es posible determinar concentraciones de ion nitrito superiores a 5 ppm porque el valor máximo de la absorbancia sobrepasa el límite superior experimental del equipo utilizado (2 UA). Para aumentar el límite superior de respuesta lineal se ha realizado un calibrado utilizando menor volumen de muestra y reactivo.

#### 5.5.4.2 Relación reactivo/muestra/reactivo 12,5/25/12,5

Se ha realizado un calibrado con la relación de volúmenes 12,5/25/12,5  $\mu\text{l}$  y se ha observado, figura 5.24 (a), que al disminuir la relación se disminuye la señal obtenida. No obstante, se hace posible determinar concentraciones de ion nitrito de hasta 10,0 ppm. Se ha minimizado también el efecto del índice de refracción que solamente se aprecia para el agua y para la concentración inferior analizada, 0,5 ppm. Esto es debido a que la mayor dispersión existente provoca una mayor igualación de índices de refracción. Se observa que la respuesta para el resto de concentraciones es adecuada.

En la figura 5.24 (b) se muestra la recta de calibración obtenida y en la tabla 5.15 los parámetros de calibración correspondientes. Se ha obtenido una correlación peor que para la relación anterior, aunque son comparables y los perfiles de los picos obtenidos son mejores en este caso, evidenciando un mayor grado de mezcla entre muestra y reactivo.



**Figura 5.24** (a) Respuesta obtenida para la relación 12,5/25/12,5  $\mu\text{l}$  y (b) recta de calibración correspondiente.

### 5.5.3 Comparación de calibrados

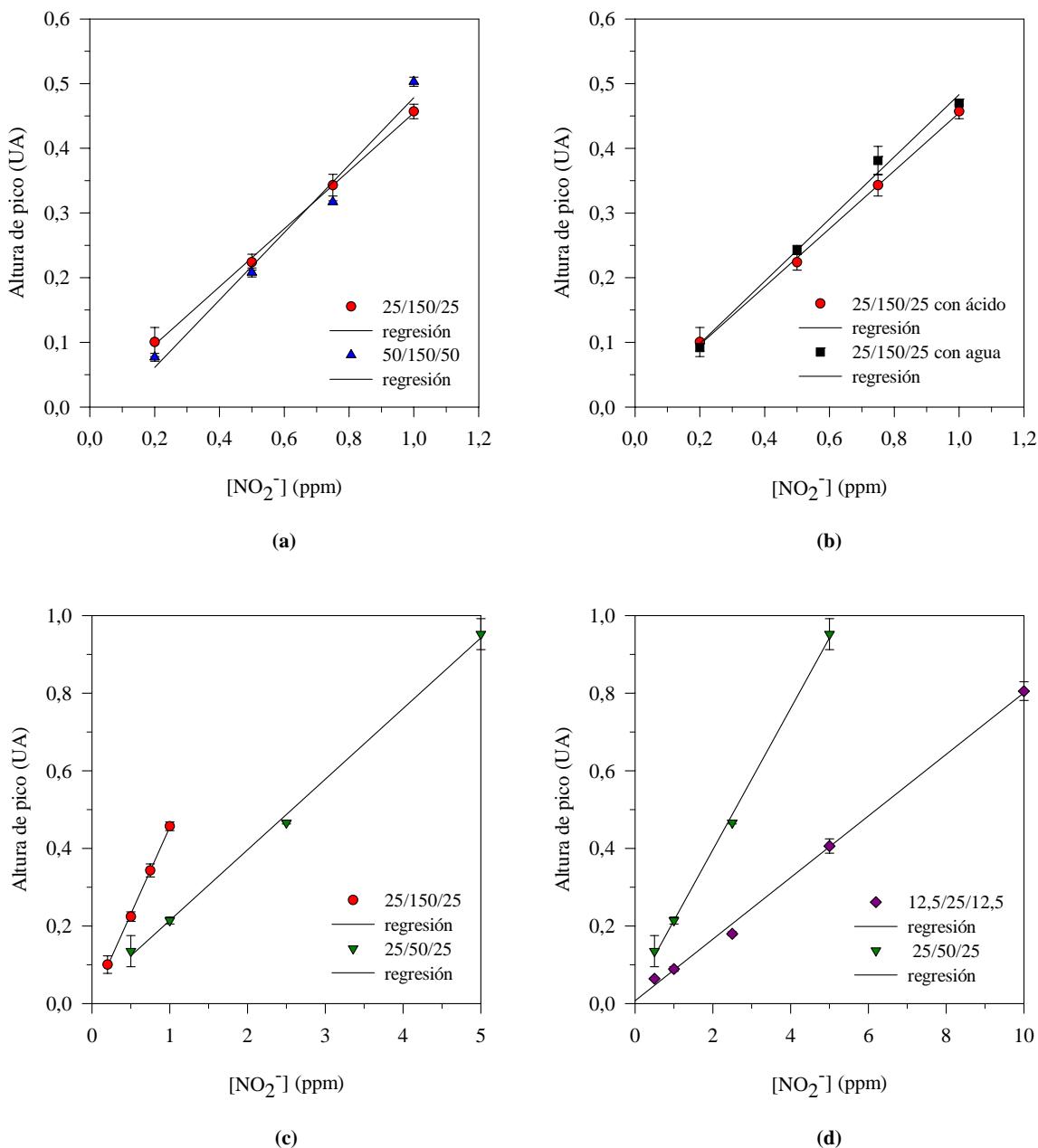
Para finalizar el estudio de la relación de volúmenes óptima en la secuencia *reactivo/muestra/reactivo*, se han comparado los distintos calibrados realizados agrupándolos por volúmenes comunes. A continuación en la figura 5.25 se muestran las rectas de calibración en función de: volumen de muestra de 150  $\mu\text{l}$  (a), volumen de muestra de 150  $\mu\text{l}$  muestra con dos portadores, ácido y agua, para la relación 25/150/25  $\mu\text{l}$  (b), volumen de reactivo de 25  $\mu\text{l}$  (c), y dos volúmenes de muestra distintos 25 y 50  $\mu\text{l}$  (d). En la tabla 5.15 se resumen los valores obtenidos en la regresión.

Si se comparan las dos rectas de calibración de la figura 5.25 (a), se comprueba que el resultado obtenido es mejor para la relación 25/150/25  $\mu\text{l}$  que para 50/150/50  $\mu\text{l}$ . Siendo los valores de absorbancia prácticamente iguales, en el segundo caso se han obtenido unos picos más distorsionados (figura 5.22 (a)).

En la figura 5.25 (b) se comprueba que los resultados obtenidos con agua y ácido, como portador, son comparables pero mejores para el ácido. Si se comparan las figuras 5.20 (a), portador ácido, y 5.21(a), agua, puede concluirse que el efecto del índice de refracción es más pronunciado cuando se utiliza agua como portador ya que los picos aparecen más distorsionados.

En la figura 5.25 (c) se ha comprobado la influencia del volumen de muestra cuando el de reactivo se mantiene constante. Para ambos volúmenes 150 y 50  $\mu\text{l}$  se obtienen buenos resultados. La única diferencia está en la zona lineal de cada relación, ya que con un

volumen menor de muestra el intervalo lineal aumenta y pueden determinarse concentraciones superiores.



**Figura 5.25** Rectas de calibración obtenidas en el estudio de la secuencia reactivo/muestra/reactivo y distintas relaciones de volúmenes. (a)  $V_{\text{muestra}}: 150 \mu\text{l}$  y dos volúmenes de reactivo, (b)  $V_{\text{muestra}}: 150 \mu\text{l}$  y comparación de portadores, (c)  $V_{\text{reactivo}}: 25 \mu\text{l}$  y dos volúmenes distintos de muestra, (d)  $V_{\text{muestra}}: 25, 50 \mu\text{l}$  y la misma relación 1:2 reactivo/muestra.

El mismo resultado se ha obtenido en la figura 5.25 (d), donde puede apreciarse que la respuesta obtenida es adecuada para ambas relaciones. Al disminuir los volúmenes a la mitad, manteniendo la relación entre ellos, se consigue aumentar el intervalo hasta 10,0 ppm. No obstante, esta mejora de intervalo se consigue a expensas de la sensibilidad que disminuye también a la mitad (tabla 5.15). Se observa que los picos obtenidos con la relación más diluida (figura 5.24 (a)) presentan menor efecto del índice de refracción.

Esquemáticamente, de esta serie de experiencias, se podría concluir que el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10% como portador minimiza el efecto de la diferencia de índice de refracción en la determinación de la absorbancia y resulta por lo tanto más idóneo. La relación óptima de volúmenes elegida han sido 25/150/25 µl para el intervalo inferior de concentraciones, ya que se obtiene mayor sensibilidad que con la relación 25/50/25 µl (tabla 5.15).

**Tabla 5.15** Resultados obtenidos en los calibrados realizados para distintas relaciones reactivo/muestra/reactivo.

| Relación     | Portador                           | $H \text{ (UA)} = a (\pm t_{(n-2)} \cdot s_a) + b (\pm t_{(n-2)} \cdot s_b) \cdot [NO_2^-] \text{ (ppm)}$ | r      |
|--------------|------------------------------------|---|--------|
| 25/150/25    | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10% | $H = 0,01 (\pm 0,03) + 0,45 (\pm 0,04) \cdot [NO_2^-], (n=4)$   | 0,9997 |
| 25/150/25    | agua                               | $H = 0,02 (\pm 0,08) + 0,48 (\pm 0,12) \cdot [NO_2^-], (n=4)$   | 0,9983 |
| 50/150/50    | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10% | $H = -0,04 (\pm 0,04) + 0,52 (\pm 0,22) \cdot [NO_2^-], (n=4)$  | 0,9950 |
| 25/50/25     | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10% | $H = 0,03 (\pm 0,07) + 0,18 (\pm 0,02) \cdot [NO_2^-], (n=5)$   | 0,9950 |
| 12,5/25/12,5 | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10% | $H = 0,01 (\pm 0,05) + 0,079 (\pm 0,010) \cdot [NO_2^-], (n=5)$   | 0,9993 |

Para el intervalo superior de concentraciones, la relación 12,5/25/12,5 µl es la óptima porque permite analizar hasta 20,0 ppm como límite superior de concentración sin perder excesiva sensibilidad (tabla 5.15). El tiempo necesario para realizar un análisis con la metodología SIA desarrollada es 5 minutos. Este tiempo es superior al de la metodología r-FIA (1 muestra/min) y es debido al tiempo necesario para realizar toda la secuencia de selección, medida y movimiento de las distintas soluciones.

En el apartado siguiente aparece el estudio realizado para determinar las características que definen el sistema para cada intervalo de concentración. Para evaluar cada uno de los métodos propuestos se han realizado estudios de reproducibilidad y repetitividad y se ha determinado el límite de detección.

#### 5.5.4 Caracterización

Una vez optimizadas las relaciones de reactivo/muestra/reactivo para cada zona de concentración se ha procedido a la determinación de los parámetros de calidad que caracterizan cada uno de los intervalos.

##### Límite de detección

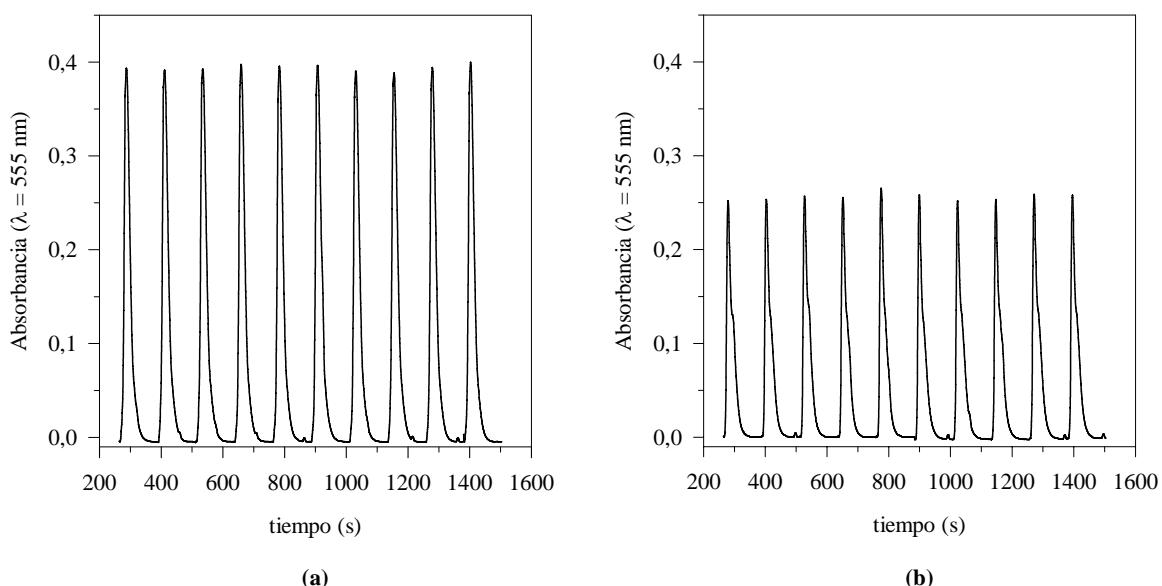
El límite de detección se ha determinado como la concentración mínima que puede ser determinada en las dos condiciones estudiadas con un 95 % de confianza. El procedimiento seguido es idéntico al descrito anteriormente para el sistema r-FIA con microbureta.

Debido a las diferencias de índice de refracción entre los patrones y el reactivo, las medidas de absorbancia utilizadas son también, en ambas condiciones, la diferencia de

absorbancia entre la muestra y el blanco. Por este motivo en los dos casos se ha calculado el límite de detección como se indica en el § 3.3.1.1. A partir de la desviación estándar de una serie de blancos (ecuación 3.1) se ha calculado *el criterio de detección* en unidades de absorbancia, este valor se ha multiplicado por dos y se ha incrementado en un 20%. Se ha sustituido en una recta de calibrado y se ha obtenido el valor de concentración mínima detectable. Se ha verificado esta concentración mediante el análisis de una concentración próxima repetido 10 veces. Finalmente, se ha utilizado la desviación estándar de la media de estas 10 determinaciones y se ha calculado mediante la ecuación 3.2 un nuevo criterio de detección. De este modo sólo el 5% de las muestras puede tener una concentración por debajo de su límite [Caulcutt y Boddy, 1983]. Substituyendo este valor en la recta de calibración se calcula el límite de detección. En la tabla 5.18 aparecen los resultados obtenidos.

### **Repetitividad**

La repetitividad en ambos casos ha sido estimada evaluando el error estándar relativo para 10 determinaciones de una concentración intermedia del intervalo para ambas zonas de concentración. Para la secuencia 25/150/25  $\mu\text{l}$  se analizado una concentración de ion nitrito de 0,75 ppm y para la secuencia 12,5/25/12,5  $\mu\text{l}$  la concentración fue 2,5 ppm. Hay que destacar que en ninguno de los casos se ha obtenido un RSD (%) significativamente superior al 1,5%, valor razonable para un método instrumental. En la figura 5.26 se muestra el estudio de repetitividad y en la tabla 5.18 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 5.26** Repetitividad del método propuesto, (a) 0,75 ppm para el intervalo inferior de concentración y (b) 2,5 ppm para el intervalo superior.

## Reproducibilidad

La reproducibilidad ha sido estimada por comparación de calibrados efectuados en días diferentes. Se ha estimado si existen diferencias significativas entre las medias del parámetro  $b$  de los distintos calibrados realizando el análisis de varianza de un factor ANOVA.

**Tabla 5.16** Estudio de reproducibilidad para el intervalo 0,0-3,0 ppm de ion nitrito.

| Rectas de calibración (n=8)  | ANOVA de un factor  |
|--|---|
| $H(UA) = a (\pm t_{(n-2)} \cdot s_a) + b (\pm t_{(n-2)} \cdot s_b) \cdot [NO_2^-] \text{ (ppm)}$ |   |
| $H = 0,02 (\pm 0,08) + 0,48 (\pm 0,12) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,9975$ $F_{\text{calculada}} = 0,32079415$          |
| $H = -0,01 (\pm 0,03) + 0,50 (\pm 0,04) \cdot [NO_2^-]$  | $r = 0,9990$ $F_{\text{tabulada}} = 9,55208179$           |
| $H = 0,03 (\pm 0,03) + 0,48 (\pm 0,02) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,9991$ $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tabulada}}$ |
| $H = 0,02 (\pm 0,02) + 0,499 (\pm 0,017) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,9994$ no existen diferencias                       |
| $H = 0,05 (\pm 0,02) + 0,488 (\pm 0,015) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,9995$ significativas                               |
| $H = 0,03 (\pm 0,01) + 0,474 (\pm 0,009) \cdot [NO_2^-]$   | $r = 0,9998$ entre calibrados                             |

En el intervalo inferior de concentración la respuesta es lineal hasta 3,0 ppm, mientras que en el intervalo superior la medida de absorbancia es lineal hasta 10,0 ppm. No obstante, realizando el ajuste con un polinomio de segundo grado, ha sido posible incrementar el límite superior hasta 20,0 ppm. Este pérdida de linealidad está asociada a la resolución del equipo utilizado para la determinación de la absorbancia [Skoog y Leary, 1994]. En la tabla 5.16 se presentan las distintas rectas de calibración utilizadas y los resultados obtenidos en el análisis de varianza para el intervalo inferior de concentración.

**Tabla 5.17** Estudio de reproducibilidad para el intervalo 0,0-20,0 ppm de ion nitrito. Los errores de a, b y c están expresados como el error estándar,  $s_{n-1} / n^{1/2}$ .

| Rectas de calibración (n=7)   | ANOVA de un factor                           |
|---|--|
| $H(UA) = a + b \cdot [NO_2^-] + c \cdot [NO_2^-]^2$   |  |
| $H=0,017 (\pm 0,014) + 0,093 (\pm 0,005) \cdot [NO_2^-] - 0,0012 (\pm 0,0002) \cdot [NO_2^-]^2$ | $F_{\text{calculada}} = 0,0857143$           |
| $H=0,010 (\pm 0,013) + 0,117 (\pm 0,005) \cdot [NO_2^-] - 0,0015 (\pm 0,0002) \cdot [NO_2^-]^2$ | $F_{\text{tabulada}} = 10,127963$            |
| $H=0,010 (\pm 0,013) + 0,094 (\pm 0,005) \cdot [NO_2^-] - 0,0012 (\pm 0,0002) \cdot [NO_2^-]^2$ | $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tabulada}}$ |
| $H=0,014 (\pm 0,004) + 0,098 (\pm 0,002) \cdot [NO_2^-] - 0,0011 (\pm 0,0001) \cdot [NO_2^-]^2$ | no existen diferencias                       |
| $H=0,021 (\pm 0,017) + 0,102 (\pm 0,006) \cdot [NO_2^-] - 0,0014 (\pm 0,0003) \cdot [NO_2^-]^2$ | significativas entre calibrados              |

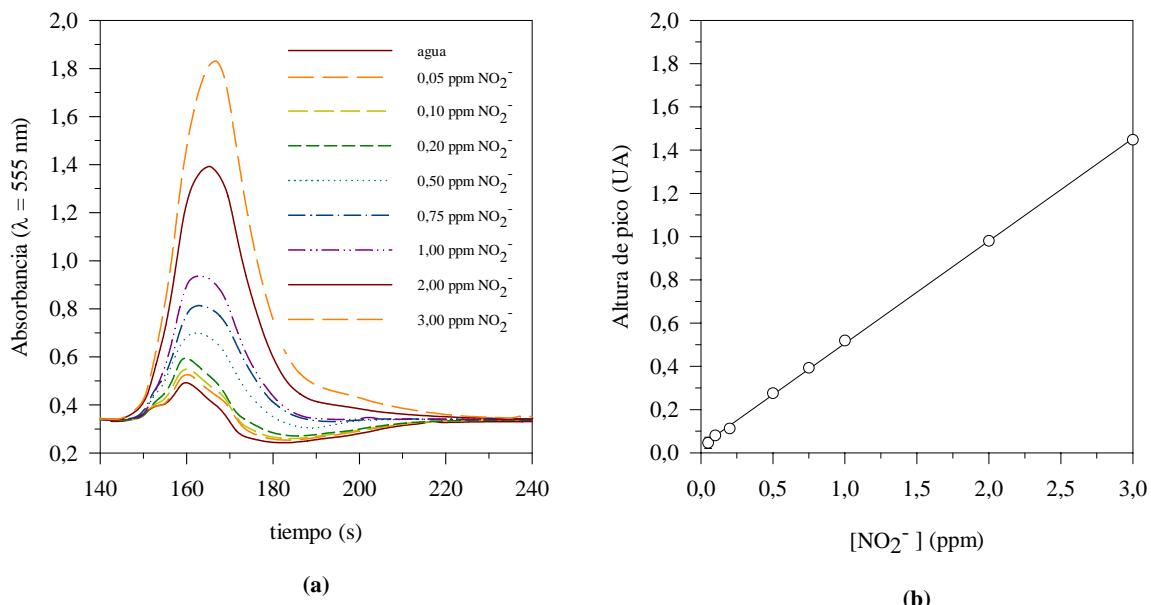
En la tabla 5.17 se muestran las distintas rectas de calibrado obtenidas y el análisis de varianza de un factor para el intervalo superior de concentración. Los errores de los coeficientes están expresados como el error estándar ( $s_{n-1}/n^{1/2}$ ). En ambos condiciones se comprueba que no existen diferencias significativas entre las pendientes obtenidas en diferentes días,  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tabulada}}$ . Por lo tanto, las condiciones propuestas son reproducibles y se acepta la hipótesis nula: las medias de las pendientes no difieren significativamente.

En la tabla 5.18 se muestra un resumen de los resultados obtenidos, en la caracterización del sistema desarrollado, para los dos intervalos de concentración.

**Tabla 5.18** Principales parámetros de calidad del sistema SIA para la determinación de ion nitrito. La repetitividad ha sido estimada para un estándar de 0,75ppm y 2,5 ppm respectivamente.

| Parámetro                                  | Intervalo inferior de concentración | Intervalo superior de concentración  |
|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Intervalo de concentración                 | 0,0-3,0 ppm                         | 0,0-20,0 ppm                         |
| Límite de detección                        | 0,048 ppm                           | 0,40 ppm                             |
| Secuencia <i>reactivo/muestra/reactivo</i> | 25/150/25 $\mu$ l                   | 12,5/25/12,5 $\mu$ l                 |
| Consumo de reactivo                        | 50 $\mu$ l análisis <sup>-1</sup>   | 25 $\mu$ l análisis <sup>-1</sup>    |
| Consumo de muestra                         | 150 $\mu$ l análisis <sup>-1</sup>  | 25 $\mu$ l análisis <sup>-1</sup>    |
| Repetitividad (RSD(%); n=10)               | 0,88                                | 1,54                                 |
| Reproducibilidad (ANOVA 1 vía)             | $F_{cal}=0,32 < F_{tab}=9,55$ (n=6) | $F_{cal}=0,08 < F_{tab}=10,13$ (n=5) |
| Frecuencia análisis (h <sup>-1</sup> )     | 12                                  | 12                                   |

En la figura 5.27 (a) se muestran los picos de absorbancia obtenidos para distintas concentraciones de ion nitrito con la relación reactivo/muestra/reactivo de 25/150/25  $\mu$ l.



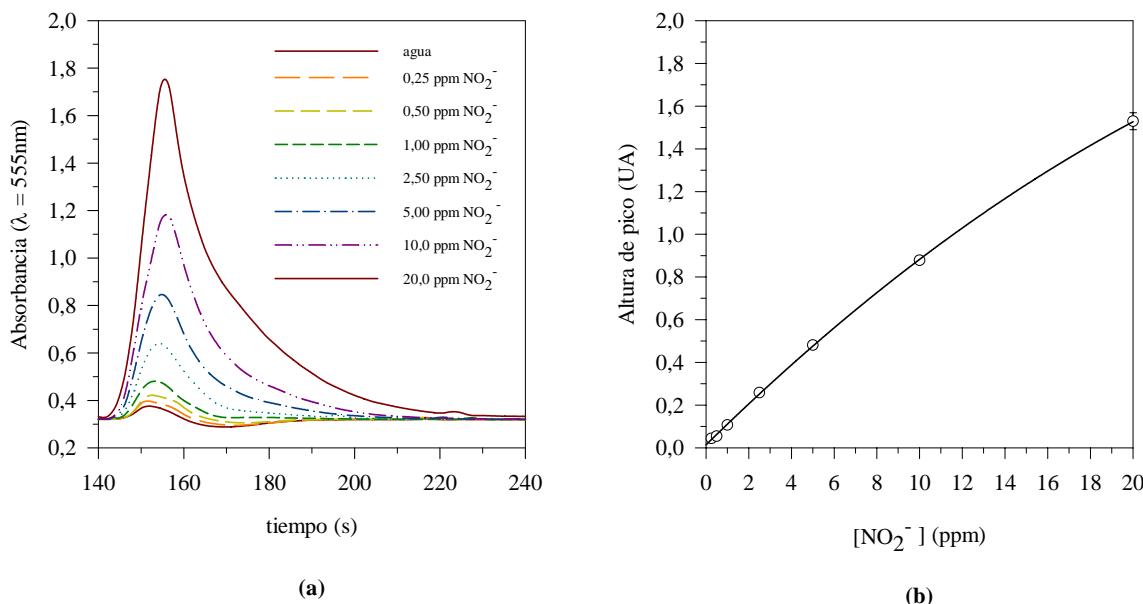
**Figura 5.27** (a) Registros de absorbancia para un calibrado tipo para la secuencia 25/150/25  $\mu$ l en el intervalo 0,0-3,0 ppm de ion nitrito, y (b) ajuste lineal correspondiente restando el blanco a todos los picos.

Los registros se han efectuado modificando la línea base (aproximadamente 0,330 unidades de absorbancia) para poder apreciar los efectos de la diferencia de índice de refracción. En la figura 5.27 (b), se muestra una recta de calibración típica obtenida en condiciones óptimas correspondiente a la sexta recta de la tabla 5.16.

El error en los puntos experimentales ha sido calculado como el intervalo de confianza con un nivel del 95%, para n=3. Puede observarse que el efecto provocado por la diferencia de

índice de refracción se minimiza al aumentar la concentración y sólo es apreciable para concentraciones menores de 0,5 ppm. A partir de esta concentración el pico no aparece distorsionado y sólo son evidentes los efectos debidos a la reacción química.

En la figura 5.28 (a) se presenta los picos de absorbancia obtenidos para un calibrado realizado en el intervalo superior de concentración, con la relación 12,5/25/12,5  $\mu$ l. Puede observarse que el efecto del índice de refracción desaparece para las concentraciones superiores, siendo mínimo para las inferiores en comparación a la respuesta obtenida para la otra relación (figura 5.27 (a)). En la figura 5.28 (b) se presenta la curva de calibración correspondiente. Los parámetros del ajuste son los de la quinta curva de la tabla 5.17. Cada concentración ha sido analizada por triplicado y el error asociado ha sido calculado con un intervalo de confianza del 95%.



**Figura 5.28** (a) Registros de absorbancia para un calibrado tipo, para la secuencia 12,5/25/12,5  $\mu$ l, en el intervalo 0,0-20,0 ppm de ion nitrito y, (b) ajuste con un polinomio de segundo grado. Los valores de absorbancia en el ajuste son el blanco menos la respuesta para cada concentración.

## 5.6 Desarrollo del sistema autoadaptativo

Para finalizar la implementación del sistema SIA desarrollado y conferirle capacidad autoadaptativa, ha sido necesario realizar una serie de cambios en el programa de gestión. Los cambios efectuados permiten la toma de decisiones, mediante un control por retroceso o *feedback*. Con las modificaciones efectuadas, el sistema podrá trabajar de una forma independiente adaptándose a los diferentes intervalos de concentración que pueda presentar una muestra. Además el programa permite la realización automática de calibrados y tiene también la capacidad de autocalibrarse.

### 5.6.1 Programa de gestión

El nuevo programa de gestión tiene los mismos módulos básicos que el inicial (ver figura 5.5). La diferencia principal está en la ampliación de funciones que pueden realizarse ahora bajo petición por teclado y, en el sistema *feedback* de toma de decisiones incorporado. En la figura 5.29 se muestran el nuevo cuadro de diálogo del programa autoadaptativo desarrollado.

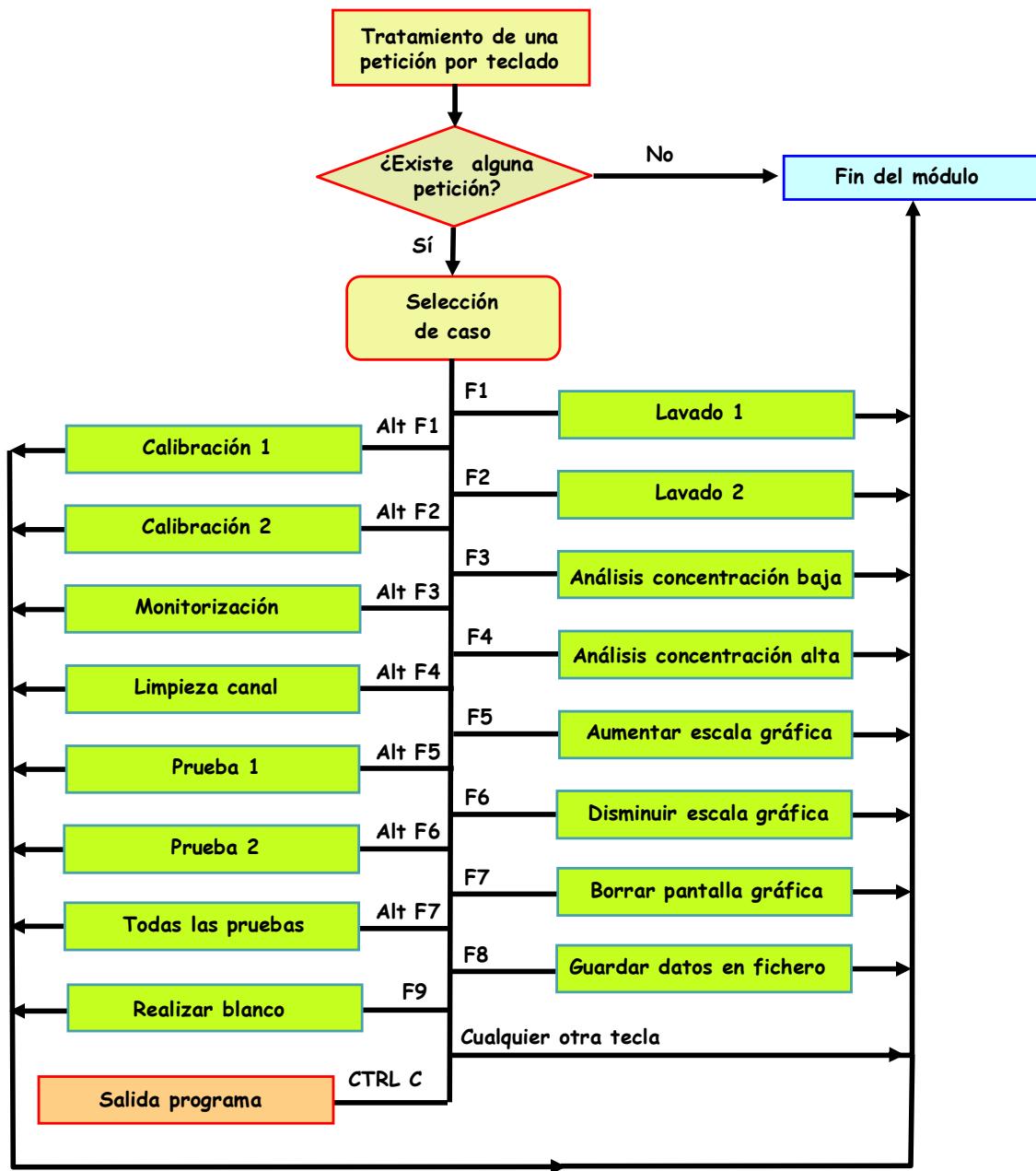


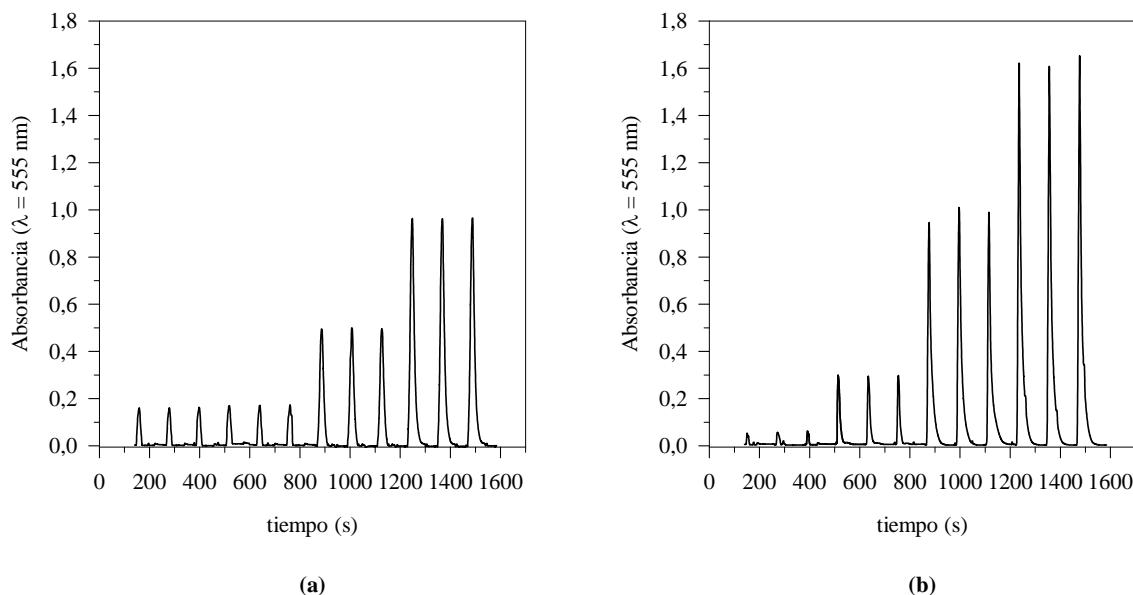
Figura 5.29 Nuevo cuadro de peticiones del programa autoadaptativo de gestión de fluidos.

La diferencia principal del sistema de gestión radica en la subrutina de monitorización, y en las subrutinas implícitas de calibración y cálculo numérico. Ahora no sólo se realiza el

análisis sino que se adaptan de modo automático las condiciones de éste a la composición de la muestra.

Cuando se comienza a trabajar, el sistema realiza un calibrado para cada uno de los intervalos de concentración (figura 5.29). Calcula las rectas de calibración y guarda este resultado. Durante la etapa de monitorización siempre realiza el primer análisis de la muestra en las condiciones del intervalo inferior de concentración, es decir 25/150/25  $\mu\text{l}$ . El valor obtenido de absorbancia se compara con el valor control, y si la absorbancia supera el valor de 1,5 UA se repite el análisis en las condiciones del intervalo superior de concentración (12,5/25/12,5  $\mu\text{l}$ ). Una vez finalizado el análisis en las condiciones óptimas se calcula la concentración de la muestra en ppm y el resultado se muestra por pantalla junto con el registro de absorbancia. A todos los valores de absorbancia se les resta el valor del blanco tanto en los patrones como en las muestras.

Durante el proceso de monitorización y cuando el análisis se realiza en las condiciones del intervalo superior de concentración, si el valor de absorbancia es menor de 0,3 UA se repite el análisis pero en las condiciones del intervalo inferior de concentración. Una vez finalizado el análisis de una muestra el programa realiza un ciclo de lavado del canal de aspiración con la siguiente muestra, antes del análisis.



**Figura 5.30** Respuesta obtenida para los calibrados efectuados en el intervalo superior e inferior de concentración, (a) intervalo 0,0-3,0 ppm y (b) intervalo 0,0- 20,0 ppm. Las concentraciones analizadas son 0,0; 0,05; 1,0 y 2,0 ppm para *a* y 0,0; 2,0; 10,0 y 20,0 ppm para *b*.

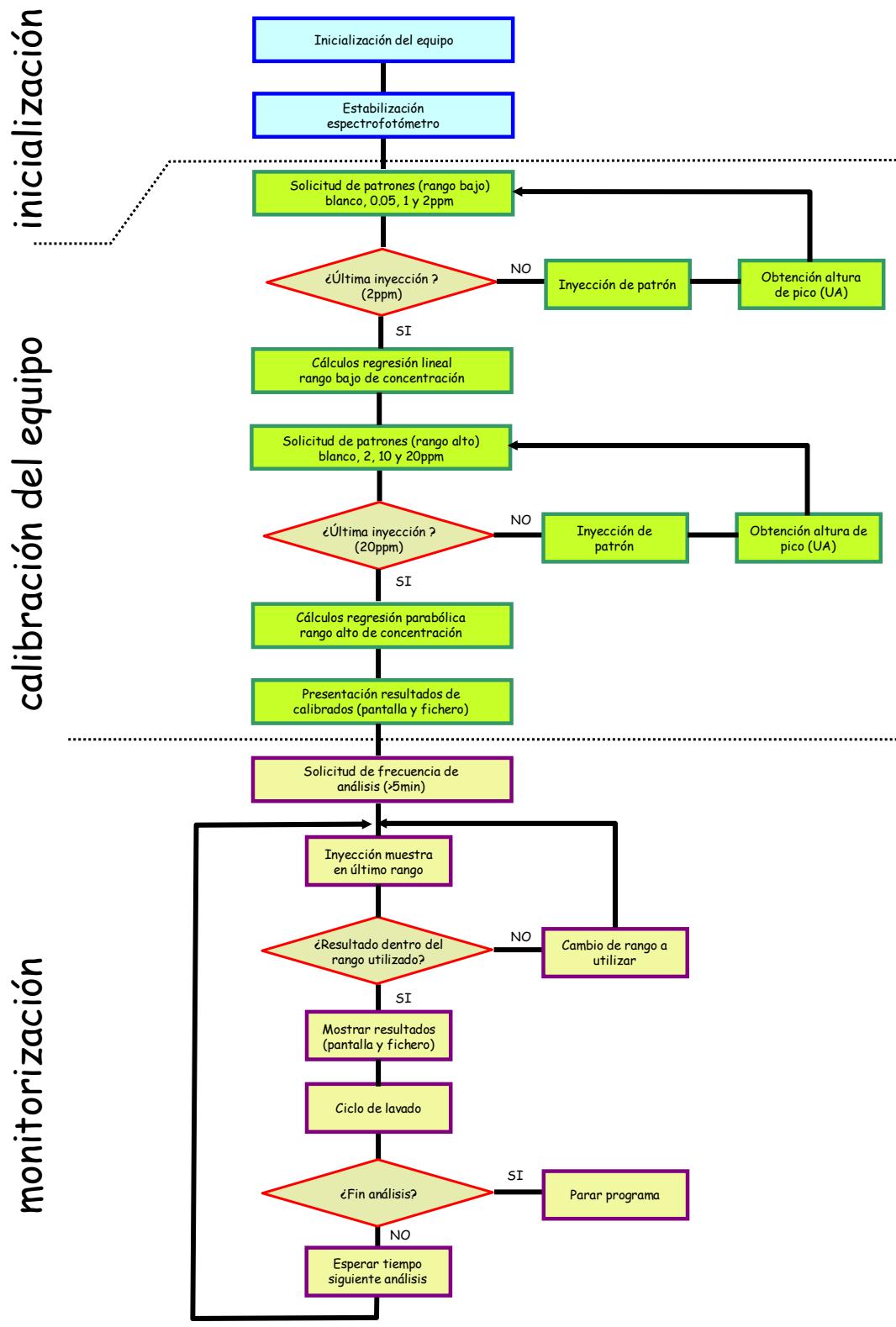
Una vez minimizados los efectos negativos del índice de refracción, se elimina la necesidad de aumentar artificialmente el valor del cero de absorbancia cuando circula solamente el portador por el tubo de reacción. A partir de este punto siempre se realizaran los registros sin modificar la línea de base. La concentración de los patrones utilizados para la obtención de las rectas de calibración son: a) intervalo inferior: 0,0 ppm, 0,05 ppm, 1,0 ppm y 2,0 ppm; b) intervalo superior: 0,0 ppm, 2,0 ppm, 10,0 ppm y 20,0 ppm. En la figura 5.30 puede observarse la alta repetitividad obtenida con la metodología implementada, así como la disminución del efecto del índice de refracción gracias al uso de la relación de volúmenes óptima.

En la figura 5.31 se muestra el diagrama de flujo del sistema de gestión de fluidos autoadaptativo desarrollado para la determinación de ion nitrito, en dos intervalos de concentración diferentes. El programa se presenta en el apéndice 9.2.

La subrutina de análisis dentro del programa viene determinada por la reacción química que se produce (§ 1.6.2) y por el equipo SIA utilizado (figura 5.1). Volúmenes variables de muestra y reactivo son aspirados secuencialmente, acumulados en el tubo de acumulación y enviados hacia el detector. Un ciclo completo de medida tiene las siguientes etapas:

1. aspiración de 25  $\mu$ l o 12,5  $\mu$ l de *reactivo 1* en el tubo de acumulación (puerto 4);
2. aspiración de 150  $\mu$ l o 25  $\mu$ l de la *muestra* (puerto 2) en el tubo de aspiración;
3. aspiración de 25  $\mu$ l o 12,5  $\mu$ l del *reactivo2* (puerto 4);
4. aspiración de 12,5  $\mu$ l de agua desionizada (puerto 5) en el tubo de acumulación;
5. inyección de la secuencia acumulada reactivo1/muestra/reactivo2/agua hacia el tubo de reacción a través del puerto 3;
6. impulsión hacia el detector usando la solución portadora de  $H_3PO_4$  al 10%;
7. medida de la absorbancia del colorante azoico formado a 555 nm;
8. después de esta etapa, se repite el ciclo para la siguiente determinación o en su defecto se realiza una etapa de lavado.

El tiempo de un ciclo de análisis completo es de 5 minutos. El programa desarrollado realiza de modo automático el control total del proceso. Esto incluye desde la adquisición de datos hasta la selección de la relación óptima gracias al control *feedback* programado.

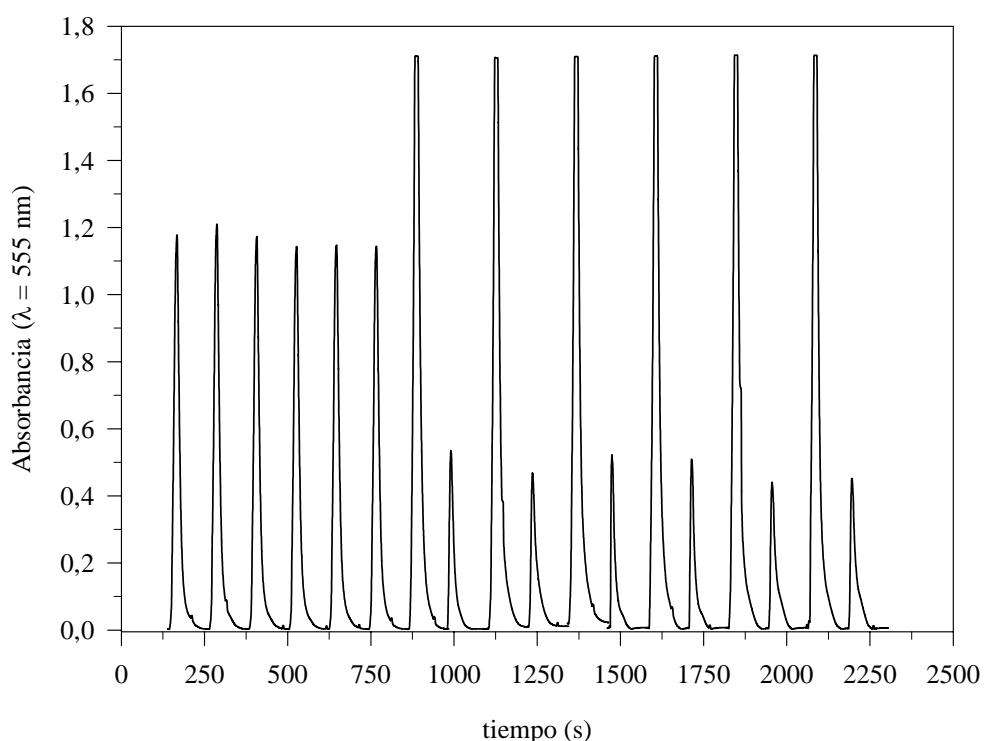


**Figura 5.31** Diagrama de flujo del sistema autoadaptativo desarrollado para el análisis de ion nitrito en dos intervalos de concentración. Intervalo 0,0-3,0 ppm, secuencia 25/150/25  $\mu$ l e intervalo 0,0-20,0 ppm, secuencia 12,5/25/12,5  $\mu$ l.

### 5.6.2 Validación con muestras sintéticas o patrón

Una vez realizadas las modificaciones necesarias en el programa autoadaptativo y comprobada su capacidad de autocalibración, se realizó un último estudio preliminar. Este consistió en verificar el funcionamiento correcto de todo el sistema integrado de gestión de fluidos, antes de su aplicación al análisis de muestras reales.

Una vez realizado el calibrado, el sistema realiza un primer análisis de la muestra en las condiciones definidas para el intervalo bajo. Si el valor de absorbancia *superá 1,5 UA* se repite de nuevo el análisis en las condiciones fijadas para el intervalo alto. Si durante el proceso de monitorización una muestra da un resultado de absorbancia *menor < 0,3 UA* se repite el análisis en las condiciones del intervalo superior. En la figura 5.32 se aprecian los resultados obtenidos en la validación con dos soluciones patrón, de 2,5 ppm de ion nitrito y 5,0 ppm de ion nitrito.



**Figura 5.32** Respuesta obtenida para soluciones patrón de 2,5 ppm y 5,0 ppm. Cuando la concentración es mayor de 3,0 ppm, supera el valor de 1,5 UA y el análisis se repite en las condiciones del intervalo alto (picos pequeños).

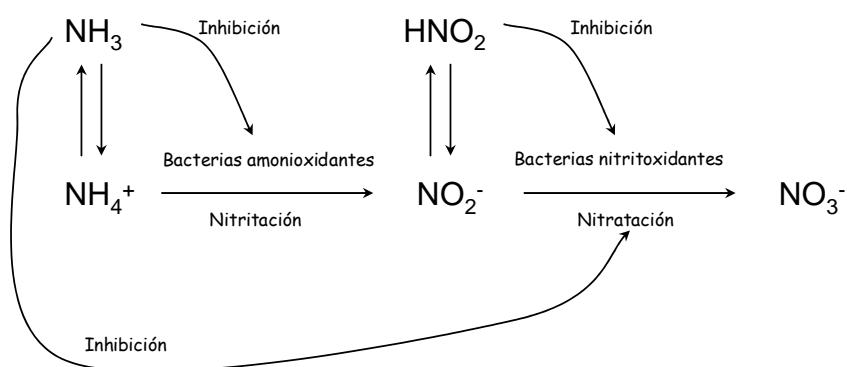
## 5.7 Validación del sistema con muestras reales

Como aplicación final del sistema autoadaptativo desarrollado se han analizado dos series de muestras. Con el objeto de validar con muestras reales el sistema autoadaptativo de análisis de ion nitrito se han estudiado dos situaciones reales bien diferenciadas. Todas las muestras proceden del estudio del proceso de nitrificación biológico de una planta depuradora piloto. Este proceso se caracteriza por tener el ion nitrito como intermediario de reacción. En el primer caso, las muestras proceden del estudio de la cinética de inhibición por ion nitrito de la reacción de nitratación de aguas industriales con alta carga de nitrógeno. La concentración de ion nitrito en estas muestras puede oscilar dentro del intervalo entre 0,0-1500 ppm, por lo que se tuvo que proceder a su dilución. En el segundo caso, las muestras pertenecen a un seguimiento respirométrico del proceso de nitrificación en un agua residual urbana. Aquí, la concentración de ion nitrito puede oscilar entre 0,0-20,0 ppm, por lo que se analizaron directamente sin dilución previa.

### 5.7.1. Cinética de inhibición

Las aguas residuales industriales pueden presentar elevadas concentraciones de nitrógeno, dependiendo del proceso que las genera. Por tanto, es bastante frecuente observar inhibición por sustrato de la nitrificación en el tratamiento biológico de este tipo de efluentes.

Tanto las bacterias amoniooxidantes como las nitritooxidantes se ven inhibidas por sus propios sustratos: amonio y nitrito. La inhibición es debida a las formas libres de estas moléculas, que son amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) (figura 5.33). El pH influirá directamente en los equilibrios entre las formas iónicas y las formas libres, de tal forma que si el pH es elevado, los equilibrios se desplazan hacia el  $\text{NH}_3$  y el  $\text{NO}_2^-$ , mientras que si es bajo, aumentarán las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{HNO}_2$ .



**Figura 5.33** Esquema de las reacciones e inhibiciones del proceso de nitrificación.

Las concentraciones a las que se produce inhibición en un sistema nitrificante pueden variar dependiendo de factores como la aclimatación de la biomasa nitrificante a  $\text{NH}_3$  y a  $\text{HNO}_2$ , la temperatura o la concentración de microorganismos nitrificantes activos. Por otro lado, la inhibición por sustrato de los microorganismos nitrificantes es reversible si disminuye la concentración de amoniaco o de ácido nitroso.

Se han desarrollado muchos modelos matemáticos para cuantificar la inhibición por sustrato del crecimiento de los microorganismos [Carrera, 2001]. En muchos casos estas ecuaciones han derivado de la teoría de inhibición enzimática. Así, el primer modelo cinético para describir la inhibición por sustrato fue el modelo enzimático propuesto por Haldane [Guisasola et al., 2003], que sirvió de punto de partida de muchos otros descritos posteriormente. El modelo de Haldane es la base sobre la que se han desarrollado otros modelos que cuantifican el efecto inhibitorio del sustrato en la cinética de crecimiento de los microorganismos.

Las muestras analizadas procedían de un estudio de cinética de inhibición realizado en una planta piloto de aguas residuales de alta carga. El procedimiento seguido ha sido realizar un pulso de ion nitrito de 1500 ppm (1 ppm  $\text{NO}_2^-$  son 0,3043 ppm N-  $\text{NO}_2^-$ ) en el reactor en discontinuo, y determinar su concentración en función del tiempo. También se ha determinado la velocidad de consumo de oxígeno (*Oxygen Uptake Rate*, OUR). La OUR se ha determinado parando la aireación y calculando la pendiente de la bajada de oxígeno que se producía. Se ha calculado la OUR en el estado endógeno, sólo respiración sin oxidación de sustrato, para poder restarla y conocer la OUR debida al consumo de oxígeno. Con estos datos ha podido estimarse la velocidad de nitratación del proceso y el valor de las constantes asociadas a esta velocidad.

A continuación se explica el procedimiento seguido y los resultados obtenidos. Las muestras analizadas han sido tomadas directamente de la planta piloto, filtradas después con un filtro de 0,45 micras, diluidas cuando ha sido necesario, y analizadas por dos métodos: el método SIA propuesto y mediante la técnica de electroforesis capilar. Esta técnica analítica se utiliza como método de rutina para determinar simultáneamente la concentración de diversos iones en la planta piloto.

El total de muestras analizadas ha sido 17. Inicialmente se realizó la autocalibración del equipo en los dos intervalos de concentración y posteriormente se analizaron las muestras. Las condiciones finales son las optimizadas para los dos intervalos de concentración (§5.5) en las condiciones de operación definidas en la tabla 5.9 (§ 5.3.2.2). En la tabla 5.19 se detallan las características definitivas del sistema de gestión de fluidos utilizadas. El primer

análisis de una muestra permite determinar si el intervalo de aplicación es el correcto. Si lo es, el análisis se realiza por triplicado y sí no se repite en la segunda relación de volúmenes. Debido a la alta concentración de ion nitrito las primeras muestras, justo después del pulso de ion nitrito (1500 ppm), fueron diluidas inicialmente 2/250. Las últimas muestras con menor concentración de ion nitrito se analizaron directamente sin dilución.

**Tabla 5.19** Condiciones finales utilizadas en el análisis de muestras reales.

| Parámetro                                     | Intervalo 0,0-3,0 ppm   | Intervalo 0,0-20,0 ppm   |
|---|---|--|
| Caudal del portador                           | 0,5 ml/min  | 0,5 ml/min   |
| Solución portadora                            | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10%  | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10%   |
| Secuencia<br><i>reactivo/muestra/reactivo</i> | 25/150/25   | 12,5/25/12,5   |
| Programa monitorización                       | <i>1<sup>er</sup> análisis</i><br>Abs<1,5UA triplicado<br>Abs>1,5 cambio a 2 <sup>a</sup> relación<br>lavado entre muestras | <i>n análisis</i><br>Abs>0,3 triplicado<br>Abs<0,3 cambio a 1 <sup>a</sup> relación<br>lavado entre muestras |

Los resultados obtenidos con el método propuesto se han comparado con los obtenidos por la técnica de la electroforesis capilar. Hay que destacar que la técnica de electroforesis capilar presenta problemas en el análisis de muestras con alta concentración de iones, porque se produce enmascaramiento cuando el ion a determinar está en baja concentración. Presenta, por tanto, dos desventajas importantes la presencia de interferencias debidas a otros iones presentes y el problema de su alto límite de detección para ion nitrito, alrededor de 8 ppm. Por esta razón, se obtienen resultados con mucho error en concentraciones de ion nitrito por debajo de 10 ppm.

En la comparación de resultados se han utilizado los criterios estadísticos más comunes como son el test *t* de Student para muestras por parejas y la comparación de métodos por regresión lineal [Miller y Miller, 1993]. En este primero, se adopta la hipótesis nula que no existen diferencias significativas entre las concentraciones proporcionadas por los dos métodos, y se compara si la media de las diferencias difiere significativamente de cero con un índice de confianza del 95%. Si el estadístico calculado (*t*<sub>cal</sub>) resulta inferior a un valor crítico tabulado se acepta la hipótesis: el método no proporciona valores significativamente diferentes para las concentraciones medidas. Cuando el intervalo de concentración de las muestras medidas es amplio, el método estadístico más válido es la regresión lineal. En este método se calcula el valor de la ordenada en el origen, la pendiente y el coeficiente de correlación por regresión directa de los valores obtenidos frente a los de referencia. Si cada muestra presenta un resultado idéntico con los dos métodos analíticos, la recta de regresión tendrá una ordenada en el origen de 0 y pendiente de 1. Para comprobar que la ordenada en

el origen y la pendiente no difieren significativamente de 0 y 1 respectivamente, se han determinado los límites de confianza con un nivel de significación del 95%.

Se ha de tener en cuenta que la recta de regresión se calcula suponiendo que los errores en el eje de las x son despreciables y, se cumple que todos los errores tienen lugar en la dirección de las "y". Generalmente, esto es válido en la generación de una recta de calibración de un único método, no puede justificarse cuando la recta de regresión se usa con propósitos de comparación. A pesar de ello, simulaciones y experiencias prácticas muestran que los resultados son fiables si se cumplen las siguientes aproximaciones: el método más preciso se representa en el eje de las x; el número mínimo de puntos experimentales ha de ser 10; y estos han de cubrir el intervalo de concentraciones de interés de una manera aproximadamente uniforme.

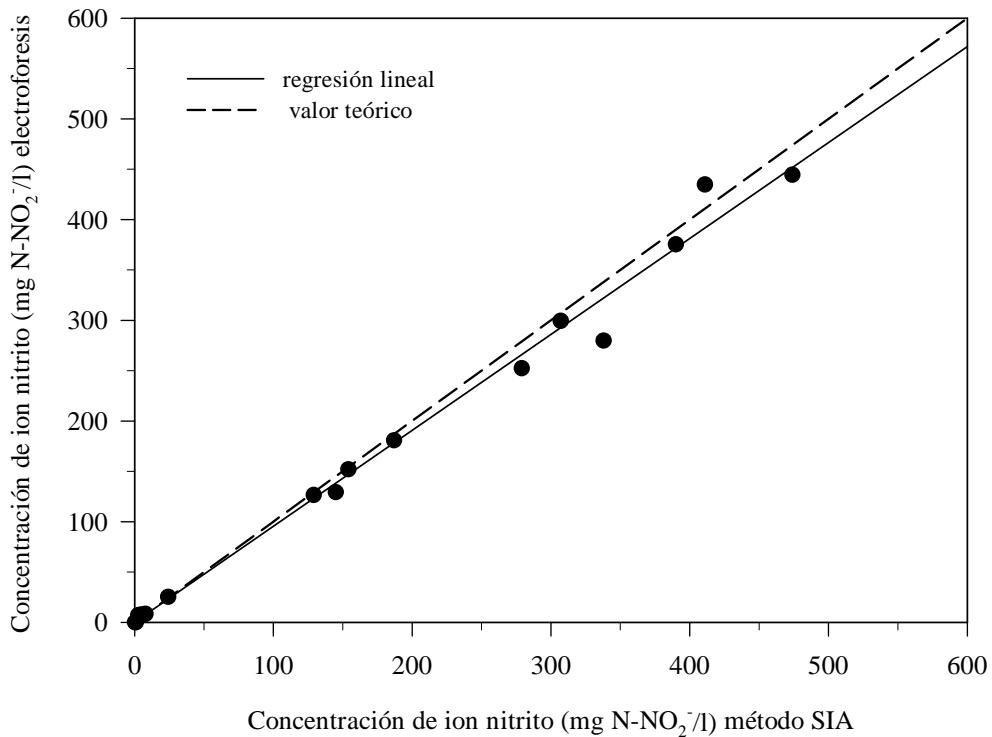
En este caso se ha considerado como método más preciso el método propuesto, ya que presenta menos interferencias, un menor límite de detección y además está basado en la misma reacción del método de estándar para aguas potables y residuales [APHA-AWWA-WEF, 1999]. Por tanto se trata de la misma determinación pero realizada mediante un sistema automático.

En la figura 5.34 se ha representado la regresión lineal de los dos métodos y en la tabla 5.20 se muestran los resultados obtenidos tanto para la regresión directa como para el método de comparación de la *t* de Student. Se dispone de 17 datos experimentales que cubren un intervalo de concentración de 0,16 a 500 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>·l<sup>-1</sup> de ion nitrito, encontrándose distribuidas en todo el intervalo.

**Tabla 5.20** Comparación estadística de los resultados. Número de puntos experimentales n=17.

| Método estadístico                            | Valores de los parámetros (95%)  | ¿Diferencias significativas con el 95% de confianza? |
|---|--|--|
| Prueba <i>t</i> para muestras por parejas     | $t_{cal} = 0,17$ , $t_{tab} = 2,12$ ; $t_{cal} < t_{tab}$                            | no   |
| Regresión directa electroforesis frente a SIA | ordenada en el origen = $0,24 \pm 13,7$<br>pendiente = $0,95 \pm 0,05$<br>$r=0,9946$ | no   |

De los resultados obtenidos se desprende que los métodos son comparables con un nivel de significación del 95%. Por tanto, se concluye que el sistema SIA desarrollado proporciona resultados satisfactorios en la determinación de ion nitrito en muestras complejas y que estos no difieren de los obtenidos a partir de la técnica de la electroforesis. Además se ha podido comprobar que el método propuesto permite analizar muestras en todo el intervalo de concentración, mientras que la electroforesis capilar no permite determinar las concentraciones menores del intervalo.



**Figura 5.34** Comparación por regresión directa de los dos métodos de análisis.

Para finalizar, se muestra el modelo establecido a partir de las concentraciones de ion nitrito determinadas con el sistema SIA autoadaptativo desarrollado, y la OUR calculada simultáneamente. Los resultados obtenidos han permitido estimar los valores de las constantes que definen la velocidad de nitratación. La OUR se ha determinado parando la aireación y calculando la pendiente de la bajada de oxígeno que se produce. También se ha calculado la OUR en el estado endógeno para poder restarla y conocer la OUR debida sólo al consumo de oxígeno.

La velocidad de nitratación se calcula a partir de la OUR que se determina en el mismo momento de tomar la muestra como:

$$r = \frac{OUR - OUR_{\text{endógena}}}{[\text{biomasa}] \cdot 1,143} \quad \text{ecuación 5.1}$$

El factor de 1,143 mg O<sub>2</sub>/mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> corresponde al coeficiente estequiométrico que relaciona el consumo de oxígeno y el consumo de ion nitrito. Los datos se han ajustado al modelo de Haldane que tiene en cuenta la inhibición por sustrato. El modelo tiene la forma siguiente:

$$r = \frac{r_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad \text{ecuación 5.2}$$

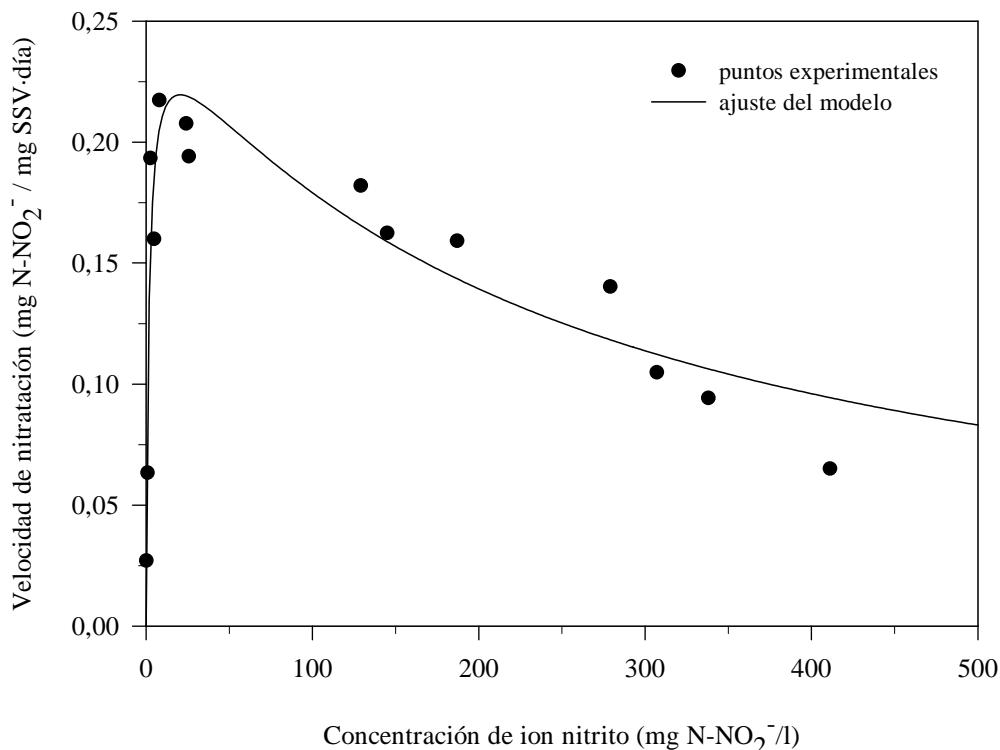
donde,

$r$  es la velocidad de nitratación,  $S$  es la concentración de substrato ( $\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $r_{\max}$  la velocidad de nitratación máxima,  $K_s$  es la constante de semisaturación y  $K_i$  es el coeficiente de inhibición para substrato de Haldane. Estos parámetros son los que se ajustan a partir de los valores de velocidad y de concentración de ion nitrito. El resultado obtenido es:

$$r_{\max} = 0,2572 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ mg}^{-1} \text{ SSV}^{-1} \text{ día}^{-1}$$

$$K_s = 1,762 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ l}^{-1}$$

$$K_i = 238,84 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ l}^{-1}$$



**Figura 5.35** Modelo de cinética de inhibición ajustado con los valores de OUR y la concentración de ion nitrito determinada con el método SIA.

En la figura 5.35 se muestra la velocidad de nitratación calculada y los resultados de las muestras analizadas, expresados en  $\text{mg N-NO}_2^- / \text{l}$ . El modelo predice una inhibición que ajusta satisfactoriamente a los resultados experimentales.

### 5.7.2. Respirometría

La respirometría se define como la medida y posterior interpretación del consumo biológico de oxígeno de una biomasa (respiración) bajo unas condiciones determinadas. Es una técnica muy utilizada para la determinación de parámetros cinéticos característicos de la biomasa. Es muy útil para la caracterización de aguas residuales, por ejemplo se aplica en la determinación de parámetros como la demanda biológica de oxígeno (DBO). Además permite determinar toxicidades tanto para microorganismos heterótrofos como nitrificantes entre otras aplicaciones. El uso de la respirometría supone una disminución del tiempo empleado por otras técnicas para cada una de estas aplicaciones.

El fundamento de esta técnica es la relación directa de la OUR con el consumo de sustrato y el crecimiento de la biomasa. La variación de la concentración de OD en el sistema depende del aporte de oxígeno y de su consumo por parte de la biomasa para su metabolismo endógeno, y para el consumo exógeno, es decir, para la oxidación del sustrato.

Existen diferentes tipos de respirometrías, dependiendo de dónde se realice la medida de OD (gas o líquido), y de si la fase líquida y la fase gas son estáticas. En este caso se ha utilizado un sistema LSS (*Liquid Static gas Static*), con la medida de oxígeno en el líquido, y con ambas fases estáticas [Guisasola et al., 2002].

Las muestras analizadas presentaban una concentración de ion nitrito en el intervalo comprendido entre 0,0-20,0 ppm. Esto ha permitido su determinación automática con el método desarrollado sin necesidad de dilución previa. Inicialmente las muestras son pasadas por un filtro de 0,45 micras. El experimento ha consistido en alimentar un reactor piloto de 2000 ml con un pulso de aproximadamente 16 ppm de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, y seguir la variación de oxígeno disuelto y la concentración de ion nitrito. La biomasa oxida el N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, y después el ion nitrito se acaba de oxidar a ion nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Durante el proceso de oxidación se ha seguido la evolución del oxígeno disuelto y se ha estimado su velocidad de consumo (OUR). En la figura 5.36 se muestra la variación de oxígeno disuelto y en la figura 5.37 la velocidad de consumo. Puede comprobarse que el OD es mínimo durante la oxidación del N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y que la velocidad de consumo es máxima. En base a esta velocidad es posible describir un modelo que explica la variación de todas las especies de N en el proceso de oxidación.

Pueden observarse tres zonas diferenciadas en la figura 5.36, la primera es antes del pulso de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el reactor y marca el consumo endógeno, la segunda es en la etapa de oxidación del ion amonio a ion nitrito, y la tercera la oxidación final de ion nitrito a ion nitrato.

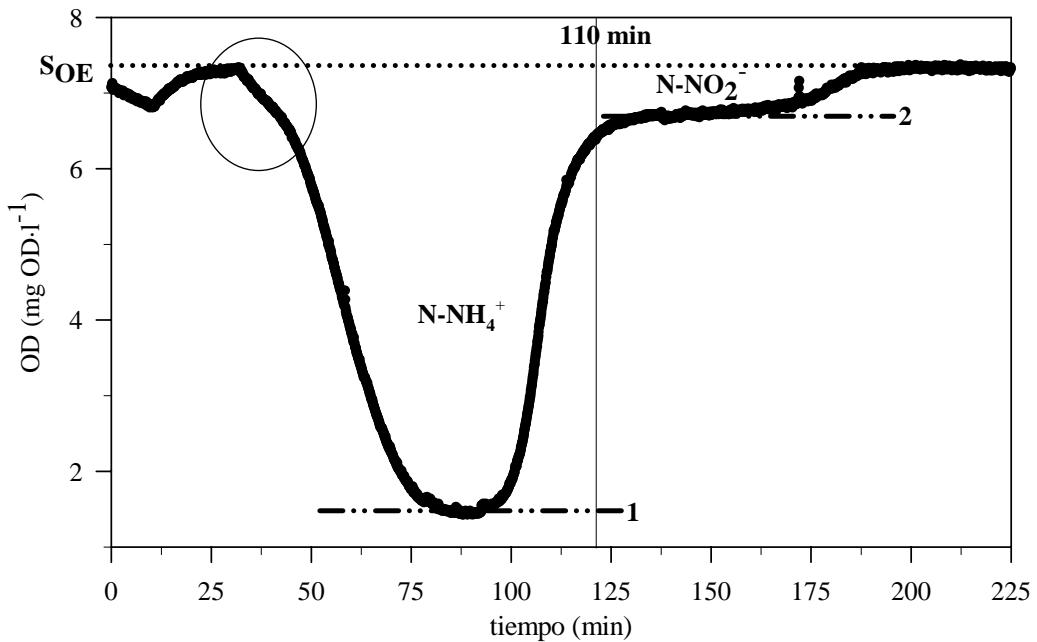


Figura 5.36 Evolución del oxígeno disuelto.

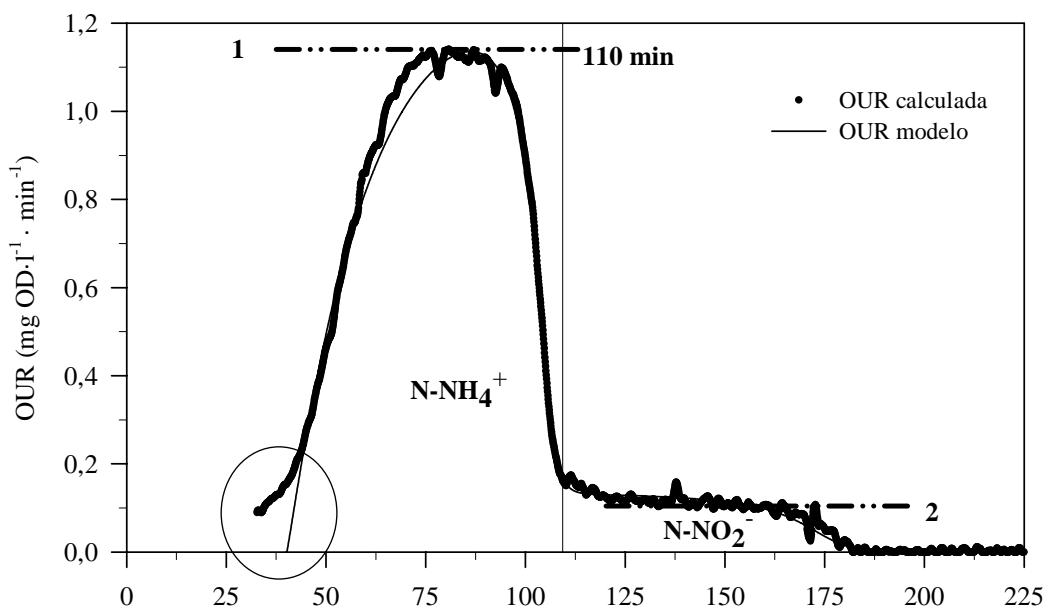
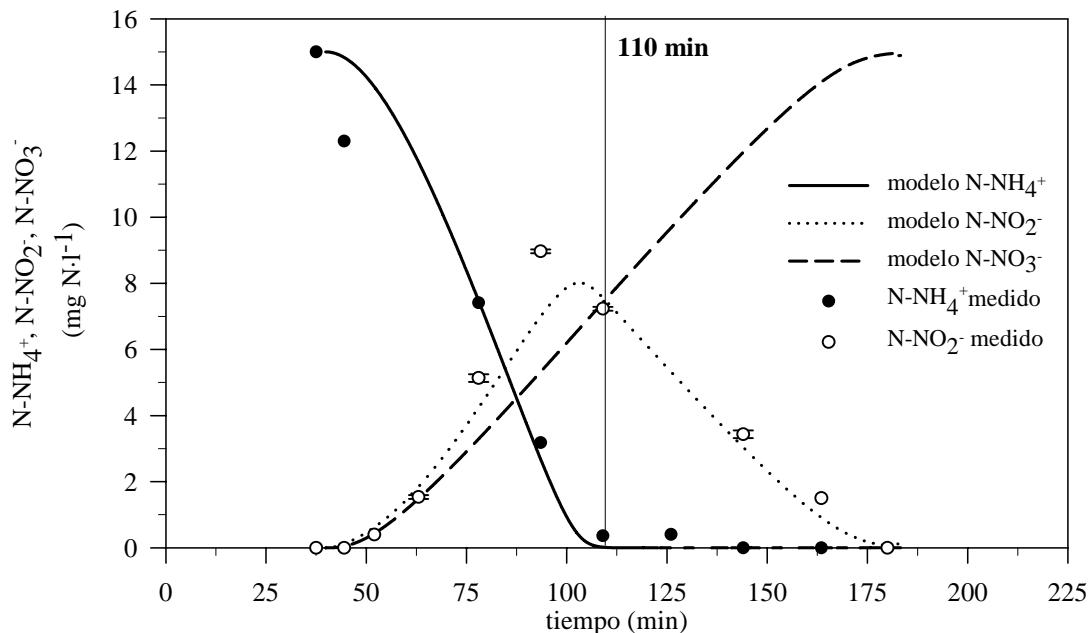


Figura 5.37 Velocidad de consumo de oxígeno, OUR.

En esta aplicación no se ha realizado el análisis de ion nitrito por electroforesis capilar, debido a la limitación que tiene para diferenciar concentraciones bajas de ion nitrito en presencia de otros iones. Por tanto la validación de los resultados obtenidos sólo se puede realizar por comparación con el modelo predicho a partir de la OUR. Como se puede comprobar en la figura 5.38 los resultados experimentales se ajustan al modelo estimado.



**Figura 5.38** Resultados obtenidos en la cinética de degradación de  $\text{N-NH}_4^+$ . El modelo predicho a partir de la OUR se ajusta a los valores experimentales de  $\text{N-NO}_2^-$ .

## 5.8 Conclusiones

En este capítulo ha quedado demostrada la viabilidad y capacidad operacional de los sistemas autoadaptativos de análisis basados en la técnica SIA. Se ha desarrollado un programa de control que ha permitido el análisis de ion nitrito en dos amplios intervalos de concentración. Comparada con su predecesora, la técnica FIA, la aportación más importante de la técnica SIA es básicamente instrumental gracias a su capacidad para alterar sus características de funcionamiento sin la necesidad de modificaciones físicas en el sistema de gestión de fluidos. Esta ventaja permite el diseño de sistemas autoadaptativos, lo que significa que el sistema puede autoadaptarse de un modo autónomo en función de la composición de la muestra para realizar el análisis siempre en las condiciones experimentales óptimas. Además, el sistema de gestión de fluidos desarrollado permite la implementación de cualquier metódica analítica sencilla con detección espectrofotométrica.

La versatilidad de la técnica SIA no solo permite el desarrollo de sistemas autoadaptativos, sino que facilita la implementación de un modo sencillo de variantes utilizadas en las técnicas de flujo convencionales, como por ejemplo la técnica *sandwich*. En la que dos interfases muestra reactivo pueden suministrar información química diferente. Este hecho abre otro amplio abanico de posibilidades.

Otra característica diferencial de este tipo de sistemas es la reducción de volúmenes de reactivo y muestra consumidos. Las ventajas que se derivan son importantes ya que permite una reducción drástica de la cantidad de residuos y la disminución del mantenimiento necesario lo que redunda en un aumento de la autonomía de los equipos. Así mismo, la drástica reducción de consumo favorece la tendencia actual hacia la integración y miniaturización de los sistemas de flujo.

La supervisión de procesos *on-line* es una de las aplicaciones de mayor futuro que presenta la técnica SIA. A pesar de todas las ventajas que aporta esta técnica en los sistemas de gestión de fluidos, todavía se ha de superar su principal limitación que es la necesidad de funcionamiento automático y la elaboración del *software* de control, problemas que otras metodologías de flujo no presentan con tanta rigurosidad.

## 5.9 Bibliografía

- Baxter, P.J., Christian, G.D.** “Sequential injection analysis a versatile technique for bioprocess monitoring”, *Accounts of Chemical Research*, **29**, 515-521 (1996).
- Binkley, D., Dassy, R.** “Data Manipulation and Handling”. *Journal of Chemical Education*. **56**, 148 (1979).
- Carrera, J.** “Eliminación biológica de nitrógeno en un efluente con alta carga. Estudio de los parámetros del proceso y diseño de una depuradora industrial”. **Tesis doctoral**. UAB (2001).
- Caulcutt, R., Boddy R.** “Statistics for analytical chemists”. E.d. Chapman and Hall, London-New York (1983).
- Cerdà, A.; Oms, M.T.; Forteza, R.; Cerdà, V.** “Total nitrogen determination by flow injection using on-line microwave-assisted digestion”, *Analytica Chimica Acta*, **351**, 273-279, (1997).
- Cerdà, A.; Oms, M.T.; Forteza, R.; Cerdà, V.** “Sequential injection sandwich technique for the simultaneous determination of nitrate and nitrite”, *Analytica Chimica Acta*, **371**, 63-71, (1998).
- Cladera, A., Tomas, C., Gomez, E., Estela, J.M., Cerdà, V.** “A new instrumental implementation of sequential injection analysis”, *Analytica Chimica Acta*, **302**, 297-308 (1995).
- Gabriel, D., Baeza, J., Valero, F., Lafuente, J.** “A novel FIA configuration for simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on N/D criteria”, *Analytica Chimica Acta*, **359**, 173-183 (1998).
- Guisasola A., Baeza, J.A. Carrera J., Lafuente, J.** “Descripción e implementación de las técnicas respirométricas en el tratamiento de las aguas residuales”, *Tecnología del agua*, **224**, 32-39, (2002).
- Guisasola A., Baeza, J.A. Carrera J., Casas C., Lafuente, J.** “An off-line respirometric procedure to determine inhibition and toxicity of biodegradable compounds in biomass from an industrial WWTP”, *Water Science & Technology*, **48** (11-12), 267-275, (2003).
- Lenehan, C. H.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W.** “Sequential injection analysis”, *Analyst*, **127**, 997-1020, (2002).

- Miller, J.C.; Miller, J.N.** “Estadística para química analítica.” 2<sup>a</sup> edición. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, (1993).
- Miró, M.; Cladera, A., Estela, J.M.; Cerdà, V.** “Sequential injection spectrophotometric analysis of nitrite in natural waters using an on-line solid-phase extraction and preconcentration method”, *Analyst*, **125**, 943-948, (2000).
- Motomizu, S.; Oshima, M.; Ma, L.** “On-site analysis for phosphorus and nitrogen in environmental water samples by flow-injection spectrophotometric method”, *Analytical Sciences*, **13**, 401-404, (1997).
- Oms, M.T., Cerda, A. & Cerda, V.** “Sequential injection analysis of nitrites and nitrates”, *Analytica Chimica Acta*, **315**, 321-330, (1995).
- Peris, M.; Ors, R.; Bonastre, A.; Gil, P.; Serrano, J.** “Advanced application of rule nets to the automation of chemical analysis systems”, *Analytica Chimica Acta*, **354**, 249-253, (1997).
- Rius, A., Callao, M.P., Rius, F.X.** “Self-configuration of sequential injection analytical systems”. *Analytica Chimica Acta*, **316**, 27-37, (1995).
- Ruisánchez, I; Lozano, J.; Larrechi, M.S.; Rius, F.X.; Zupan, J.** “On-line automated analytical signal diagnosis in sequential injection analysis systems using artificial neural networks”, *Analytica Chimica Acta*, **348**, 113-127, (1997).
- Ruzicka, J. , Marshall, J.D.** “Sequential injection : a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays”, *Analytica Chimica Acta*, **237**, 329-343 (1990).
- Skoog, D.A., Leary, J.** “Análisis Instrumental”, 4<sup>a</sup> ed, Ed. McGraw-Hill, Madrid (1994).
- van Staden, J.F.; van der Merwe, T.A.** “On-line monitoring of nitrite in fertilizar process streams, natural and waste water effluents with sequential injection analysis”, *Mikrochimica Acta*, **129**, 33-39, (1998).

**SIA de ion cadmio**



# Capítulo 6

---

## *Desarrollo de un sistema SIA de alta sensibilidad para la determinación de ion cadmio, con etapa de preconcentración en línea*

---

### 6.1 Introducción

Las técnicas de inyección en flujo gracias a su simplicidad y versatilidad han sido ampliamente utilizadas en la automatización de numerosos procedimientos analíticos. Uno de los factores clave que explican su rápida implantación es la posibilidad de integrar un elevado número de métodos de detección tanto ópticos como electroquímicos. Así se han incorporado detectores basados en medidas espectrofotométricas (UV/vis/NIR), de absorción atómica, de fotometría de llama, amperométricas, conductimétricas y potenciométricas, entre muchas otras.

La integración de detectores potenciométricos en sistemas de flujo continuo fue explorada ya en los inicios de la técnica FIA por Ruzicka et al. [1977], Ruzicka y Hansen [1978], Hansen et al. [1977], Pungor et al. [1976] y Fehér et al. [1978]. Esos trabajos llevaron al desarrollo de una nueva técnica que denominaron “*Flow Injection Potentiometry (FIP)*”.

Según la definición de la IUPAC [1994], los electrodos selectivos de iones (ESI) son sensores electroquímicos cuyo potencial depende linealmente del logaritmo de la actividad de un ion en solución, y están basados en filmes finos o membranas selectivas como

elementos de reconocimiento. Los electrodos selectivos de iones funcionan como detectores de superficie y, debido a la naturaleza del proceso electroquímico interfacial generador de la señal, resultan muy atractivos para su aplicación en sistemas de gestión de fluidos [Valcárcel y Luque de Castro, 1987]. Se ha de resaltar que la simplicidad de la instrumentación asociada los hace especialmente indicados para el control analítico de procesos. Adicionalmente, son de fácil construcción, sus medidas no se ven afectadas por el color o turbidez de la muestra, y no necesitan la adición de un reactivo específico para la generación de la señal, como ocurre muchas veces en los métodos espectrofotométricos.

Los requisitos exigibles a los electrodos para viabilizar su utilización en sistemas de flujo son, entre otros, una rápida velocidad de respuesta, mínimo ruido eléctrico, repetitividad en la respuesta, compatibilidad con el resto de elementos y, facilidad de integración.

La inserción de este tipo de detectores en sistemas de análisis en flujo mejora sus características operacionales, presentando por eso, numerosas ventajas frente a su utilización siguiendo las técnicas potenciométricas convencionales [Frenzel, 1988; Couto y Montenegro, 2000]. Destacan como ventajas la posibilidad de trabajar de forma reproducible con pequeños volúmenes de muestra, el incremento de la reproducibilidad de la señal analítica, la disminución del tiempo de análisis y el acondicionamiento continuo de la membrana sensora. También permite minimizar el problema de la deriva del potencial, mejorar la selectividad analítica, eliminar la contaminación debida al electrodo de referencia, simplificar el pretratamiento de la muestra, que puede ser realizado en línea, reducir el consumo de reactivos y automatizar con facilidad métodos analíticos [Alegret et al., 1985].

Teniendo en cuenta las ventajas mencionadas anteriormente, la técnica FIP ha tenido un gran desarrollo en las últimas décadas, lo que ha llevado al diseño de nuevos tipos de sensores potenciométricos, nuevos procesos de construcción y diferentes tipos de acoplamiento en sistemas de flujo. Resultado de todo ello, la potenciometría ha recibido un notable impulso como herramienta analítica útil para resolver problemas reales dentro de la Química Analítica. La aplicabilidad de los detectores potenciométricos es prácticamente ilimitada y su grado de implementación tan importante que en este momento existen más de 300 publicaciones al respecto [Couto y Montenegro, 2000].

Las mejora de las características operacionales de los sensores potenciométricos que reporta su integración en sistemas de flujo (FIP) viene acompañada también por una mejora de las características operacionales de los sistemas de inyección en flujo continuo. Estas ventajas pueden extrapolarse a la técnica de análisis por inyección secuencial (SIA) propuesta por Ruzicka y Marshall en 1990 [1990] y que tiene como principal característica

la posibilidad de invertir el sentido del flujo. Estos sistemas presentan una gran ventaja, en relación a los sistemas FIA, ya que cualquier alteración que se desee realizar en el sistema (volumen de inyección, tiempo de reacción, dilución de la muestra o reactivos) puede efectuarse sin reconfiguración física del sistema mediante el software de control. En estos sistemas, de momento, la detección potenciométrica ha sido poco aplicada. Así, se ha descrito un sistema para la determinación simultánea de iones cloruro y fluoruro en aguas [Alpizar et al., 1996a], cloruro y pH en aguas residuales [Alpizar et al., 1996b] y, glicerol y 2,3-butanodiol en vino [Luca et al., 1998]. Recientemente la detección potenciométrica ha sido aplicada también en el análisis de compuestos farmacéuticos. Ejemplos son la determinación de ácido acetilsalicílico, mediante la detección potenciométrica de salicilato [Pasekova et al., 2001], y la determinación de captopril mediante valoración potenciométrica con Ag (I) [Pimenta et al., 2001]. También se ha determinado fluoruro en pasta de dientes y vitamina B6 [Lenehan et al., 2002]. Aparte de estas aplicaciones concretas, la potenciometría no tiene un uso muy extendido como sistema de detección en la técnica SIA.

A medida que las determinaciones potenciométricas se han ido imponiendo como metodología analítica de detección en sistemas de flujo continuo, se ha registrado un aumento de las soluciones propuestas para resolver cada vez problemas más específicos. La selectividad, es, muchas veces, una de las mayores limitaciones de la potenciometría. Dotar de mejores características operacionales a estos detectores, implica la necesidad de introducir etapas de separación, modificación de matriz o conversión de la especie a determinar, mediante procesos de extracción, difusión de gases, diálisis, inserción de columnas de preconcentración o reactores empaquetados.

La flexibilidad de los sistemas SIA facilita la integración de diferentes etapas de separación o preconcentración en línea, y permite la determinación de analitos en concentraciones particularmente bajas. Una aplicación de gran interés es la determinación de metales pesados en concentraciones inferiores al límite de respuesta de los detectores. Para alcanzar este objetivo son útiles los procesos de concentración en línea mediante resinas de intercambio iónico [Rubí et al., 1996]. Su principio se basa en la retención en una columna miniaturizada del analito presente en un volumen relativamente grande de muestra, seguido de una elución con un volumen pequeño de solución, e impulsión final hacia el detector.

La integración de columnas de preconcentración confiere al sistema, por tanto, de una mayor selectividad y mejora el límite de detección aparente. Para alcanzar estos objetivos se han desarrollado diferentes aplicaciones basadas en la técnica SIA, por ejemplo la determinación de ion amonio con etapa de separación en línea mediante celda de difusión

de gases y detección conductimétrica [Oms et al., 1996], la determinación de Fe (III) mediante preconcentración en línea con una microcolumna de intercambio iónico Chelex 100 y detección espectrofotométrica UV/vis [Rubí et al., 1996] o absorción atómica [Rubí et al., 1997], o la preconcentración de Cu (II) usando dietilditiocarbamato de sodio en un soporte polimérico [Marshall y van Staden, 1997], la determinación de Pb en aguas naturales con preconcentración mediante poli(vinilpirrolideno) y detección con absorción atómica de llama (AAS) [Araújo et al.; 1999] o la determinación de Ni (II) con una microcolumna de intercambio iónico y detección por espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ETAAS), [Wang y Hansen, 2001].

Las diferentes estrategias descritas proponen soluciones técnicas para resolver los problemas existentes basadas tanto en alteraciones en el diseño de los sistemas de flujo como en la incorporación de diferentes etapas de tratamiento de muestras en línea. A pesar de que por esta vía se han conseguido encontrar soluciones para muchos de los problemas analíticos planteados, todavía existen algunas limitaciones inherentes al principio en que se fundamenta la detección potenciométrica. Así, una limitación muy importante es la reducida sensibilidad analítica de las medidas potenciométricas, especialmente cuando se aplica a especies di y trivalentes. Con el objetivo de resolver estas limitaciones se han propuesto algunas soluciones aplicables en los sistemas potenciométricos convencionales. Una de ellas se basa en el método denominado *cells connected in series* (CCS), que consiste en la colocación de un número variable de células electroquímicas en serie [Stepak, 1983; Parczewski y Stepak, 1983] cada una constituida por un electrodo indicador convencional y un electrodo de referencia. También se ha experimentado la suma de dos electrodos convencionales frente a un mismo electrodo de referencia [Parczewski, 1987; Parczewski, 1988] y, como variante de ésta, se han utilizado electrodos con dos membranas incorporadas en el mismo cuerpo de electrodo de configuración convencional [Lapa et al., 1997]. El potencial referente a cada membrana (relativa al electrodo de referencia) se suma por medio de un dispositivo electrónico externo. El desarrollo de electrodos con geometrías más apropiadas y con acoplamientos que proporcionaban montajes mecánicamente más estables, ha permitido abrir un nuevo camino en busca de sistemas FIP de sensibilidad mejorada. Los detectores potenciométricos de configuración tubular son especialmente prácticos en la resolución de este tipo de problemas, debido a que no provocan alteraciones de las características hidrodinámicas del bolo de muestra a su paso por el sistema de detección y abren la posibilidad de colocar más de una membrana sensora en un espacio relativamente corto. El objetivo de estos sistemas ha sido obtener un aumento de señal analítica con elementos de gestión de fluidos sencillos e instrumentación simple; sin que eso provoque una disminución de la relación señal ruido. Para conseguir este objetivo se ha recurrido a aplicar técnicas de medida diferencial. Aunque se han

descrito algunos sistemas FIA de este tipo, no se ha encontrado ninguna aplicación en sistemas SIA [Couto, 1999].

El cadmio es un metal pesado que aparece normalmente en la naturaleza asociado al zinc. Este elemento fue descubierto en 1817, pero su utilidad en procesos industriales ha sido reconocida hace sólo 50 años. Entre sus características principales destacan su elevada resistencia a procesos corrosivos y sus propiedades electroquímicas. Desde entonces, ha sido utilizado básicamente en procesos de galvanización o electrodeposición, como pigmento para tintas y plásticos y como material catódico para la fabricación de baterías de níquel-cadmio [Rodier, 1997].

El cadmio (II) es una especie química de gran toxicidad, con manifestaciones orgánicas, desde agudas a crónicas. El efecto crónico se debe a su acumulación tanto a nivel hepático como renal. Debido su toxicidad, genera enfermedad pulmonar obstructiva y enfisema, insuficiencia renal, interferencia en el metabolismo del calcio, lo que provoca alteraciones óseas, y también efectos cardiovasculares, particularmente hipertensión arterial [Klaassen, 1996]. Además, tiene un tiempo de vida medio biológico grande, de 10 a 30 años, y un reconocido efecto cancerígeno [Goodman y Giman's, 1996].

La presencia de cadmio en aguas tiene su origen habitualmente en las lluvias, en los efluentes industriales, particularmente en los que provienen de galvanoplastias, o eventualmente de la disolución de ciertas canalizaciones galvanizadas o plastificadas [Rodier, 1997]. El análisis de ion cadmio en aguas residuales y aguas de consumo tiene mucha importancia tanto desde el punto de vista medioambiental como de salud. Los metales pesados presentan una alta toxicidad y en concentraciones muy bajas pueden afectar al sistema respiratorio y, también al renal. El límite legal para aguas de consumo es 0,005 ppm [www.epa.gov; REAL DECRETO 140/2003]. Actualmente existe una demanda creciente de métodos que permitan determinar niveles de concentración muy bajos y metodologías que aporten selectividad junto con resultados fiables [Couto, 1999].

La determinación cuantitativa de este elemento ha sido efectuada mayoritariamente por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) [Baccan et al., 1996] debido a los límites de detección alcanzados por esta técnica, siendo esta la base de los métodos de referencia establecidos como el método estándar de análisis en aguas y aguas residuales [APHA-AWWA-WEF, 1999].

La potenciometría, a pesar de no tener límites de detección tan bajos como EAA, ofrece considerables ventajas. En particular, el bajo coste, la simplicidad del equipo y la facilidad de instalación y de operación de sus sistemas. A pesar de esto, son pocas las referencias sobre determinación potenciométrica convencional de este metal. Ito et al. [1997] se refiere

a la utilización de electrodos de configuración convencional sensibles a Cd (II) con un límite de detección del orden de  $1 \cdot 10^{-8}$  M, siendo utilizada una solución enmascarante de salicilaldoxima, que permitía reducir sustancialmente la interferencia provocada por los cationes Cu(II), Pb(II), Fe(III), Ag(I) y Hg(II). Estos electrodos tenían el inconveniente de poseer solución interna de referencia, y no se conocían sus características de respuesta cuando eran incorporados en sistemas FIP. Han sido propuestas otras alternativas basadas en la detección potenciométrica, utilizando valoraciones convencionales [Gangaiah y Naidu, 1988; Motonaka et al., 1984; Buchberger et al., 1991] y el método de la adición estándar [Lin et al., 1987]. Con el objeto de eliminar interferencias de la matriz de la muestra son necesarias etapas de separación/preconcentración, basadas en la extracción líquido-líquido con una solución de ditizona en cloroformo [Gangaiah y Nadiu, 1988] o cromatografía de intercambio iónico [Buchberger et al., 1991], o también doble titulación sobre la misma muestra [Motonaka et al., 1984]. Los sistemas convencionales referidos permitían la determinación de Cd (II) para concentraciones justo superiores al límite inferior de respuesta de los electrodos, además los tiempos de análisis eran largos y los procedimientos complejos.

Por otro lado, las metodologías analíticas basadas en sistemas de análisis en flujo, permiten tanto aumentar la frecuencia de muestreo como mejorar las condiciones operacionales de los diferentes detectores, particularmente en lo que respecta a su selectividad analítica. Algunos de los procedimientos analíticos basados en sistemas FIA incluyen, con frecuencia, pasos de separación y preconcentración que sirven para separar el analito de componentes potencialmente interferentes, y también para concentrar a niveles que permitan su determinación. [Couto, 1999]. Estos sistemas de preconcentración en línea presentan numerosas ventajas comparados con los procesos de preconcentración convencionales [Porta et al., 1989]. Así, cabría destacar el bajo consumo de muestra (10-100 ml, en relación a 500-1000 ml en *batch*), la rapidez del proceso (5-25 muestras·h<sup>-1</sup>), y la minimización de contaminaciones ya que la etapa de concentración se realiza en circuito cerrado, en el interior del sistema de flujo.

Son varios los sistemas de flujo que describen la utilización de EAA como sistema de detección, a veces asociada a ICP [Hashemi y Olin, 1997] con generación de hidruros [Infante et al., 1996], aplicando sistemas de concentración con resinas quelantes [Fang et al., 1984; Hashemi y Olin, 1997; Greenway et al., 1996; Liu e Ingle, 1989a, 1989b], procesos de intercambio iónico [Wang y Hansen, 2000], procesos de precipitación/concentración [Chen et al., 1997] o preconcentración electroquímica [Bulksa et al., 1997].

A pesar de las ventajas antes expuestas sobre el uso de la detección potenciométrica, la selectividad limitada de los electrodos selectivos a iones de membrana cristalina sensible a

Cd (II), especialmente en relación a Cu (II) y Pb (II), es probablemente la razón principal de la escasa aplicación analítica de éstos [Trojanowicz et al., 1998]. La mejora de la selectividad puede ser conseguida mediante el uso de disoluciones ajustadoras de pH y enmascarantes capaces de eliminar las interferencias presentes en la muestra [Ito et al., 1997; Trojanowicz et al., 1998], o bien con etapas de separación /preconcentración en línea, por ejemplo mediante la formación de complejos. Dado que las reacciones de complejación son normalmente muy selectivas, la combinación de la complejación con el intercambio iónico permite la separación de cationes con propiedades químicas similares [Minczewski et al., 1976]. La formación de complejos aniónicos de cationes ofrece además la posibilidad de separar diferentes cationes por medio de intercambiadores aniónicos. Por esta razón, algunas separaciones de iones metálicos han sido realizadas usando resinas aniónicas, que retenían complejos aniónicos de metales [Vandecasteele y Block, 1984]. La formación de clorocomplejos de metales cargados negativamente, del tipo  $[MX_4]^{2-}$ , que pueden ser retenidos en resinas aniónicas, ha sido poco explorada. Como técnicas de detección final se han descrito la espectrofotometría UV/vis [Ferreira et al., 1990; Neto et al., 1995a, 1995b; Hayashibe y Sayama, 1996], la espectrofotometría de absorción y emisión atómica [Liu e Ingle, 1989a; Tao et al., 1994], la quimioluminiscencia [Burguera et al., 1981] y la potenciometría [Couto et al., 1998]. Los trabajos referenciados recurrieron a la formación de clorocomplejos [Ferreira et al., 1990; Neto et al., 1995a, 1995b; Burguesa et al., 1981, Couto et al., 1998], bromocomplejos [Tao et al., 1994] y yodocomplejos [Hayashibe y Sayama, 1996] del metal, como paso previo para conseguir la separación de los interferentes mediante el uso en resinas intercambiadoras aniónicas.

La determinación de cadmio basada en sistemas de flujo continuo es muy amplia, pero son contadas las aplicaciones donde se utiliza la técnica SIA. Hasta el momento existen solo cuatro aplicaciones, basadas en esta técnica para la determinación de Cd (II) [[www.fia.com](http://www.fia.com)], y en ninguna de ellas se utiliza la detección potenciométrica. Tres de estas aplicaciones están basadas en la espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica (EAAS) y una en la voltamperometría de redissolución anódica [da Silva et al., 2000]. Las que utilizan la EAAS necesitan de una etapa previa de preconcentración antes de la detección. En un caso, se utilizó un columna de C18 [Xu et al., 2000], en otro, una columna empaquetada [Wang y Hansen, 2002 a] y en el último, una extracción on-line [Wang y Hansen, 2002 b].

Las características inherentes a la detección potenciométrica, cuando es usada en sistemas de flujo (§ 1.7), permiten eliminar el efecto de Schlieren [Bettridge et al., 1978], frecuente en sistemas con detección espectrofotométrica [Ferreira et al., 1990; Hayashibe y Samaya, 1996; Gomes Neto et al., 1995a, 1995b], particularmente en sistemas con etapa de preconcentración en línea y evita la necesidad de añadir ciclos de lavado entre las

diferentes muestras [Fang, 1993]. Adicionalmente, los sistemas de detección potenciométrica de sensibilidad aumentada integrados en sistema de gestión de fluidos con una etapa de separación/preconcentración en línea, permiten trabajar en zonas de concentración mucho más bajas, aprovechar la zona de respuesta no lineal de los detectores, y mejorar el LIRL respecto a las unidades convencionales [Ferreira, 1994].

Teniendo en cuenta todas las ventajas enumeradas se ha desarrollado un sistema de gestión de fluidos basado en la metodología SIA para la determinación de Cd (II) en aguas, mediante detección potenciométrica. Con el objeto de aumentar la selectividad y mejorar el límite de detección del electrodo, ha sido integrada una etapa de preconcentración en línea. El Cd (II) ha sido retenido en forma de clorocomplejo por una resina de intercambio aniónico y determinado después en forma de Cd (II) libre mediante un electrodo tubular de membrana cristalina de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{CdS}$  [Ferreira y Lima, 1994]. Se han estudiado dos modos de detección distintos, la medida del electrodo indicador tubular frente a un electrodo de referencia convencional, modo de detección normal, y la medida del electrodo tubular frente a un segundo electrodo tubular de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{CdS}$  como referencia, modo de detección diferencial [Couto et al., 1997]. La flexibilidad del sistema ha quedado demostrada mediante el desarrollo de cuatro aplicaciones diferentes conseguidas con mínimos cambios físicos en el sistema de gestión de fluidos y, mediante el control de tiempo en el funcionamiento de los distintos elementos. Los procedimientos con dos modos de detección han sido optimizados para realizar determinaciones con y sin etapa de preconcentración en línea.

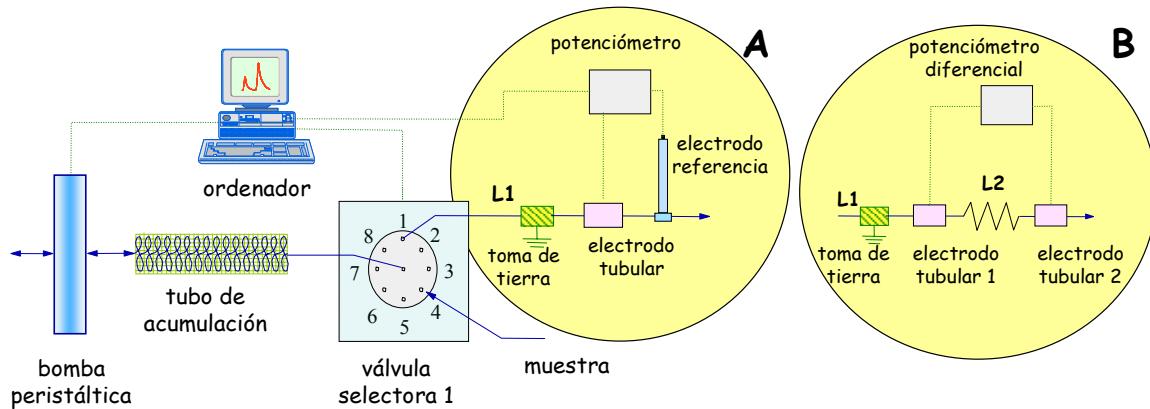
## 6.2 Descripción del sistema SIA

A continuación se detallan las características de los equipos, materiales y elementos utilizados en la implementación de los dos sistemas SIA sin y con etapa de concentración en línea. En ambos sistemas han sido utilizadas las dos variantes de detección potenciométrica estudiadas en esta parte del trabajo. El modo de detección normal (MDN) utilizando como electrodo indicador un electrodo tubular de membrana cristalina y un electrodo de referencia convencional y, el modo de detección diferencial (MDD) utilizando un segundo electrodo tubular como electrodo de referencia.

### 6.2.1 Instrumentación

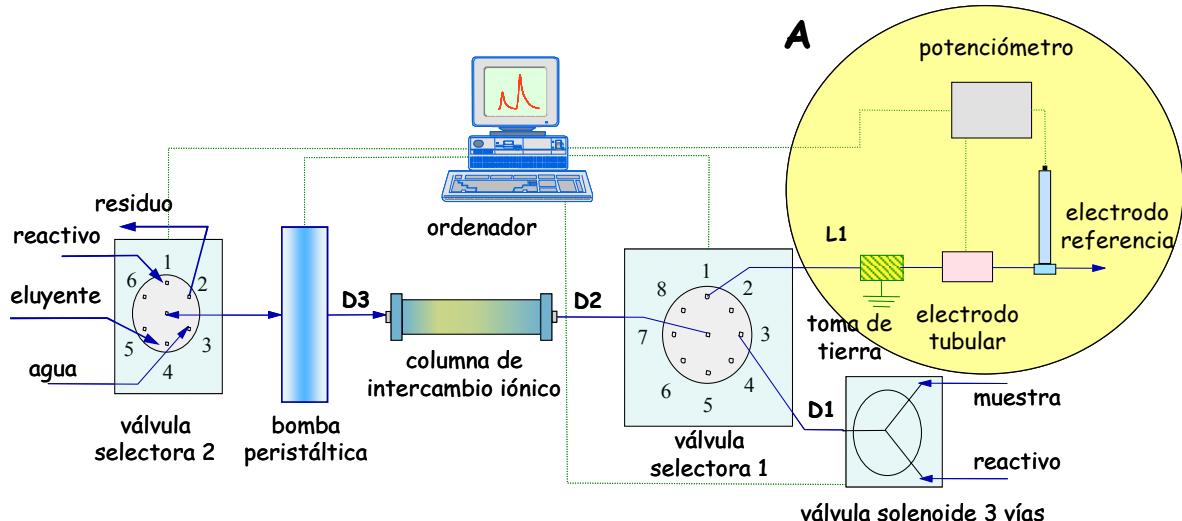
El sistema básico de gestión de fluidos sin etapa de preconcentración está constituido por un sistema de impulsión, una válvula selectora de 8 vías, una válvula solenoide de tres vías, un potenciómetro, un ordenador y un registrador. El sistema con etapa de preconcentración *on-line* es análogo al anterior, pero tiene una válvula selectora de 6 vías

adicional que permite la gestión de fluidos en la etapa de preconcentración y elución. En ambos sistemas han sido implementados los dos modos de detección. Con el objeto de simplificar la descripción y evitar repeticiones innecesarias, serán enumerados todos los elementos de modo global sin detallar a cuál de los cuatro sistemas pertenece. En la figura 6.1 se detalla el esquema básico del sistema SIA con detección normal (A) y detección diferencial (B) sin etapa de preconcentración.



**Figura 6.1.** Sistema SIA para determinación de Cd (II). (A) Modo de detección normal, (B) modo de detección diferencial.

En la figura 6.2 se muestra el sistema con etapa de preconcentración en línea y el modo de detección normal; el sistema con detección diferencial es análogo a éste, pero utilizando el sistema de detección de la figura 6.1 B.



**Figura 6.2.** Sistema SIA para determinación de Cd (II) con etapa de preconcentración en línea, con el modo de detección normal. El modo de detección diferencial es análogo al de la figura 1-B.

Las características de los distintos elementos que constituyen ambos sistemas se enumeran a continuación:

- **Bomba peristáltica:** bomba peristáltica Minipuls 3 equipada con tubo de PVC de Elkay con referencia 116-0549-100 de diámetro externo 1,143 mm.

- *Válvula selectora 8 vías*: VICI C15-3118EMH 8 de VICI AG, Valco Europe, Switzerland.
- *Válvula selectora 6 vías*: válvula MVP de Hamilton con cabezal de 6 vías, referencia HVXM R36760.
- *Válvula solenoide 3 vías*: electroválvula de 3 vías de 12 Vcc Code N10530 de Bioblock Scientific.
- *Tubo de acumulación*: tubos de PTFE de Tecator de 0,8 mm de diámetro interno, 1,5 de diámetro externo y 250 cm de longitud.
- *Tubos de entrada/salida para la válvula selectora de 8 vías y conexiones entre los elementos del sistema*: tubo de PTFE de Tecator de 0,8 mm de diámetro interno y 6 cm de longitud.
- *Potenciómetros*: en el sistema con electrodo de referencia (figura 1 a) un potenciómetro Crison digilab 517 (sensibilidad  $\pm 0,1$  mV) y en el sistema con detección diferencial, un potenciómetro diferencial desarrollado por el Grupo de Sensores de la Universitat de Vic.
- *Registrador*: Methrom E586 Labograph utilizado en la adquisición de la señal analítica
- *Sistema de control*: los sistemas implementados son controlados por un ordenador 286 usando un programa desarrollado en Quick Basic 4.5 (apéndice 9.3) que controlaba el tiempo, velocidad y dirección de rotación de la bomba peristáltica, el tiempo de oscilación de la válvula solenoide y la posición de la válvula selectora de 8 vías. Los diferentes elementos se comunican a través de una placa A/D, PCL-812-PG. Los distintos procedimientos de análisis utilizados se muestran detallados en el apartado 6.2.5.
- *Electrodo de referencia*: de Ag/AgCl de doble unión líquida, modelo 90-00-02, de Orion. El compartimiento interno se llena con una disolución de KCl saturada de AgCl suministrada por Orion y, el externo, con  $\text{KNO}_3$  0,1 M (figura 1A). El fondo iónico de esta disolución es idéntico al de las disoluciones patrón y la disolución portadora del sistema. En el sistema con detección diferencial, se utiliza un segundo electrodo tubular sensible a cadmio (figura 1b).
- *Electrodos tubulares*: electrodos de membrana cristalina  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{CdS}$  sensibles a ion cadmio.
- *Conexiones entre elementos*: la unión entre los distintos componentes se realiza mediante conectores y para asegurar la estanqueidad de las conexiones se utilizan juntas tóricas de Viton (Epidor S.A.), de diámetro interno 1,78 mm.

## 6.2.2 Construcción de electrodos tubulares selectivos a ion cadmio

A continuación se detalla la metodología aplicada en la elaboración de la membrana sensora y el posterior proceso de construcción de los electrodos tubulares que se ha realizado de dos modos distintos. No se han observado diferencias entre electrodos atribuibles a las distintas estrategias de construcción.

### 6.2.2.1 Preparación de la membrana sensora

La membrana sensora está constituida por una mezcla de sulfuro de cadmio y sulfuro de plata en proporción molar 1:10. El proceso de obtención de la mezcla sensora ha sido semejante al realizado por Ruzicka [1973]. Consiste en la preparación de soluciones de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  de concentración aproximadamente 0,1M. Se titularon las tres soluciones, utilizándose como electrodo indicador un electrodo convencional de membrana cristalina de  $\text{Ag}_2\text{S}$ , siendo así posible conocer las equivalencias en volúmenes de las soluciones preparadas. Se mezclaron volúmenes adecuados de las soluciones de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{AgNO}_3$  para obtener una relación molar de 1:20. Esta solución se adiciona muy lentamente y con agitación alta, a un volumen de  $\text{Na}_2\text{S}$  con 20% de anión sulfuro en exceso, para asegurar la precipitación completa de los cationes presentes en la primera solución. El precipitado se deja en agitación durante 15 minutos.

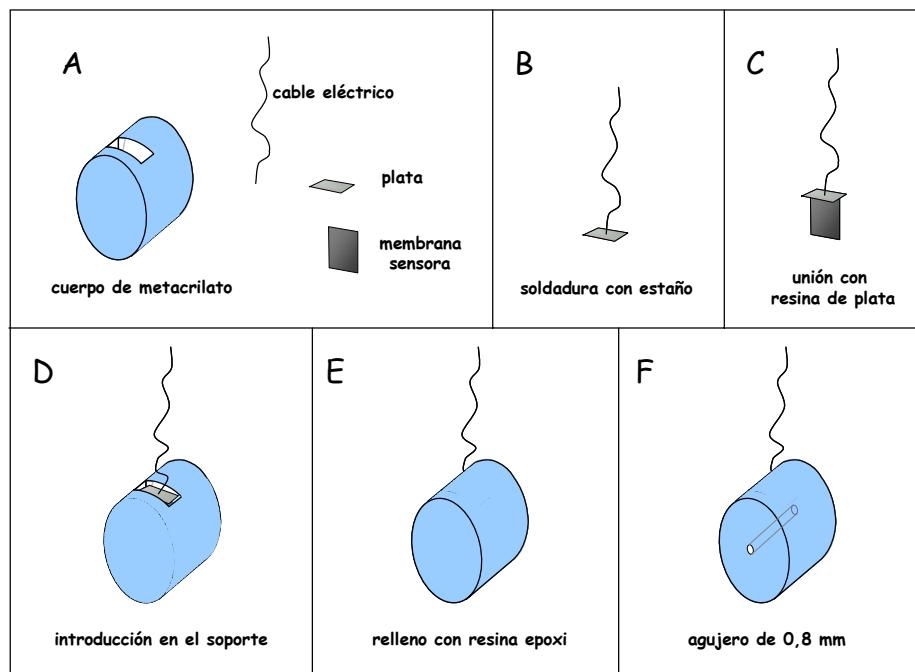
Después de un tiempo de reposo y la decantación del líquido sobrenadante, se realiza el lavado del precipitado varias veces con agua desionizada y se filtra con un embudo Buckner. El sólido obtenido se seca en la estufa entre 80/100 °C durante 24 horas. Finalmente, se pulveriza en un mortero de ágata, y se conserva protegido de la luz en un desecador con gel de sílica.

Para la obtención final de la membrana sensora se utilizó la técnica de prensado para aglutinar el sólido sensor. Las membranas sensoras fueron obtenidas por prensado de 0,25g de precipitado mixto a una presión de 15.000  $\text{Kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ . En estas condiciones y con el pastillador usado, se obtuvieron pastillas de 10 mm de diámetro y un grosor de 0,4 mm.

### 6.2.2.2 Proceso de construcción de los electrodos selectivos de configuración tubular

Los electrodos tubulares han sido construidos con dos estrategias distintas. La primera de ella está basada en la unión de la membrana sensora a una placa de plata que a su vez está soldada a un cable eléctrico. La segunda consiste en la unión directa de la membrana a un conector eléctrico. En ambos casos, la membrana se coloca después en un soporte de forma circular y todo el conjunto es aislado por medio de resina epoxídica. A continuación se

detallan los dos procedimientos de construcción utilizados. El primer procedimiento [Couto, 1997] de construcción se muestra en la figura 6.3.

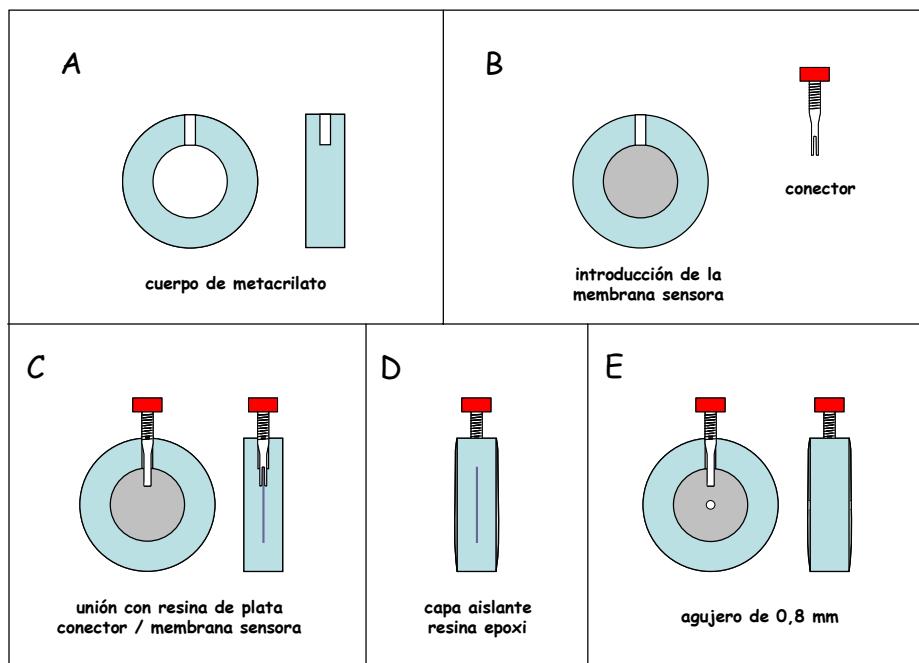


**Figura 6.3.** Etapas del primer procedimiento de construcción de los electrodos tubulares de membrana cristalina homogénea de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{CdS}$  sensible a cadmio.

Los elementos que constituyen el electrodo tubular son: un cuerpo de metacrilato, un cable eléctrico, una lámina de plata y la membrana sensora (A). El conductor interno es un cable eléctrico blindado que se fija a una lámina rectangular de plata, aproximadamente  $1,5 \times 3,0$  mm, con soldadura de estaño (B). A esta lámina se pega con resina epoxídica conductora a base de plata, un fragmento de la membrana sensora, con una dimensión de aproximadamente  $3 \times 3$  mm (C). El conjunto es alojado en una cavidad paralelepípeda ( $3,0 \times 4,5 \times 7,5$  mm) de un pequeño cilindro de metacrilato de  $1\text{cm} \times 7\text{mm}$  (D) y fijado mediante una resina epoxídica no conductora a la base de metacrilato (E). Una vez endurecida la resina no conductora, se perforó el electrodo, en sentido perpendicular a las dos caras opuestas del cilindro (E), atravesando la membrana sensora con un agujero de 0,8 mm (F). Los curados de ambas resinas se realizaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

En el segundo procedimiento [Barquero, 2001], el electrodo tubular esta formado por un cuerpo cilíndrico de metacrilato de 0,8 cm de longitud por 0,5 cm de diámetro donde se introduce un fragmento de la membrana sensora (figura 6.4 A-B). El conector se introduce de forma que la membrana quede atrapada entre las pequeñas patas (C) de éste. El punto de contacto entre el conector y disco se asegura mediante resina conductora de plata (C). En el siguiente paso (E) se acaba de llenar el cuerpo con resina epoxídica no conductora,

primero un lado y después el otro, curando en la estufa a 40 °C durante 24 horas. La última etapa es la perforación longitudinal, y perpendicular a las dos caras, de 0,8 mm.



**Figura 6.4.** Etapas del segundo procedimiento de construcción de los electrodos tubulares de membrana cristalina homogénea de  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{CdS}$  sensible a cadmio.

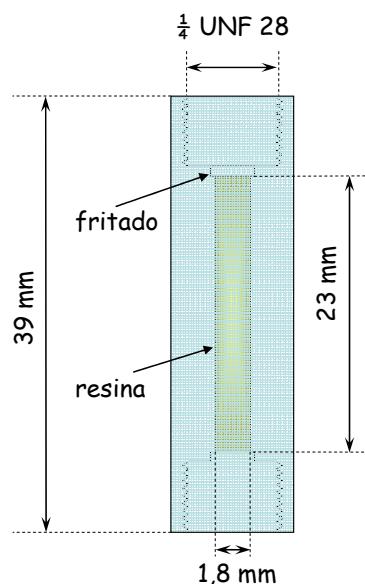
Después de la construcción y antes de su uso, la membrana sensora es pulida con un hilo de algodón humedecido e impregnado de óxido de aluminio (Buehler 40-6603-030-016). Los electrodos son acondicionados durante una hora con una solución de cadmio  $1 \cdot 10^{-3}$  M. Entre ensayos los electrodos se conservaban en solución de  $\text{KNO}_3$  0,1 M o al aire. Cuando no se utilizan durante períodos prolongados, se conservaban envueltos en papel de aluminio. Durante su uso normal, los electrodos eran nuevamente pulidos cuando disminuía la reproducibilidad y estabilidad de la señal. Esto es debido a procesos de oxidación en la membrana. Estos pulidos posteriores se realizaban en dos etapas. En la primera se utiliza papel de lija número 600 y, en la segunda, papel de alúmina de  $3\mu\text{m}$  suministrado por ORION (ref. 301044-001). Después los electrodos eran nuevamente acondicionados durante una hora antes de su uso con la misma solución acondicionadora.

### 6.2.3 Columnas de preconcentración

En base a la experiencia del grupo en la integración de etapas de preconcentración en sistemas de flujo, se construyen columnas de metacrilato con el diseño que se muestra en la figura 6.5. Las columnas tienen una longitud de 23,0 mm de longitud y un diámetro interno de 1,85 mm. Al diseñar la columna se pretendió minimizar la dispersión de la muestra y la sobrepresión que origina el empaquetamiento del material adsorbente. Se ha

evaluado la influencia de la longitud de la columna en el proceso de preconcentración ya que fija la cantidad de resina utilizable y por tanto la posibilidad de alcanzar el límite de detección requerido. En el § 6.5.3 se discute de forma más detallada la optimización de la etapa de preconcentración en línea.

Las columnas se preparan por empaquetado de una resina de intercambio iónico AG<sup>®</sup>1-X8, constituida por grupos funcionales de amonio cuaternario enlazados a un red formada por un co-polímero (divinilbenceno estireno) y suministrada por Bio-Rad (AG<sup>®</sup>1-X8, 200-400 mesh, 45-106 mm, en forma de cloruro). La columna se llena por aspiración de una suspensión de resina en agua desionizada [C.I.E.R.I. Manual]. Inicialmente se coloca un fritado en el extremo superior de la columna. La aspiración se realiza con una bomba peristáltica y la resina se empaqueta hasta que se observa que la columna está completamente rellena. Por último se coloca un fritado en el extremo opuesto y se acondiciona la columna durante 10 minutos con la solución complejante de NaCl 3 M y HCl 0,03 M antes de su uso. La columna se conservaba con agua después de su uso para evitar la aparición de canalizaciones en la resina que harían que el camino recorrido por el analito no fuese reproducible. Los fritados utilizados son de polipropileno de 90 µm suministrados por MoBiTec. La vida media de las columnas es aproximadamente un mes cuando se preconcentran soluciones patrón.



**Figura 6.5** Esquema de la columna de preconcentración empaquetada.

#### 6.2.4 Procedimientos de análisis

A continuación se detallan los procedimientos de operación definidos en el programa de control, para la realización de los distintos estudios. Todos los procedimientos son definidos previamente en el programa.

#### 6.2.4.1 Calibración

El ciclo de calibración (figura 1 A-B) utilizado para la determinación potenciométrica de ion cadmio con los dos modos de detección se muestra en la tabla 6.1. La primera etapa es la aspiración de un volumen dado de solución patrón a través de un puerto de la válvula selectora. Cada patrón es aspirado por un puerto distinto para evitar contaminaciones entre patrones. El volumen aspirado permanece en el tubo de acumulación y es enviado en la segunda etapa del ciclo hacia el detector a través del puerto 1 de la válvula selectora. Esta secuencia se realiza por triplicado para cada solución patrón de cadmio. Al finalizar cada ciclo de calibración se procede a la limpieza del sistema de flujo. El ciclo de limpieza consiste en la impulsión de portador a través de cada puerto durante 5 segundos al caudal óptimo.

**Tabla 6.1** Etapas del ciclo de calibración del sistema para el análisis de ion cadmio sin preconcentración en línea. Se detallan los dos ciclos de calibración utilizados en los dos modos de detección.

| Etapa                                  | Puerto | Dirección  | Tiempo (s) | Caudal (ml/min) | Volumen (μl) |
|--|--------|------------|------------|-----------------|--------------|
| <b>Modo detección normal</b>           |        |            |            |                 |              |
| Patrón                                 | 2-8    | Aspiración | 5          | 2,61            | 218          |
| Detección                              | 1      | Propulsión | 60         | 3,00            | 3000         |
| Lavado <sup>a</sup>                    | 2-8    | Propulsión | 5          | 3,00            | 250          |
| <b>Modo detección diferencial</b>      |        |            |            |                 |              |
| Estabilización línea base <sup>b</sup> | 1      | Propulsión | 10         | 1,99            | 332          |
| Patrón                                 | 2-8    | Aspiración | 10         | 2,09            | 350          |
| Detección                              | 1      | Propulsión | 110        | 1,99            | 3940         |
| Lavado <sup>a</sup>                    | 2-8    | Propulsión | 10         | 1,99            | 350          |

<sup>a</sup> Ciclo limpieza final. <sup>b</sup> Es requerida sólo al principio del ciclo de calibración en el primer patrón. Permite la situación del cero de potencial en la escala de registro en el sistema con detección diferencial.

#### 6.2.4.2 Efecto del pH

La evaluación del efecto del pH se realizó utilizando el SIA descrito anteriormente (figura 1 A). El ciclo de análisis se compone de cuatro etapas (tabla 6.2) que se repiten después de cada variación de pH en el vaso de precipitados. La primera etapa es la limpieza del canal 2 por donde se aspira la muestra hacia el tubo de acumulación, de este modo se eliminan los restos de la anterior alícuota aspirada. Este volumen de limpieza aspirado es impulsado a través del puerto 5 de la válvula selectora hacia el residuo. En la tercera etapa, una vez limpio el canal 2 por el que se aspira la muestra (lleno ahora de portador) se aspira un nuevo volumen de muestra. En la cuarta etapa del ciclo de análisis, la alícuota de muestra reservada en el tubo de acumulación es enviada a través del canal 1 de la válvula selectora hacia el detector.

**Tabla 6.2** Etapas secuenciales para la evaluación del efecto del pH.

| Etapa           | Puerto | Dirección  | Tiempo(s) | Caudal (ml/min) | Volumen (μl) |
|-----------------|--------|------------|-----------|-----------------|--------------|
| Lavado canal    | 2      | Aspiración | 5         | 2,61            | 218          |
| Retorno sistema | 5      | Propulsión | 5         | 2,88            | 240          |
| Muestra         | 2      | Aspiración | 6         | 2,61            | 261          |
| Detección       | 1      | Propulsión | 120       | 3,00            | 6005         |

#### 6.2.4.3 Preconcentración

El ciclo de análisis para la determinación de ion cadmio con etapa de preconcentración en línea, esta compuesto de tres secuencias principales: muestreo, pretratamiento de la muestra con reacción en línea y detección usando los dos modos, MDN y MDD (figura 2). Estas secuencias se resumen en la tabla 6.3. El ciclo de preconcentración es el mismo para los dos sistemas de detección.

**Tabla 6.3** Etapas secuenciales para la determinación de ion cadmio por MDN y MDD.

| Etapa   | VS2 | VS1 | Tiempo (s)                                   | Caudal (ml·min <sup>-1</sup> ) | Volumen (ml)  | Dirección bomba | VS3 |
|---|-----|-----|--|--------------------------------|---|-----------------|-----|
| Acondicionamiento de la columna <sup>a</sup>  | 1   | 8   | 600  | 1,70                           | 17,0  | Propulsión      | No  |
| Aspiración de reactivo y muestra              | 2   | 3   | 300  | 0,71                           | 0,887 <sup>reactivo</sup><br>2,662 <sup>muestra</sup> | Aspiración      | Sí  |
| Lavado agua desionizada columna y conexiones  | 3   | 2   | 30   | 1,70                           | 0,850   | Propulsión      | No  |
| Descarga exceso agua desionizada con eluyente | 4   | 4   | 25   | 1,70                           | 7,1   | Propulsión      | No  |
| Elución del analito hacia el detector         | 4   | 1   | 300-500 <sup>b</sup><br>300-400 <sup>c</sup> | 1,70                           | 8,5-14,1 <sup>b</sup><br>8,5-11,3 <sup>c</sup>        | Propulsión      | No  |

<sup>a</sup> Sólo una vez antes de comenzar el ciclo de operación, antes de la calibración

<sup>b</sup> MDN, <sup>c</sup> MDD, VS1:válvula selectora 1, VS2: válvula selectora 2 y VS3: válvula solenoide de tres vías.

La primera etapa es el acondicionamiento de la columna. Esta etapa sólo es necesaria al comienzo del primer ciclo de operación antes del calibrado. Consiste en el bombeo durante 10 min del reactivo complejante aspirado por el puerto 1 de VS2, pasando a través de la columna cuando VS1 está comunicada con el puerto 8 que actúa de salida de residuo. La segunda etapa consiste en la aspiración de muestra y reactivo a través de la válvula solenoide, comunicada con la VS1 a través del puerto 3 mientras que el sobrante de mezcla de reacción sale por el puerto 2 de la VS2 y va al residuo. La válvula solenoide actúa con una frecuencia definida en el programa de 0,25s<sup>-1</sup>. Esto significa que aspira tres fracciones de muestra por una de reactivo. La tercera etapa es una etapa de limpieza del sistema desde el canal central de VS2 hasta el canal central de la VS1. Consiste en el paso de agua desde el puerto 3 de la VS2 a través de la columna hasta el puerto 2 de la VS1. Con esta etapa se consiguen eliminar los restos de mezcla muestra/reactivo y las posibles interferencias. La cuarta etapa consiste en llenar todo el sistema con el eluyente NaNO<sub>3</sub> 1,5 M para eliminar los restos del agua de lavado. De esta manera se evitan las alteraciones en la línea de base debidas a la presencia de disoluciones de distinta fuerza iónica (agua/eluyente) a su paso

por el detector. Esta etapa se realiza comunicando el canal 4 de la VS2 a través de la columna con el canal 4 de VS1. La última etapa es la elución del cadmio retenido hacia el detector. Se basa en la comunicación del puerto 4 de la VS2 a través de la columna con el puerto 1 de VS1 comunicado con el detector. En este canal es donde se implementan los dos modos de detección estudiados.

En todos los casos el ciclo de análisis ha sido definido previamente antes de comenzar la operación. En este protocolo se define el acceso a los puertos de las válvulas selectoras, el intervalo de tiempo de apertura, la frecuencia de oscilación de la válvula solenoide de tres vías y, la dirección de bombeo y velocidad de giro de la bomba.

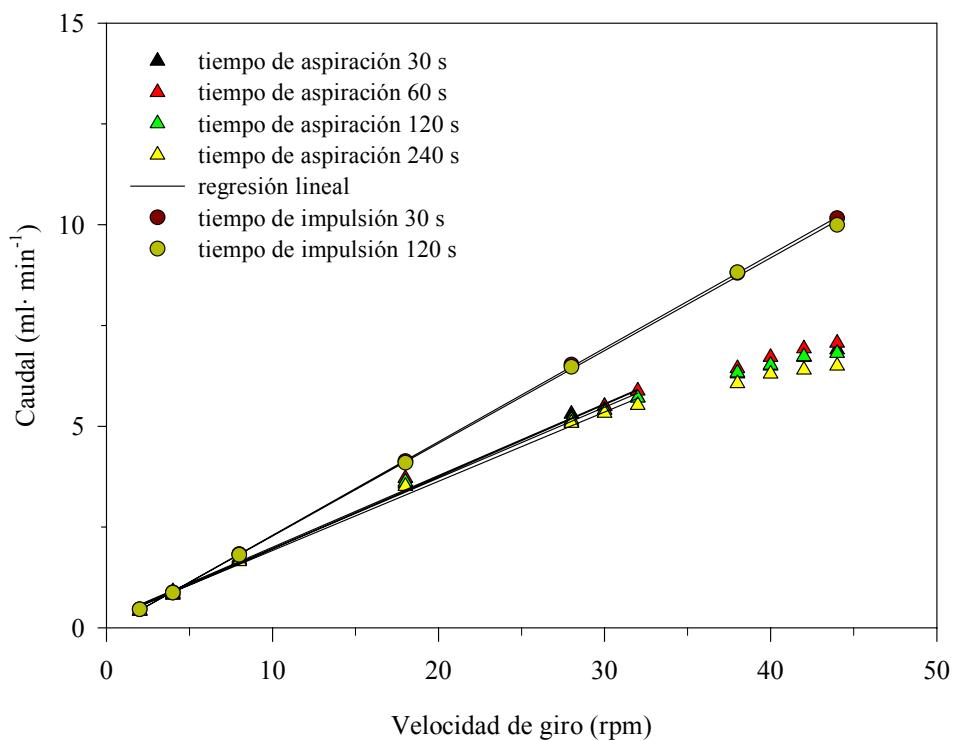
### **6.3 Evaluación de las características hidrodinámicas**

Las características hidrodinámicas del sistema son las responsables directas de la dispersión de la muestra. En los sistemas de flujo, la dispersión es constante [Ruzicka, 1975, 1990; Gubeli, 1991; Ivaska, 1993; Marshall, 1992] y viene definida por las características geométricas del sistema, el volumen de muestra y también en menor medida por el caudal. En el sistema SIA desarrollado, las características físicas deben permanecer invariables a lo largo del tiempo para asegurar una dispersión controlada y reproducible. Los elementos fundamentales del este sistema (figura 1a) son la bomba peristáltica y la válvula selectora de 8 vías (VS2). Se ha realizado una etapa previa de calibración de la bomba para asegurar un buen funcionamiento de la misma y determinar el intervalo de linealidad del caudal de aspiración e impulsión en el que se puede operar.

Se han realizado dos estudios diferenciados. El primero ha sido la calibración de la bomba mediante la determinación de los caudales de aspiración e impulsión en distintas condiciones con el objetivo de definir la zona lineal de aspiración e impulsión. Se ha estudiado esta variación en función de las características del tubo de bomba y de la densidad de la solución aspirada/impulsada. La determinación del caudal de aspiración de cada solución se ha realizado por evaluación de la disminución de masa de un volumen de solución previamente pesado. El caudal de impulsión se determina pesando la solución recogida en un intervalo de tiempo definido. En ambos casos, los valores de peso obtenidos fueron convertidos en volumen teniendo en cuenta la densidad de la solución utilizada en la experiencia. El caudal se calcula después a partir de los tiempos de aspiración/impulsión fijados. El segundo estudio ha sido determinar el volumen mínimo aspirable y la relación  $t_{aspiración}/\text{rpm}$  óptima. Se ha verificado también la repetitividad del sistema propuesto realizando análisis de ion cadmio en distintas condiciones experimentales (volumen de muestra y caudal).

### 6.3.1 Calibración del sistema

Con el objetivo de establecer las condiciones de operación donde se obtiene mayor linealidad del caudal, se ha determinado el caudal de aspiración/impulsión en función de la velocidad de giro de la bomba para dos tubos de bomba de distinto diámetro interno: 1,651 mm (azul-azul) y 1,143 mm (rojo-rojo). En la calibración del primer tubo de diámetro 1,651 mm se determinó el caudal de aspiración en 4 series diferentes. En estas series se mantuvo constante el tiempo de aspiración y se varió la velocidad de giro de la bomba. Se determinó el caudal de aspiración suministrado por la bomba mediante pesada de un volumen aspirado de agua. Los ciclos de aspiración se repitieron hasta obtener un volumen de agua representativo por pesada, como mínimo 1 gramo. A menor tiempo de aspiración ha sido necesario un número mayor de ciclos de aspiración. Los tiempos estudiados han sido 30, 60, 120 y 240 segundos y la velocidad de giro nominal de la bomba se varió en el intervalo entre 2-44 rpm. En la determinación del caudal de impulsión se realizaron 2 series. Se estudiaron dos tiempos de impulsión: 30 y 120 segundos, y el mismo intervalo de giro de la bomba entre 2-44 rpm.

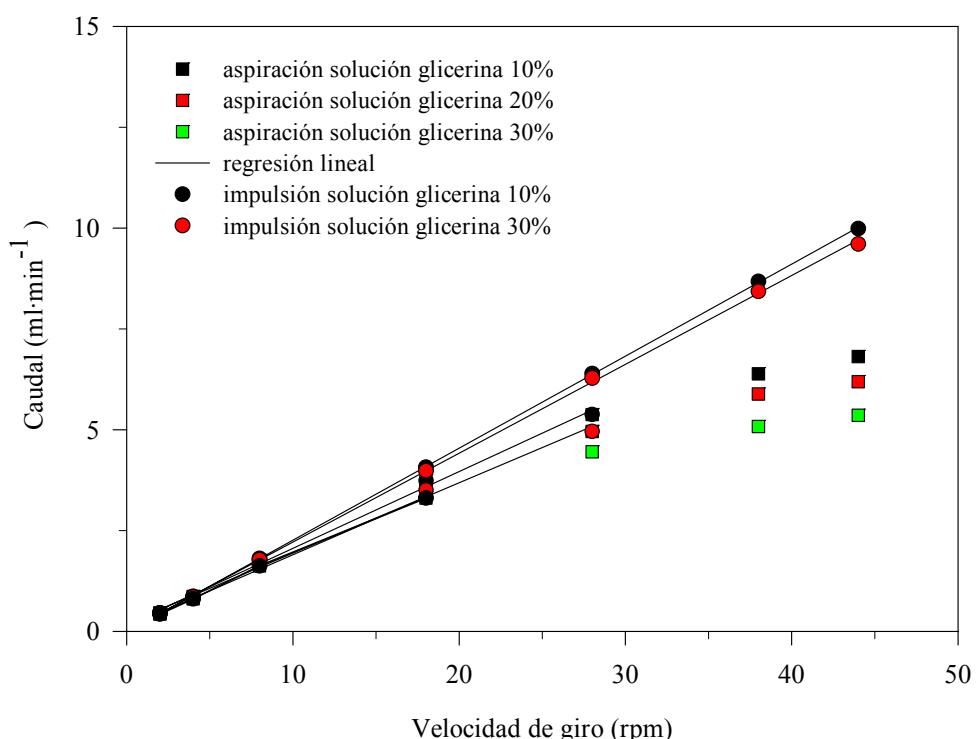


**Figura 6.6** Calibración del caudal de aspiración e impulsión de agua para un tubo de diámetro de 1,651 mm.

En la figura 6.6 se pueden apreciar las gráficas de calibración obtenidas. Se comprobó que el tiempo de aspiración e impulsión no afectaban al caudal. Se obtuvieron los mismos caudales de impulsión a distintos tiempos de aspiración e igualdad de velocidad de giro de la bomba. La impulsión de la bomba fue lineal en todo el intervalo de funcionamiento. En

el caso de la aspiración fue lineal sólo hasta una velocidad de giro nominal de 32 rpm, a partir de este punto se obtuvieron desvíos de la linealidad.

Se realizó una segunda calibración con soluciones de densidad mayor de 1 g/ml. Las soluciones utilizadas fueron glicerina 10 %, 20 % y 30 %. Se realizaron 5 series de calibración dos de impulsión y tres de aspiración. El tiempo de impulsión y aspiración fue constante e igual a 60 segundos, y el caudal se determinó para todo el intervalo de giro de la bomba (2-44 rpm). Los calibrados de impulsión se realizaron para dos soluciones de glicerina 10% y 30 % y los calibrados de aspiración con soluciones de glicerina del 10%, 20% y 30%. El caudal de impulsión fue lineal para soluciones de diferente densidad en todo el rango de giro de la bomba. Los caudales de aspiración obtenidos para soluciones de glicerina (figura 6.7) fueron inferiores que para agua (figura 6.6). Se observó que el desvío de la linealidad en la aspiración es superior al aumentar la densidad de la solución. El caudal de aspiración sólo es lineal hasta una velocidad de giro nominal de 28 rpm para la aspiración de glicerina 10 % y 20%, y de 18 rpm para aspiraciones de glicerina 30 %. La zona de respuesta lineal en la aspiración fue menor para soluciones de densidad mayor de 1 g/ml. Por tanto, se concluye que el sistema debe calibrarse especialmente en el proceso de aspiración para conocer exactamente el volumen. Para un mismo tipo de tubo existen diferencias significativas cuando se aspiran fluidos de diferente densidad.



**Figura 6.7** Calibración del caudal de aspiración e impulsión de glicerina de distinta concentración para un tubo de diámetro 1,651 mm.

Para estudiar el efecto del diámetro del tubo en la impulsión y en la aspiración se calibró un tubo de bomba de 1,143 mm diámetro interno procediendo de modo similar. Se impulsó y aspiró solo agua durante el proceso de calibración, ya que las soluciones que se han utilizado tienen densidad aproximada de 1 g/ml. El tiempo de aspiración se ha mantenido constante (60 segundos) y se ha estudiado el caudal entre 1-44 rpm de giro de la bomba. La impulsión y la aspiración fueron lineales en todo el intervalo, aunque el caudal de impulsión obtenido fue superior al caudal de aspiración. La bomba no tiene la misma eficacia en la aspiración a través de la válvula selectora que en la impulsión. En la tabla 6.4 se muestran las rectas de calibración correspondientes.

**Tabla 6.4** Rectas de calibración del tubo de bomba de diámetro 1,143, en el proceso de impulsión y aspiración de agua.

| <i>Caudal de impulsión</i>   |
|--|
| $Q \text{ (ml} \cdot \text{min}^{-1}) = -0,034 (\pm 0,009) + 0,1168 (\pm 0,0004) \cdot V \text{ (rpm); (n=7, r = 0,9999)}$ |
| <i>Caudal de aspiración</i>  |
| $Q \text{ (ml} \cdot \text{min}^{-1}) = 0,02 (\pm 0,02) + 0,104 (\pm 0,001) \cdot V \text{ (rpm); (n=11, r = 0,9995)}$     |

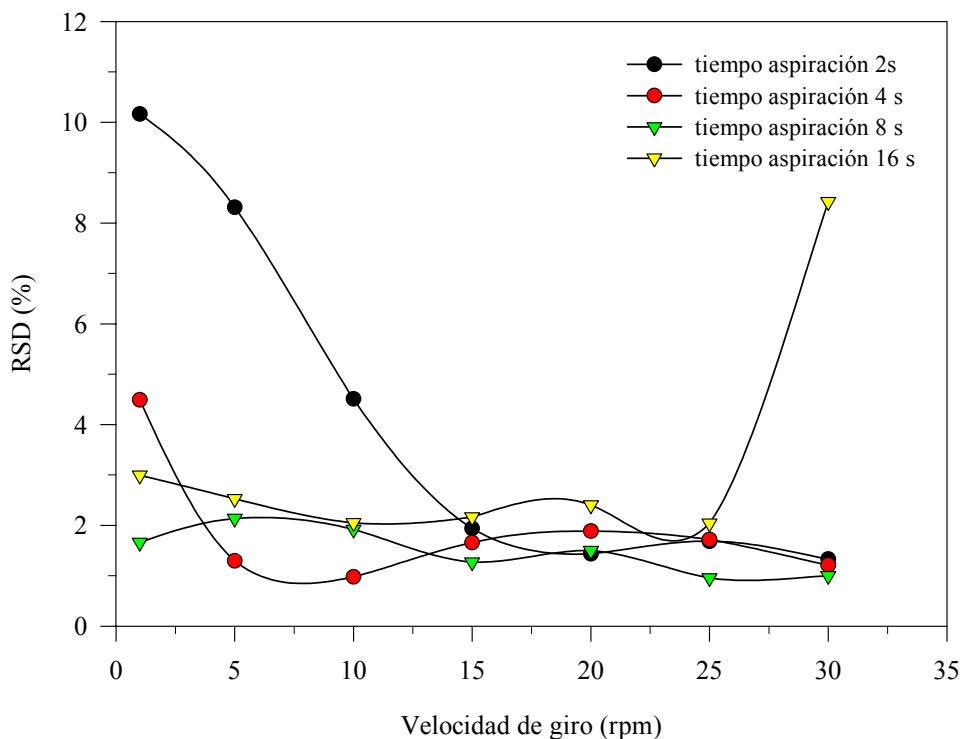
A menor diámetro del tubo de bomba disminuye el desvío de la linealidad de la aspiración respecto de la impulsión. Como consecuencia, si fuese necesario, es posible trabajar en todo el intervalo de giro de la bomba con respuesta lineal y con buena resolución entre las distintas velocidades de giro.

Se concluye que a mayor caudal de operación y densidad mayor de 1g/l es más evidente la pérdida de linealidad en el proceso de aspiración. Además ésta es más pronunciada cuanto mayor es la densidad de la solución aspirada. Consecuentemente, resulta más práctico trabajar con tubos de bomba de menor diámetro.

### 6.3.2 Volumen mínimo aspirado

El volumen mínimo aspirable es otra variable importante a determinar en un sistema SIA, porque define el límite inferior en el que se puede trabajar con reproducibilidad aceptable. En este estudio se ha utilizado el esquema básico del sistema SIA con detección normal que se muestra en la figura 1A. Como solución portadora se ha utilizado una solución de  $\text{KNO}_3$  0,1M. Dado que en esta experiencia se usa un sistema monocanal se ajustó la fuerza iónica de los patrones con  $\text{KNO}_3$  0,1M. En la disolución portadora se fijó también una concentración  $2 \cdot 10^{-5}$  M de Cd (II). La composición de la solución portadora fue optimizada en un estudio previo llevado a cabo con el mismo electrodo pero integrado en un sistema de flujo FIA [Couto, 1999].

Con el montaje descrito, se pretende determinar el volumen mínimo aspirable (e inyectable después) mediante la estimación de la repetitividad de la respuesta del electrodo que se relacionará con la repetitividad de la aspiración, expresada como RSD. Se aspiraron, en el sistema SIA sin optimizar, distintos volúmenes de una solución  $1 \cdot 10^{-1}$  M de Cd utilizando tubos de distinto diámetro interno (1,651 i.d. y 1,143 i.d.). Para el tubo de 1,651 mm de diámetro se ha estudiado la repetitividad por dos vías. En la primera se ha mantenido constante el tiempo de aspiración (tiempo: 2, 4, 8, 16) y variable la velocidad de giro de la bomba (rpm: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30). En la segunda se ha variado el tiempo de aspiración (tiempo de aspiración: 1, 2, 4, 8, 16, 26, 36), manteniendo constante la velocidad de giro de la bomba (rpm: 1, 5, 10). Cada una de estas parejas de condiciones determina un volumen aspirado diferente. La secuencia de análisis ha consistido en la aspiración del volumen predefinido de patrón, a través del puerto 2 de la válvula selectora 1, hacia el tubo de acumulación y la posterior impulsión con portador hacia el detector (electrodo), por el puerto 1 de la válvula selectora durante 30 segundos a 30 rpm. En ambos casos se realizaron diez determinaciones en cada una de las condiciones y después se calculó RSD (%). Para las dos series estudiadas se obtuvieron resultados análogos.

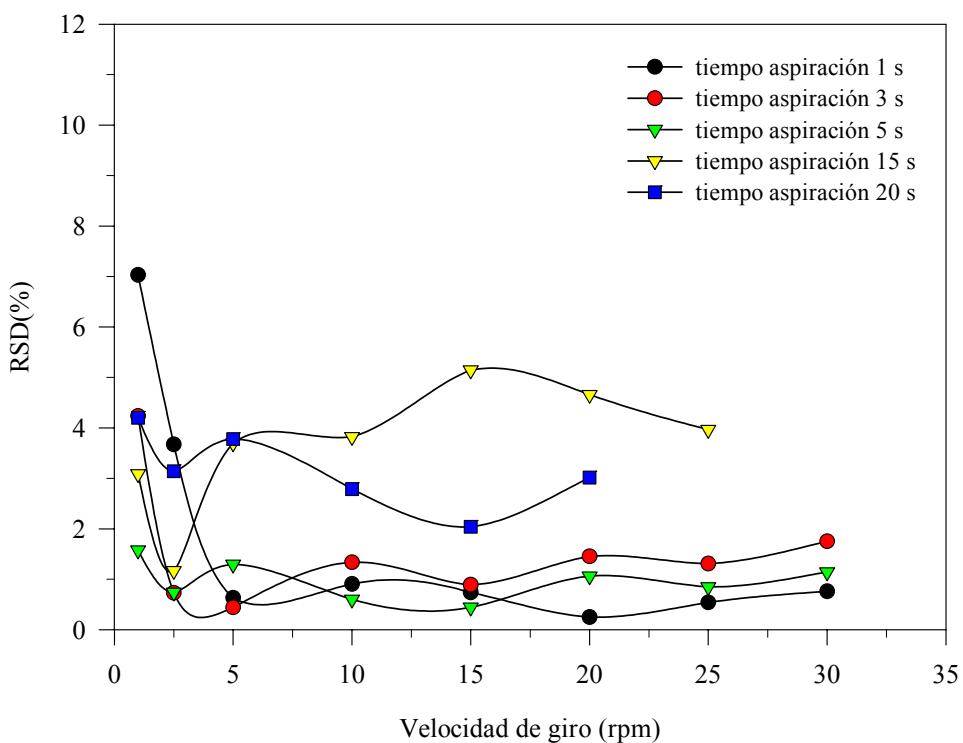


**Figura 6.8** Determinación del volumen mínimo de inyección para un tubo de diámetro de 1,651 mm. Cada punto es la media de 10 análisis de una concentración de Cd (II)  $1 \cdot 10^{-1}$  M.

En la figura 6.8, se muestran los resultados de la primera serie evaluada. La respuesta depende tanto de la velocidad de giro de la bomba como del tiempo de aspiración. En los dos casos se ha observado que tiempos de aspiración pequeños (1-4 s) combinados con velocidades de giro bajas (0-10 rpm) y, tiempos de aspiración grandes (16 s) con

velocidades de giro altas (30rpm), dan RSD elevadas. Esto es debido a las limitaciones experimentales de la bomba peristáltica relacionadas con la inercia tanto en la puesta en marcha como en la parada de esta. Los puntos de partida y parada del movimiento nunca son los mismos y la presión que ejercen los diferentes rodillos no es igual. Este problema, obviamente, es más pronunciado para volúmenes extremos.

También se ha estudiado el efecto de la concentración. Se aspiraron distintos volúmenes de una solución  $1 \cdot 10^{-3}$  M de Cd manteniendo el tiempo de aspiración constante a 2s y variando el intervalo de giro de la bomba desde 1-30 rpm. No se obtuvieron diferencias significativas por efecto de la diferencia de concentración. Se ha comprobado que el volumen mínimo reproducible es independiente de la concentración y se ha verificado que el volumen mínimo para un tubo de 1,651 mm de diámetro interno es  $50,40 \pm 0,35 \mu\text{l}$ , el error ha sido calculado como  $I_{n-1}^{95\%}$  y tiene un valor  $\text{RSD} = 1,66\%$  para las dos concentraciones ensayadas.



**Figura 6.9** Determinación del volumen mínimo de inyección para un tubo de diámetro de 1,143 mm. Cada punto es la media de 10 análisis de una concentración de Cd (II)  $1 \cdot 10^{-1}$  M.

Se ha procedido de igual modo para el cálculo del volumen mínimo con un tubo de 1,143 mm. Se ha estudiado la variación de la respuesta manteniendo constantes distintos tiempos de aspiración y se ha variado para cada uno de éstos la velocidad de giro de la bomba. Los tiempos de aspiración estudiados han sido 1, 3, 5, 15, y 20 segundos, y la velocidad de giro de la bomba estudiada 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 rpm. Para este tubo los mejores

resultados se han obtenido para tiempos de aspiración menores de 15 s y velocidades de giro de la bomba mayores de 5 rpm. En estas condiciones el valor de RSD está entre 0-1,5%. El volumen mínimo aspirado con un tubo de 1,143 mm ha sido  $10,6 \pm 0,21 \mu\text{l}$  con un RSD=0,63 %. En la figura 6.9 se muestran los resultados obtenidos.

En vista de los resultados se puede concluir que para obtener una reproducibilidad adecuada al tomar volúmenes reducidos se han de utilizar tiempos de aspiración y velocidad de giro pequeñas. Seleccionar una velocidad de giro baja para el proceso de aspiración en sistemas de SIA es siempre lo más adecuado. De este modo se minimiza la generación de burbujas de aire que después pueden afectar en la medida efectuada por el sistema de detección, ya sea potenciométrico como espectrofotométrico. Por tanto el tubo más adecuado para la gestión del sistema SIA es el tubo de menor diámetro, porque se obtiene una mayor linealidad en la aspiración e impulsión y un volumen mínimo útil menor. A partir de este punto será el que se utilizará en todos los sistemas implementados.

#### **6.4 Desarrollo de un sistema SIA para el análisis de ion cadmio con dos modos de detección**

La detección potenciométrica ofrece numerosas ventajas respecto a otros sistemas de detección. Entre otras cabría destacar el bajo coste de la instrumentación necesaria para su aplicación, su amplio rango de trabajo y su gran versatilidad analítica. No obstante, la sensibilidad analítica de los detectores potenciométricos fijada por la ley de Nernst resulta, en algunos casos, una limitación que restringe el campo de aplicación de estos dispositivos. Debido a la relación logarítmica que se establece entre la variación de potencial y la concentración del ion primario [Bailey, 1976], la sensibilidad teórica para un ion monovalente, es de  $59,1 \text{ mV}\cdot\text{decada}^{-1}$ . Un error de  $\pm 0,5 \text{ mV}$  en la lectura de potencial conduce a un error relativo de concentración de cerca del 2%. En el caso de un ion divalente, detectado con una sensibilidad de  $29,6 \text{ mV}\cdot\text{decada}^{-1}$ , para el mismo error de lectura, el error de concentración será de 4%. Para minimizar este problema y conseguir un aumento de sensibilidad en la detección potenciométrica, se han propuesto distintas estrategias [Couto, 1999].

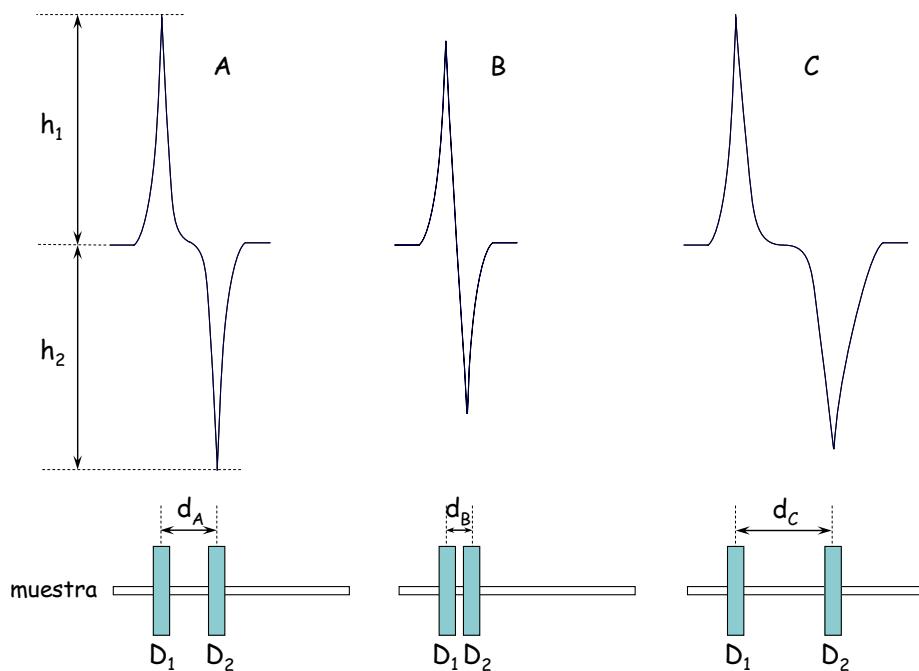
La sensibilidad de un método analítico viene determinada por la relación entre la variación de la señal analítica respecto de la variación de la concentración del analito a determinar. Para conseguir un aumento de sensibilidad, en potenciometría se necesita incrementar la variación de potencial por unidad de concentración. Dado que la respuesta inevitablemente dependerá de la ecuación de Nernst, este incremento de la señal deberá conseguirse modificando el procedimiento experimental de medida o manipulando la señal una vez generada.

Como punto de partida para estudiar la modificación del procedimiento experimental de medida se ha de tener en cuenta que la necesidad de automatización de las determinaciones potenciométricas, con el objeto de mejorar su operatividad, aumentar la frecuencia de muestreo y disminuir el consumo de muestra y reactivos, ha conducido a la integración de esta técnica de detección en sistemas de flujo continuo FIA y SIA [Alegret et al., 1985].

En este tipo de sistemas de flujo, el incremento de sensibilidad de los detectores potenciométricos ha merecido especial atención por parte de algunos autores. Una de las estrategias más utilizadas consiste en la detección diferencial, basada en la colocación de dos electrodos secuencialmente en el mismo canal. Situados en canales paralelos o el mismo electrodo mediante la medición de potencial utilizando los dos lados de la membrana sensora de un mismo electrodo indicador [Couto, 1999]. Los electrodos colocados secuencialmente pueden ser sensibles a la misma especie analítica o tener respuestas a diferentes iones primarios, este último caso se ha aplicado en determinaciones multiparamétricas. Cuando el objetivo era obtener un aumento de la sensibilidad en la determinación potenciométrica se prodecia a colocar en línea dos detectores similares, El principio de funcionamiento aprovecha la posibilidad de permutar la función cada uno de ellos a lo largo del tiempo, operando alternativamente como electrodo indicador y como electrodo de referencia uno respecto del otro [Barber, 1992].

La señal analítica obtenida en los sistemas de flujo con detección potenciométrica diferencial presenta un registro ascendente y otro descendente, como se esquematiza en la figura 6.10. La amplitud total resulta de la suma de sus respectivas alturas parciales ( $h_1+h_2$ ). La forma y amplitud de la señal analítica, influyen en la sensibilidad analítica del sistema de detección, y dependen tanto de la geometría como de los parámetros hidrodinámicos del sistema. Éstos son responsables tanto de la dispersión del segmento de muestra, como del tiempo de respuesta de los propios electrodos.

La señal obtenida depende de las todas las variables hidrodinámicas del sistema que afectan a la dispersión que sufre la muestra aunque tienen una gran importancia la distancia entre electrodos (ver figura 6.10). En **A** se representa una señal transitoria ideal, donde las alturas de pico correspondientes a la variación de potencial de cada electrodo son aproximadamente iguales. En estas condiciones el segundo electrodo comenzará a registrar el paso del segmento de muestra inmediatamente después del retorno a la línea base del primer detector. En **B** la señal descendente es menor que la ascendente ya que la distancia entre electrodos  $d_B$  es insuficiente. El segundo detector comienza a detectar el paso de la muestra antes de que el primer detector haya recuperado el valor de la línea base. Esto provoca la superposición de las dos señales analíticas y una reducción de los valores de  $h_1$  y  $h_2$ .



**Figura 6.10** Representación gráfica de las señales analíticas típicas obtenidas con un sistema de flujo con detección diferencial en función de la distancia entre electrodos. (A) Señal analítica ideal  $h_1 \sim h_2$ . (B) Señal analítica con superposición de los dos picos, ascendente y descendente, (C) Señal analítica con disminución de amplitud del segundo pico, resultado de la elevada dispersión del trozo de muestra inyectado.

En **C**, se muestra la señal obtenida cuando los electrodos están situados a una distancia,  $d_C$ , excesiva entre si. En este caso, la señal obtenida por el primer detector es idéntica a  $h_1$  de **A**, pero la dispersión en el segundo detector es demasiado elevada, provocando una disminución en la magnitud de la señal analítica para el segundo detector ( $h_2$ ). En estas condiciones se produce un ensanchamiento de la señal registrada, con una zona plana entre el pico ascendente y descendente, correspondiente a una fracción de tiempo en que ambos detectores registran el paso de la solución portadora.

De lo dicho anteriormente resulta evidente la importancia de optimizar la distancia entre los dos electrodos, colocados secuencialmente, para obtener respuestas analíticas semejantes que conduzcan a la máxima mejora posible de la sensibilidad de la detección potenciométrica. Para condiciones ideales, la respuesta del sistema de detección diferencial debería ser el doble de la respuesta Nerstiana teórica.

En este apartado se ha realizado un estudio comparativo para un mismo sistema SIA con dos modos de detección, normal y con sensibilidad aumentada, aplicados en la determinación de ion cadmio. Como se ha explicado antes (apartado 6.2.2), el sistema de detección está basado en electrodos selectivos de ion cadmio de membrana cristalina homogénea. Estos electrodos ya se habían utilizado y caracterizado en trabajos anteriores [Ferreira y Lima, 1994; Couto, 1999].

Con el objetivo final de obtener la máxima sensibilidad se han optimizado las condiciones de operación para los dos modos de detección implementados. Para el modo de detección normal se ha estudiado la influencia en el potencial medido del pH, tanto de la disolución portadora como de la solución de ion principal, así como el efecto de especies interferentes. Se ha comparado los resultados obtenidos en este sistema al estudiar el efecto de las interferencias con los obtenidos en un trabajo previo [Ferreira y Lima, 1994] realizado en un sistema FIA, donde se utilizaron los mismos electrodos de membrana cristalina sensibles a cadmio y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Finalmente, se han evaluado las características operacionales de los electrodos construidos (MDN, MDD) determinando la sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad de las señales analíticas, el límite inferior de respuesta lineal (LIRL) el límite superior de respuesta lineal (LSRL) y la frecuencia de muestreo.

Con el objeto de obtener la máxima sensibilidad analítica con ambos modos de detección se han optimizado las condiciones de operación, estudiando la influencia de la concentración de cadmio, el volumen de inyección y el caudal en la señal analítica. En el caso concreto del MDD se ha estudiado también la distancia entre electrodos.

En los dos modos de detección ha sido utilizada una solución portadora que contiene una concentración muy baja ( $2 \cdot 10^{-5}$  M) de ion cadmio. La introducción de este fondo de ion principal contribuye a estabilizar la línea de base y facilitar el retorno a esta tras la medida. Dado que la amplitud de la señal analítica es medida a partir del valor de la línea de base, es conveniente tener un valor estable para poder efectuar medidas correctas. La utilización de una solución portadora constituida solamente por el ion principal y su correspondiente contra ion no es suficiente para asegurar el contacto eléctrico entre el electrodo indicador y el de referencia. Por este motivo fue necesaria la introducción de un electrolito de concentración relativamente alta, cuya elección fue realizada en base a minimizar su interferencia en la respuesta del electrodo indicador. Del estudio de los coeficientes de selectividad potenciométrico frente a diferentes iones para sensores de características semejantes [Ferreira, 1994], se decidió utilizar una solución de nitrato potásico 0,1 M.

Los dos sistemas SIA evaluados son sistemas monocanales donde no puede realizarse, de modo automático, un ajuste de la fuerza iónica del patrón inyectado. Por esta razón todas las soluciones patrón se han preparado en  $\text{KNO}_3$  0,1 M igual que la solución portadora. De esta manera se eliminan los problemas de estabilidad de línea de base y picos negativos derivados de la diferencia de fuerza iónica entre soluciones. Adicionalmente, cuando la fuerza iónica de la solución se encuentra ajustada, el coeficiente de actividad se mantiene constante, por lo que, el potencial del electrodo varía linealmente con la concentración (§ 3.3.2).

#### 6.4.1 Optimización del sistema SIA con modo de detección normal

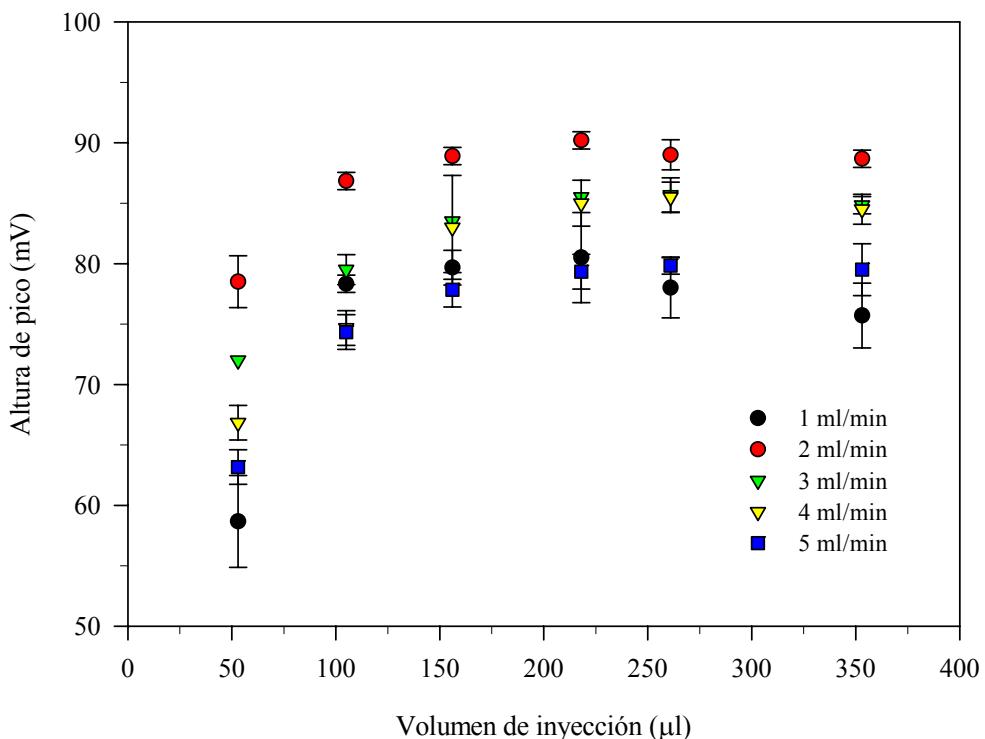
Se ha utilizado el sistema SIA de baja dispersión presentado en la figura 1A con el modo de detección normal, con un electrodo tubular potentiométrico sensible a cadmio y un electrodo de referencia convencional de Ag/AgCl. El diámetro interno del electrodo tubular es similar al de los tubos de Teflón del sistema de gestión de fluidos (0,8 mm). Las características de operación de la técnica SIA implican que el flujo es discontinuo y que la solución portadora fluye a través del detector solamente durante el proceso de medida. Aunque la intermitencia del flujo podría llegar a originar variaciones en la señal de línea de base generada por el electrodo [Tóth et al., 1990], este efecto negativo no se ha observado en ninguno de los sistemas evaluados.

El objetivo del proceso de optimización del sistema SIA con MDN ha sido obtener un sistema con la máxima sensibilidad analítica, un elevado ritmo de muestreo y una buena estabilidad. Se ha utilizado el método univariante. En esta estrategia de optimización, cada uno de los parámetros es alterado independientemente, fijando los restantes. Los parámetros estudiados han sido el volumen de inyección de la muestra, el caudal de la solución portadora y la distancia desde la válvula selectora hasta el electrodo tubular. Estos parámetros se han optimizado estableciendo un compromiso entre la altura de pico y el tiempo de análisis. En este estudio el tubo de bomba utilizado ha sido el de menor diámetro 1,143 mm ya que permite aspirar de manera precisa volúmenes mínimos repetitivos (10,6  $\mu$ l). La distancia  $L_1$  desde la válvula selectora hasta el electrodo de toma de tierra ha sido la mínima posible, 20 cm, para minimizar la dispersión de la muestra antes de llegar al detector (figura 1A).

El ciclo de operación utilizado en la optimización es similar al mostrado en la tabla 6.2. Se han variado los tiempos de aspiración e impulsión, así como la velocidad de giro de la bomba, para obtener los distintos caudales y volúmenes de patrón aspirados. En estas experiencias se utilizó un patrón 0,1M de cadmio (II). La concentración escogida ha sido alta para asegurar que el tiempo de retorno al valor inicial de línea de base es el adecuado para todo el intervalo de concentración estudiado ( $1 \cdot 10^{-7}$ -  $1 \cdot 10^{-1}$  M). De este modo se ha optimizado el tiempo de retorno a la línea base simultáneamente. El portador utilizado ha sido una solución  $\text{KNO}_3$  0,1 M sin cadmio como estabilizador de la línea de base para evaluar la respuesta del electrodo y el tiempo máximo de recuperación de ésta.

El tiempo de retorno se ha estimado como el intervalo entre el momento en que la válvula cambia de puerto y el momento en el que la señal analítica transitoria recupera el 95% del valor inicial de la línea de base. Los volúmenes de inyección estudiados han sido entre 50-

300  $\mu\text{l}$ , y los caudales se han variado entre 1-5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . En la figura 6.11 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 6.11** Optimación simultánea del volumen de inyección y el caudal para el sistema SIA con MDN, para una  $[\text{Cd}^{2+}] = 1 \cdot 10^{-1} \text{M}$ . Cada punto corresponde a la media de tres determinaciones experimentales. El error asociado se ha expresado como el  $I^{95\%}$ .

El caudal está relacionado directamente con el tiempo de retorno a la línea base y afecta directamente a la frecuencia de análisis. Para un volumen constante se han obtenido respuestas mayores a caudales medios, 2 y 3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , y alturas de pico menores para caudales de 1, 4 y 5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los resultados muestran que este parámetro afecta a la frecuencia de análisis y a la dispersión de la muestra. La frecuencia de análisis disminuye cuando el flujo decrece, y la dispersión de la muestra es superior en este sistema a caudales altos y bajos, ya que en estas condiciones la respuesta disminuye. La dispersión está favorecida además por el principio de operación de la propia la técnica, aspiración de la muestra en un sentido e impulsión hacia el detector en sentido contrario.

La frecuencia de análisis es directamente proporcional al caudal e inversamente proporcional al tiempo de retorno de línea de base. Los tiempos de retorno obtenidos han sido respectivamente 115, 85, 55, 40 y 25 s para 1, 2, 3, 4 y 5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Se ha establecido un compromiso entre frecuencia de análisis ( $\text{h}^{-1}$ ) y altura de pico (mV), y se ha elegido un volumen óptimo de 218  $\mu\text{l}$  y un caudal óptimo de 3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para volúmenes superiores a 218  $\mu\text{l}$ , la señal permanece constante e independiente del volumen. Para el caudal de 3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  se han obtenido los valores de RSD mas bajos (0-0,67%) de todos los volúmenes

inyectados. La señal mayor se ha obtenido para un caudal de  $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  en todos los volúmenes, pero en beneficio de una mayor frecuencia de análisis se ha escogido como óptimo un caudal superior. A expensas de la pérdida de respuesta debida al incremento de la dispersión, en las condiciones establecidas, se ha obtenido una relación de altura de pico/frecuencia de análisis óptima. La frecuencia de análisis es  $60 \text{ h}^{-1}$  para la concentración superior del rango de operación ( $1\cdot10^{-1} \text{ M Cd}$ ) y  $120 \text{ h}^{-1}$  para las inferiores (menores de  $1\cdot10^{-2} \text{ M de Cd}$ ).

Finalmente, se ha realizado un estudio de la distancia óptima ( $L_1$ ) desde el puerto central de la válvula selectora (VS1) hasta el electrodo de toma de tierra (figura 1A). Se han estudiado 5 distancias: 20, 50, 100, 150, 200 cm. Para poder evaluar mejor el efecto de la distancia en la dispersión, la concentración analizada ha sido menor en este caso,  $5\cdot10^{-4} \text{ M}$  de cadmio (II). Para distancias superiores a 100 cm se ha observado una ligera disminución de la señal, menor de 5 mV en todos los casos. Se concluye que las características hidrodinámicas del sistema no afectan significativamente a la dispersión de la muestra. Por tanto, se puede considerar el sistema propuesto como de baja dispersión y se toma como idónea la distancia más corta ya que se asegura de esta manera una mayor frecuencia de análisis. Los resultados de la optimización se muestran resumidos en la tabla 6.7.

#### 6.4.1.1 Coeficientes de selectividad potenciométricos

Se ha realizado un estudio de interferencias para evaluar los coeficientes de selectividad potenciométrica ( $K^{\text{pot}}$ ) del electrodo tubular de cadmio en el modo de detección normal. En este tipo de electrodos, las interferencias de cationes, especialmente de metales pesados, son muy comunes debido a la posibilidad de que se formen sales insolubles con el ion sulfuro presente en la membrana.

Los valores de  $K^{\text{pot}}$  fueron determinados aplicando el método de las soluciones mezcladas [Alegret et al., 1985]. Para ello se ha fijado la concentración de ion Cd (II) y se ha variado la concentración de ion interferente. Los interferentes estudiados han sido Cu (II), Pb (II) y Ag (I). Los resultados obtenidos se han comparado con el trabajo previo realizado [Ferreira y Lima, 1994], citado anteriormente. El procedimiento es análogo al desarrollado en trabajos previos para un electrodo similar pero en un sistema FIA.

Los ensayos fueron realizados por cuadriplicado para dos unidades tubulares. Para la determinación de  $K^{\text{pot}} \text{ Cd}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$  se han realizado calibrados en un intervalo de concentración  $1\cdot10^{-2}$ -  $1\cdot10^{-6} \text{ M de Cu}^{2+}$ . En la determinación de  $K^{\text{pot}} \text{ Cd}^{2+}/\text{Ag}^+$  se realizaron calibrados en un intervalo de concentración  $1\cdot10^{-3}$ -  $1\cdot10^{-6} \text{ M de Ag}^+$ ; en ambos casos la concentración de ion  $\text{Cd}^{2+}$  ha sido  $1\cdot10^{-3} \text{ M}$ . Finalmente en la determinación de  $K^{\text{pot}} \text{ Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$  se han realizado calibrados en un intervalo de concentración  $1\cdot10^{-2}$ -  $1\cdot10^{-6} \text{ M de Pb}^{2+}$ .

$\text{Pb}^{2+}$ , siendo en este caso la concentración de ion  $\text{Cd}^{2+}$  en el portador  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.5. Los valores corresponden a la media de 4 determinaciones realizadas con dos electrodos distintos. Se han comparado los valores obtenidos con los previamente referenciados en el sistema FIA y, con los calculados teóricamente a partir de la relación de los respectivos productos de solubilidad (§ 3.3.2.2). Como se esperaba, los resultados han sido similares a los referenciados, verificándose que no existe diferencia significativa entre los valores de  $K^{\text{pot}}$ . Aunque, en el sistema SIA con MDN, la interferencia provocada por el catión cobre se ha reducido a la mitad. Se observa que, cuanto menor es el producto de solubilidad ( $K_{\text{ps}}$ ) del sulfuro del ion interferente respecto al sulfuro del catión cadmio de la membrana sensora, mayor es su capacidad interferente. A pesar de todo, los valores experimentales son inferiores que los previstos teóricamente. En este caso, los cationes cobre y plata son interferentes importantes del electrodo de membrana cristalina  $\text{Cd}_2\text{S}/\text{AgS}$ .

**Tabla 6.5** Determinación de los coeficientes de selectividad potenciométrica ( $K^{\text{pot}}$ ).

| Interferente (Y) | MDN FIA <sup>a</sup> | MDN SIA | Teórico <sup>b</sup> |
|------------------|----------------------|---------|----------------------|
| $\text{Cu}^{2+}$ | 100                  | 42,3    | $1,0 \cdot 10^9$     |
| $\text{Ag}^+$    | 20                   | 20,7    | $1,0 \cdot 10^{23}$  |
| $\text{Pb}^{2+}$ | 1                    | 1       | 3,0                  |

<sup>a</sup> $K^{\text{pot}}$  ESI ( $\text{CdS}/\text{Ag}_2\text{S}$ ) en el modo de detección normal en un sistema FIA [Ferreira y Lima, 1994].

<sup>b</sup>Valor teórico calculado como  $K_{\text{ps}}(\text{CdS})/K_{\text{ps}}(\text{YS})$ . Valores de  $K_{\text{ps}}$  obtenidos de Lurie [1975].

#### 6.4.1.2 Evaluación de la influencia del pH en el valor de potencial

Se ha determinado la influencia del pH en la respuesta de los electrodos tubulares, con el objetivo de determinar el intervalo de pH en el cual la señal analítica no depende de este parámetro. Esta evaluación se ha realizado mediante el trazado de los diagramas Reilley. Se ha utilizado el sistema experimental con el MDN presentado en la figura 1A.

En un recipiente externo con un volumen elevado (250 ml) se tenía una solución de Cd  $1 \cdot 10^{-3}$  M preparada en nitrato potásico 0,1 M y ácido nítrico 0,1 M. De esta manera, el pH inicial tenía un valor próximo a la unidad y la fuerza iónica estaba ajustada a 0,2 M. Utilizando esta disolución como muestra, se ha determinado la respuesta obtenida por el electrodo tubular cuando se ha variado sucesivamente el pH por adiciones de pequeños volúmenes de una solución saturada de NaOH. Despues de cada adición se ha esperado a que la lectura del electrodo de vidrio sumergido en la disolución se estabilizara antes de determinar la variación de la señal correspondiente. El ciclo de análisis utilizado es similar al mostrado en la tabla 6.1, salvo que se ha introducido una etapa previa para recircular el contenido de los tubos que conectan el sistema SIA con el vaso de precipitados con el

objeto de que el volumen total de solución permanezca casi constante, y sólo disminuya en el volumen inyectado (261  $\mu$ l).

El uso de un volumen elevado de solución de ion cadmio y la adición de volúmenes pequeños de NaOH saturada asegurar una variación menospreciable de la concentración de ion cadmio a lo largo de la determinación. De esta manera se asegura que las alteraciones de potencial son debidas exclusivamente a las variaciones de pH. El pH ha sido determinado después de cada adición de base. Con un electrodo combinado de membrana de vidrio Ingold modelo 10/402/3092 (Crison).

El intervalo donde no existe variación de señal en función del pH fue de 3,6 a 8,4. Se calculó haciendo la media de cuatro valores obtenidos con dos electrodos distintos. Estos se acondicionaron antes y después de realizar cada experiencia. Respecto a estudios previos [Ferreira, 1994], donde el intervalo de pH útil fue 1,6-8,2, se ha observado una disminución en éste, resultado de un acortamiento en la zona ácida y un ligero aumento en la zona básica. Este tipo de diferencias también han sido observadas cuando se comparan respuestas de electrodos tubulares construidos con membranas cristalinas sensibles a Pb (II) obtenidas en distintas síntesis [Couto, 1999]. En este tipo de electrodos sensibles a especies catiónicas y para valores de pH menores a 2, la membrana es atacada por el  $H^+$  debido a la formación de  $HS^-$  y  $S^{2-}$ . Este fenómeno provoca una variación del potencial medido por los electrodos. Para valores elevados de pH, los iones metálicos presentes en la muestra son complejados por los iones  $OH^-$  lo que conduce a una disminución de la señal analítica.

#### *6.4.1.3 Evaluación de la influencia del pH en la solución portadora*

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad ( $mV \cdot dec^{-1}$ ) en el sistema SIA propuesto se ha estudiado la influencia del pH en la solución portadora. La solubilidad condicional de CdS depende del pH de la solución porque éste afecta a los equilibrios de protonación de los iones  $S^{2-}$  [Ruzicka y Hansen, 1973]. En trabajos previos muy exhaustivos desarrollados recientemente por Trojanowicz se han estudiado el efecto de la variación del pH y la presencia de ligandos complejantes en el medio de calibración. Este estudio fue realizado en discontinuo con un electrodo selectivo de ion cadmio de Orion modelo 94-48 A. Los resultados obtenidos demuestran que se producen mayor o menor desadsorción de iones cadmio presentes en la superficie de la membrana en función del pH. Se observó que un aumento del pH provocaba una disminución de Cd libre ( $pCd$  mayor) y un aumento de sensibilidad [Trojanowicz et al., 1998].

El estudio realizado en este trabajo ha sido similar pero llevado a cabo en flujo con el sistema SIA propuesto (figura 1A). Se han realizado calibrados de distintos electrodos

utilizando soluciones portadoras de  $\text{KNO}_3$  0,1M a distintos pH. Las soluciones patrón de Cd (II) fueron realizadas en un fondo de igual composición. Las soluciones portadoras estudiadas han sido soluciones de  $\text{KNO}_3$  0,1M preparadas en tampón acético/acetato pH=5, en agua desionizada (pH=5,2); con adición de una solución de borato sódico 0,1M hasta pH=8,3; y en tampón borato a pH= 9,1.

Se han realizado calibrados por duplicado con cada una de las soluciones portadoras en días diferentes de trabajo para cuatro electrodos diferentes. El ciclo de análisis es el mostrado en la tabla 6.1 para el MDN. Se ha comparado la zona lineal y la pendiente media obtenida para cada una de las soluciones portadoras. En la tabla 6.6 se muestran los resultados obtenidos; donde,  $n$  es el número de sensibilidades utilizadas en el cálculo, obtenidas a partir de curvas de calibración con un mínimo de 7 puntos.

**Tabla 6.6** Resultados obtenidos en el estudio del efecto del pH en la solución portadora.

| pH  | Pendiente<br>(mV·dec <sup>-1</sup> ) | <sup>a</sup> Estabilidad respuesta<br>(mV·dec <sup>-1</sup> ) | n | Intervalo lineal<br>(M)               | r     |
|-----|--------------------------------------|---|---|---------------------------------------|-------|
| 5,0 | 22,53                                | ± 0,77  | 6 | $3 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-1}$ | 0,996 |
| 5,2 | 24,54                                | ± 1,22  | 7 | $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-1}$ | 0,998 |
| 8,3 | 25,33                                | ± 1,41  | 7 | $2 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-1}$ | 0,999 |
| 9,1 | 47,45                                | ± 1,52  | 6 | $5 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-1}$ | 0,990 |

<sup>a</sup>Estimada como  $s_{(n-1)}$  para la media de  $n$  valores. El intervalo lineal y  $r$  son valores de un calibrado tipo.

La mejor sensibilidad mayor se ha obtenido al aumentar el pH, en concreto para 8,3. Resultados similares se obtuvieron en los estudios antes referenciados [Trojanowicz, 1998]. A pH 9,1 se ha obtenido un resultado anómalo debido al intervalo de pH de trabajo para el electrodo evaluado (tabla 6.6). La sensibilidad media obtenida a pH 9,1 es superior que las sensibilidades obtenidas a pH inferiores. Esta respuesta anómala del electrodo puede estar relacionada con el intervalo de pH óptimo en que la respuesta del electrodo no se ve afectada por el pH. En el trabajo previo referenciado no existió este problema dado el mayor intervalo de pH de trabajo para el electrodo utilizado. Puede comprobarse que a pesar del ligero aumento de la pendiente obtenido a pH=8,3, el intervalo de respuesta lineal disminuye. Se decide trabajar con la solución portadora inicial de  $\text{KNO}_3$  0,1M a pH=5,2 ya que a este pH se minimiza la posibilidad de que precipiten en el tubo los hidróxidos de metal.

Los coeficientes de selectividad potenciométrica ( $K^{\text{pot}}$ ) y el efecto del pH en la señal del electrodo, sólo han sido estudiados para el modo de detección normal. En trabajos previos en donde se comparan estos parámetros en tres modos de detección distintos para electrodos sensibles a ion cadmio, no se encontraron diferencias significativas respecto al

modo de detección normal [Couto, 1999]. También en este capítulo (tabla 6. 5) se acaba de comprobar que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para el modo de detección normal en la técnica SIA frente al mismo electrodo de membrana cristalina implementado en un sistema FIA.

#### 6.4.2 Optimización del sistema SIA con modo de detección diferencial

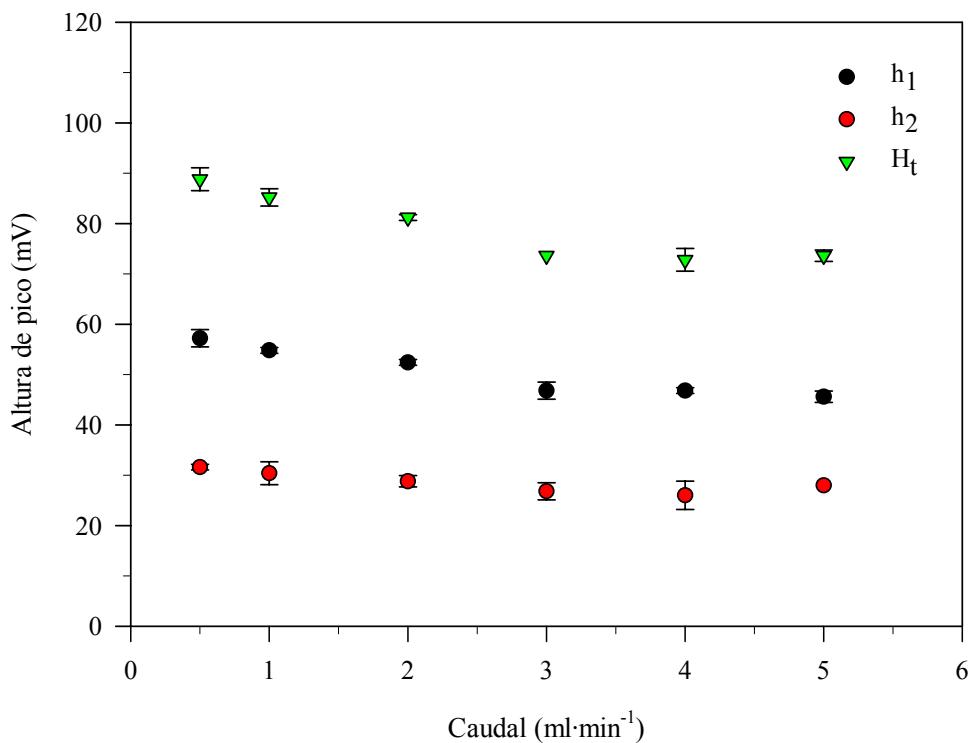
Como se ha comentado en la introducción del apartado, para incrementar la sensibilidad ( $\text{mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ ) y disminuir el LD del método propuesto, se estudió la alternativa de la detección diferencial. Un control adecuado de la dispersión de la muestra permite una variación de potencial en uno de los electrodos, mientras el otro se mantiene a potencial constante. De esta manera, la sensibilidad del detector, definida como la diferencia de potencial entre las dos señales observadas, corresponderá a un valor máximo. En el caso ideal la sensibilidad debería ser el doble de la respuesta Nernstiana teórica.

En sistemas de flujo sin reacción química, la respuesta del detector depende exclusivamente de la dispersión física de la muestra. El proceso de dispersión se ve afectado sobre todo por parámetros hidrodinámicos y geométricos del sistema, pero también se puede ver afectado por el dispositivo de inyección y la configuración del de la célula de flujo del detector [Haemmerli et al., 1982]. Sin embargo la eficacia de los electrodos tubulares para medidas diferenciales en flujo ha quedado demostrada en diversas aplicaciones [Barber, 1992; Couto, 1999]. El uso de electrodos tubulares permite mantener constantes las características hidrodinámicas de la porción de muestra inyectada, minimizando el tiempo necesario para que la señal del primer electrodo recupere el valor de la línea de base, y obteniéndose mejores resultados combinados.

Con el fin de obtener la máxima sensibilidad, se estudió la influencia de los distintos parámetros en la respuesta del detector. En todos los casos se determinó la altura de ambos picos (en valor absoluto) y su suma (en valor absoluto). Las variables estudiadas en sistema SIA (figura 1B) han sido: caudal, volumen de inyección, distancia entre la válvula selectora y el primer electrodo (**L1**), y la distancia entre los electrodos tubulares (**L2**). El ciclo de operación es el presentado en la tabla 6.1 para el MDD. Aunque durante el proceso de optimización se han variado los tiempos de aspiración y caudales que permiten definir los volúmenes de muestra analizados.

Las condiciones de operación iniciales han sido las optimizadas para el MDN (§ 6.4.1), un volumen de muestra de 218  $\mu\text{l}$ , y  $L_1=20$  cm. La distancia  $L_2$  se ha fijado inicialmente en 200cm. La solución portadora ha sido  $\text{KNO}_3$  0,1M con Cd (II)  $2\cdot10^{-5}$  M. La concentración analizada de ion cadmio ha sido  $5\cdot10^{-4}$  M para asegurar un menor tiempo de retorno a la línea base y favorecer la velocidad de muestreo. La optimización ha consistido en la

variación sucesiva de los distintos parámetros que afectan directamente a la dispersión del segmento de muestra inyectado.

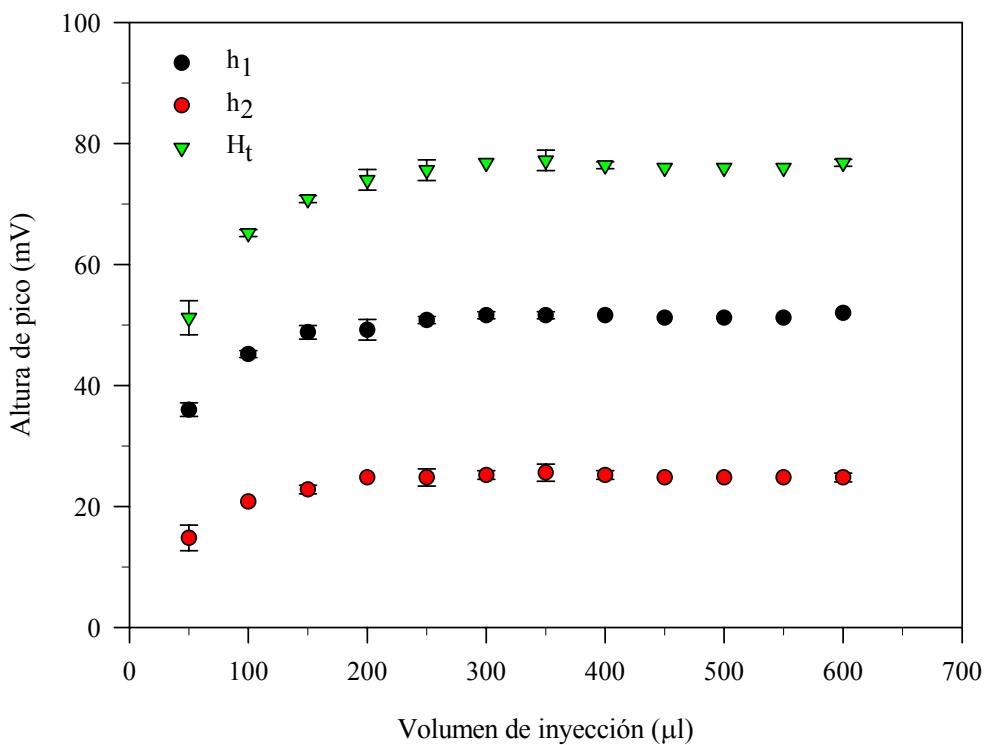


**Figura 6.12** Influencia del caudal en la señal analítica obtenida con el modo de detección diferencial, para una  $[Cd^{2+}] = 5 \cdot 10^{-4} M$ . El error está calculado como  $s(n-1)$  para  $n=2$ .

El primer parámetro estudiado ha sido el efecto del caudal de la solución portadora. El caudal ha sido estudiado estableciendo un compromiso entre el tiempo de paso por el detector y la máxima altura de pico, especialmente para el segundo detector. El intervalo estudiado de caudales ha sido  $0,5-5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Se ha observado que a caudales elevados existe una disminución de la señal. Cuando se usan caudales altos, la velocidad lineal de la muestra pasando a través del electrodo es tan alta que, para los volúmenes de inyección utilizados, la membrana es incapaz de alcanzar el potencial máximo (figura 6.12). Ninguno de los electrodos es capaz de alcanzar el máximo frente a un potencial constante suministrado por el contrario.

El volumen de muestra inyectada afecta en el mismo grado a las señales de los dos electrodos y, por tanto a la respuesta total. Se ha observado que a volúmenes inferiores a  $200 \mu\text{l}$ , la señal es menor debido a la mayor dispersión que sufre la muestra (figura 6.13). Para volúmenes más elevados se obtiene una respuesta constante del detector. En estas condiciones, la señal del primer electrodo alcanza su valor máximo y suministra un potencial constante ya que no hay dispersión. Como consecuencia, la señal debida al

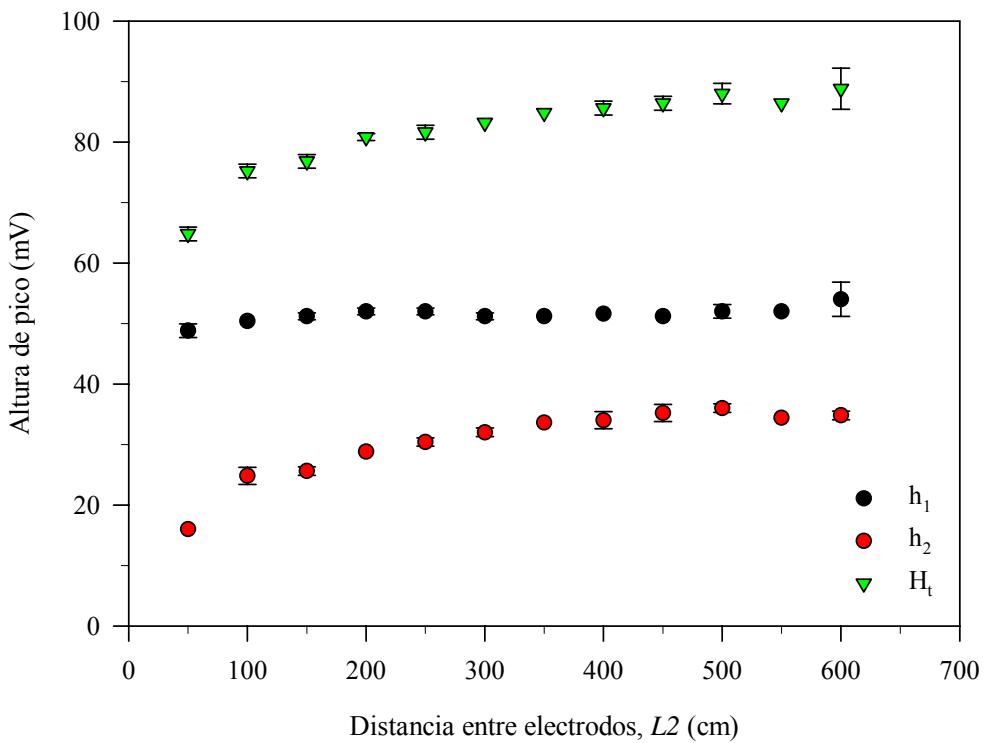
segundo electrodo permanece constante. La única diferencia observada es una meseta intermedia entre los picos positivo y negativo, que se hace menor al incrementar el volumen de inyección.



**Figura 6.13** Influencia del volumen de inyección en la señal analítica obtenida en el modo de detección diferencial, para una  $[Cd^{2+}] = 5 \cdot 10^{-4} M$ . El error está calculado como  $s(n-1)$  para  $n=2$ .

La distancia  $L_1$ , distancia desde el puerto central de la válvula selectora (VS1) hasta la toma de tierra, ha sido estudiada también (figura 1 B). Se han estudiado cuatro distancias: 20, 50, 100 y 150 cm. El aumento de distancia provoca una disminución de señal para ambas alturas de pico, al aumentar la dispersión efectiva. Esta disminución es poco significativa para longitudes menores de 100 cm. Para 150 cm se observa una disminución de 10 mV en la señal analítica. Se ha decidido fijar la distancia a 20 cm que es la mínima distancia experimental posible.

Finalmente, se determinó la influencia sobre la señal de la distancia entre los dos electrodos,  $L_2$  (figura 1B). Se han estudiado 12 longitudes distintas entre 50-600 cm. Para todas ellas, la señal correspondiente al primer electrodo permanece constante. Este resultado era esperable ya que la dispersión permanecerá constante si el volumen de inyección y  $L_1$  son constantes. La señal del segundo electrodo aumenta con la longitud del tubo. Esto es debido al menor solapamiento de los dos picos al aumentar la distancia. Este aumento desaparece, sin embargo, a partir de 400 cm, obteniéndose para longitudes mayores valores constantes de la señal.



**Figura 6.14** Influencia de la distancia entre los dos electrodos ( $L_2$ ) en la señal analítica obtenida con el modo de detección diferencial, para una  $[Cd^{2+}] = 5 \cdot 10^{-4} M$ . El error está calculado como  $s(n-1)$  para  $n=2$ .

Para longitudes mayores a 400 cm, el aumento de la dispersión contrarresta el aumento de señal debida a un menor solapamiento entre picos. Esta situación, cuando se utilizan volúmenes de inyección muy pequeños, puede provocar una disminución en la altura del segundo pico. Como se ve en los resultados la señal del segundo electrodo siempre ha sido inferior que la del primero (figura 6.14).

Esto implica que no es posible obtener señales no solapadas, incluso utilizando electrodos tubulares de flujo, y tener simultáneamente una baja dispersión de la muestra. La señal del primer electrodo consigue alcanzar un máximo antes de que la muestra llegue al segundo, pero éste último siempre mide una señal solapada, influenciada por la anterior o afectada por la dispersión, y este hecho provocará siempre una disminución en el potencial alcanzado por el segundo electrodo.

Es necesario encontrar una situación de compromiso entre la dispersión de la muestra en el sistema y el solapamiento de las señales, que en la situación real, permita alcanzar el valor teórico de  $59 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$ . De acuerdo con las figuras 6.12, 6.13, y 6.14, los valores óptimos seleccionados de los parámetros de operación han sido: caudal,  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; volumen de muestra,  $350 \mu\text{l}$ ;  $L_1$ , 20 cm y  $L_2$ , 400 cm. En estas condiciones, la frecuencia de análisis ha

sido  $30 \text{ h}^{-1}$  para la concentración superior del intervalo de trabajo ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ) y  $60 \text{ h}^{-1}$  para las concentraciones inferiores (menores de  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ).

Como conclusión en la tabla 6.7 se muestran las condiciones de operación optimizadas para la determinación de ion cadmio mediante dos modos de detección implementados en un sistema SIA.

**Tabla 6.7** Características de operación óptimas para MDN y MDD.

| Parámetro                                    | MDN | MDD |
|--|-----|-----|
| Volumen de muestra ( $\mu\text{l}$ )         | 218 | 350 |
| Caudal ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) | 3   | 2   |
| $L_1$ (cm)                                   | 20  | 20  |
| $L_2$ (cm)                                   | 5   | 400 |

### 6.4.3 Caracterización de los dos modos de detección

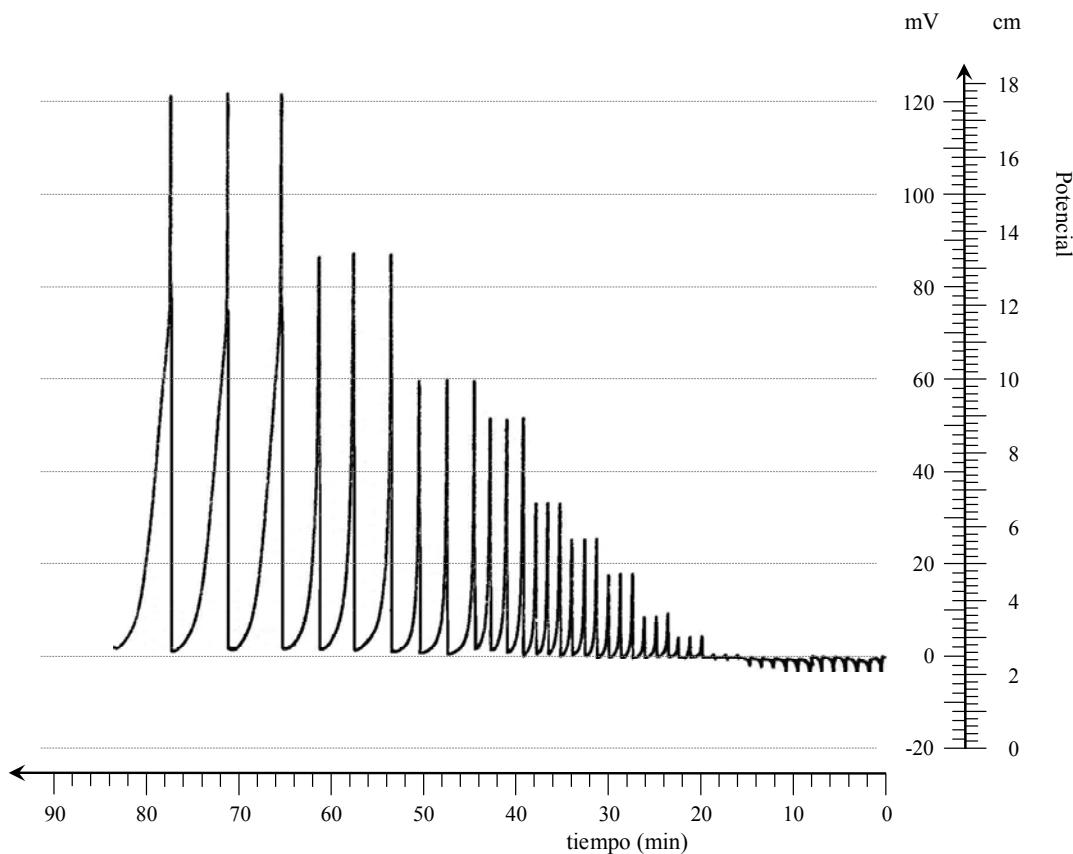
Después de la optimización de los dos sistemas SIA con MDN y MDD, se han efectuado las correspondientes curvas de calibración, con soluciones de ion cadmio de distinta concentración con la fuerza iónica ajustada. Las características evaluadas han sido los parámetros de calibración, la repetitividad, la estabilidad del potencial y la frecuencia de muestreo. Los resultados comparativos de ambos sistemas se muestran resumidos en la tabla 6.8 del apartado 6.4.5.

#### 6.4.3.1 Modo de detección normal

Antes de la determinación del límite de detección se realizó un estudio previo del fondo de Cd mínimo a introducir en la solución portadora para favorecer la recuperación de la línea de base (§6.4). Con este objetivo se analizaron patrones de ion cadmio de concentración  $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ , utilizando como solución portadora de  $\text{KNO}_3$  0,1 M con concentración variable de ion cadmio. Las concentraciones estudiadas han sido: 0,  $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ,  $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ,  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ,  $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Para concentraciones mayores de  $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  se ha obtenido una buena recuperación de la línea de base, la misma señal analítica y una alta repetitividad. Para esta concentración y las superiores, la RSD (%) obtenida ha sido menor del 1%, para una media de tres señales.

La determinación del límite de detección se ha realizado con los datos procedentes de un calibrado tipo con 14 puntos. Las curvas de calibración han sido construidas por representación de las alturas de pico obtenidas frente al logaritmo de la concentración (asimilado a actividad) para cada patrón analizado por triplicado. La sensibilidad de los electrodos ha sido obtenida por regresión lineal en el intervalo correspondiente a la zona

Nerstiana  $H=K+s \times \log (X)$ , donde  $H$ ,  $K$ ,  $S$  y  $X$  son respectivamente, la altura de pico, la ordenada en el origen, la sensibilidad del electrodo, y la concentración de ion cadmio. El cálculo del límite de detección se ha efectuado mediante un ajuste no lineal de todos los datos experimentales del calibrado. Se ha utilizado la expresión derivada de la ecuación de Nikolskii-Eisenman  $H=A+B \cdot \log(X+C)$  donde  $A$  y  $B$  son consideradas, respectivamente, como la ordenada y la sensibilidad del ISE en todo el rango de concentración. El parámetro  $C$  es una modificación del límite de detección que incluye el efecto de las interferencias (§ 3.3.2.2). En ausencia de interferencias el parámetro  $C$  puede considerarse el límite de detección aparente del sistema ( $LD_{ap}$ ).



**Figura 6.15** Fiagrama de las señales obtenidas en un calibrado efectuado para el modo de detección normal. Los análisis se han realizado por triplicado. Las concentraciones analizadas son de derecha a izquierda:  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $8,89 \cdot 10^{-3}$  y  $1 \cdot 10^{-1}$  M.

Los cálculos han sido realizados con un software de *Sigma Plot 8.0* basado en el algoritmo Marquart-Levenberg [Rao, 1987]. Este tratamiento numérico ha sido aplicado en trabajos previos con detección potenciométrica en el Grup de Sensors i Biosensors [Barquero, 2001]. Los valores obtenidos en el resto de calibrados realizados en este estudio son similares. No se han obtenido diferencias significativas entre ellos. El valor del  $LD_{ap}$  es para este electrodo de  $7,98 \cdot 10^{-6}$  M.

En la figura 6.15 se muestra las señales obtenidas para el calibrado utilizado en la estimación del límite de detección aparente y en la figura 6.17 (§ 6.4.5) se muestra la curva de calibración correspondiente al ajuste no lineal. El límite inferior de respuesta lineal se ha estimado como la mínima concentración de ion cadmio analizable de un modo repetitivo dentro de la zona de respuesta Nerstiana del electrodo es  $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . El límite superior de respuesta lineal, definido como el extremo superior del intervalo de respuesta Nerstiana, es  $1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ . La frecuencia de muestreo se ha estimado en  $60\text{-}120 \text{ h}^{-1}$ , dependiendo de la concentración de la muestra.

La repetitividad de la señal analítica ha sido evaluada realizando dieciséis replicados de 3 patrones intermedios dentro del intervalo lineal de trabajo. Las concentraciones estudiadas han sido  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  y  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  de ion cadmio. La desviación estándar media obtenida ha sido  $\pm 0,435 \text{ mV}$ .

La estabilidad de los potenciales ha sido determinada mediante la realización de calibrados sucesivos durante un día de trabajo. Durante 8 horas se realizaron pares de calibrados con una separación de tiempo de 2h. Los resultados mostraron una buena estabilidad del electrodo tubular con una variación en la sensibilidad de  $\pm 0,425 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$ , estimada como la desviación estándar del promedio de sensibilidades.

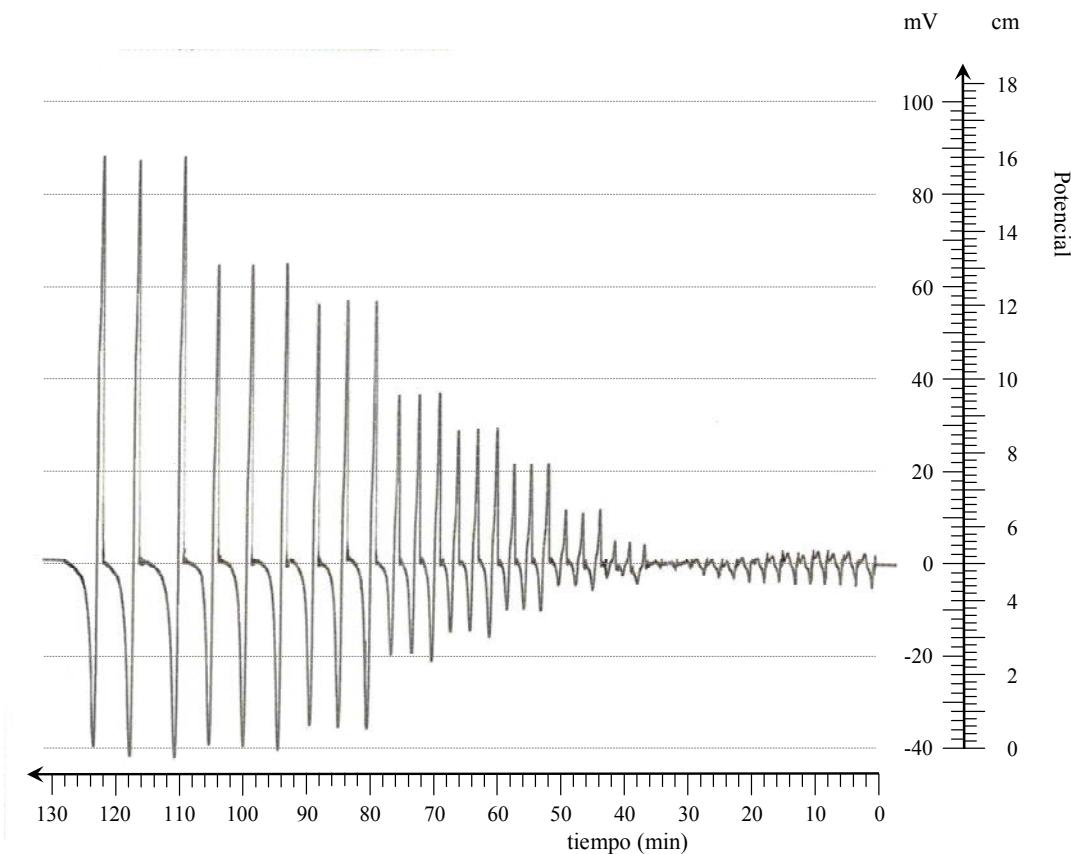
En general los resultados obtenidos en el sistema SIA con detección normal son algo mejores que los obtenidos en el sistema FIA con detección normal referenciado [Ferreira, 1994]. En concreto el LIRL, la sensibilidad, la repetitividad y la estabilidad. Los parámetros significativamente diferentes son el intervalo de pH óptimo y la frecuencia de muestro. Aparte de la frecuencia de muestreo que siempre es menor en la técnica SIA, las diferencias observadas en el rango de pH no parecen estar relacionadas con la técnica, sino, probablemente, con el proceso de fabricación de la membrana. En la tabla 6.8 (§ 6.4.5) figuran resumidas las principales características de respuesta del sistema SIA con modo de detección normal.

#### 6.4.3.2 Detección diferencial

Las características de la respuesta de los electrodos sensibles a ion cadmio dispuestos en modo secuencial (figura 1B) han sido determinadas después de optimizar las variables físicas del sistema de forma análoga a la descrita en el apartado 6.4.3.1.

En la tabla 6.8 (§ 6.4.4) se muestran las características de respuesta del sistema SIA con MDD, obtenidas para calibrados sucesivos realizados en las condiciones óptimas de operación. Se han obtenido diferencias significativas respecto al modo de detección normal. Respecto a la sensibilidad del método, la pendiente de la curva de calibración es

superior (tabla 6.8), aunque no se ha alcanzado el aumento de sensibilidad esperado teóricamente de  $59 \text{ mV}\cdot\text{decada}^{-1}$ . Se ha de tener en cuenta que la pendiente obtenida cuando se trabaja con un electrodo únicamente (MDN) tampoco es la teórica sino algo menor. En la estimación del intervalo lineal de trabajo y el límite de detección aparente se ha procedido de acuerdo con lo descrito en el § 3.3.2.2. El límite inferior de respuesta lineal para el sistema con modo de detección diferencial es menor que en el sistema con detección normal. El LIRL en el MDD es  $5\cdot10^{-6} \text{ M}$  y el LSRL también es menor, en concreto  $1\cdot10^{-2} \text{ M}$ . En la figura 6.16 se muestran las señales obtenidas para el calibrado utilizado en la caracterización.



**Figura 6.16** Fiagrama de las señales obtenidas para un calibrado efectuado con el modo de detección diferencial. Los análisis se han realizado por triplicado. Las concentraciones analizadas son de derecha a izquierdo:  $1\cdot10^{-7}$ ,  $2,5\cdot10^{-7}$ ,  $5\cdot10^{-7}$ ,  $1\cdot10^{-6}$ ,  $2,5\cdot10^{-6}$ ,  $5\cdot10^{-6}$ ,  $1\cdot10^{-5}$ ,  $2,5\cdot10^{-5}$ ,  $5\cdot10^{-5}$ ,  $1\cdot10^{-4}$ ,  $5\cdot10^{-4}$ ,  $1\cdot10^{-3}$ ,  $8,89\cdot10^{-3}$  y  $1\cdot10^{-1} \text{ M}$ .

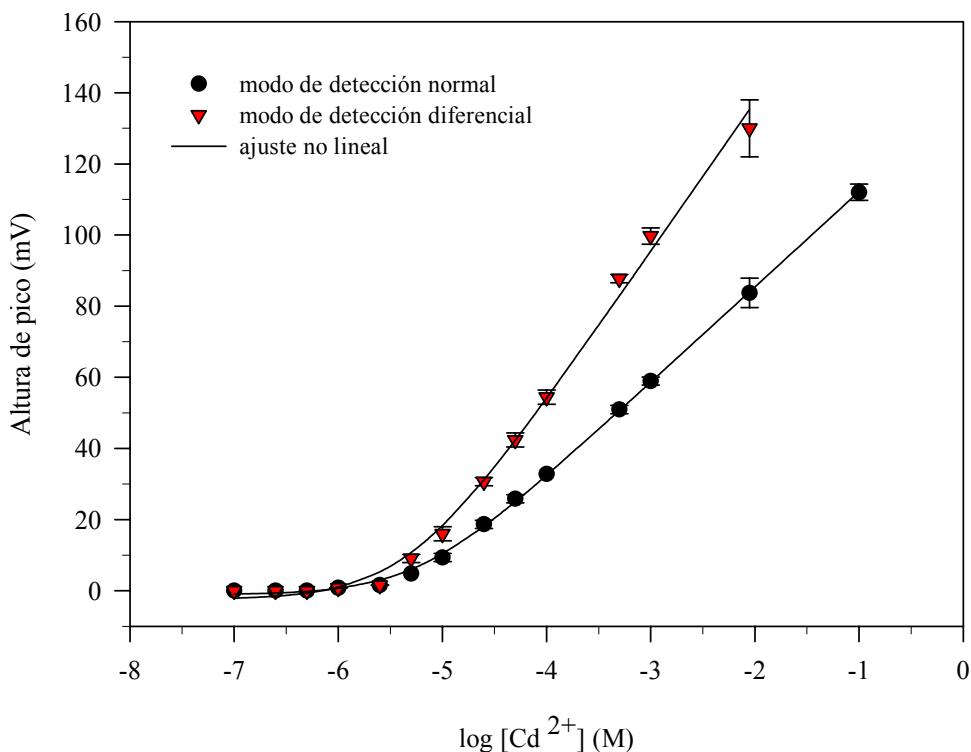
La estimación del límite de detección aparente se ha realizado mediante un ajuste no lineal de todos los puntos de calibración (§ 6.4.4.1). Se ha obtenido un  $\text{LD}_{\text{ap}}$  menor que en el sistema con detección normal, de  $4,66\cdot10^{-6} \text{ M}$ . El  $\text{LD}_{\text{ap}}$  se ha calculado para un calibrado tipo con  $n=13$ ; donde, cada altura de pico es la media de la señal obtenida en tres replicados del patrón correspondiente (figura 6.17). La frecuencia de muestreo se ha estimado en  $30-60 \text{ h}^{-1}$ , dependiendo de la concentración de la muestra. La repetitividad se

ha calculado como la media de la desviación estándar, de las medias de 16 replicados de tres concentraciones distintas de ion cadmio. Se han obtenido variaciones de  $\pm 0.834$  mV. La estabilidad de los potenciales durante un día de trabajo ha sido  $\pm 0,746$  mV·dec<sup>-1</sup>.

Los resultados del sistema SIA con modo de detección diferencial no difieren significativamente de los obtenidos en el sistema FIA con modo de detección diferencial, desarrollado anteriormente [Couto, 1999]. La diferencia principal está en el LIRL que con la técnica SIA ha disminuido un orden de magnitud. El resto de variables no son significativamente diferentes, excepto la frecuencia de muestreo inferior siempre en esta técnica de flujo.

#### 6.4.4 Comparación de los dos modos de detección

En este apartado se muestran a título comparativo los resultados obtenidos en los sistemas SIA con los dos modos de detección implementados. En la figura 6.17 se muestra la comparación de las curvas de calibración obtenidas y el ajuste no lineal.



**Figura 6.17** Curvas de calibración obtenidas para dos calibrados efectuados con el sistema SIA en el modo de detección normal y en el modo de detección diferencial. Cada punto es la media de tres determinaciones. El error se ha calculado como I<sub>95%</sub>.

En la tabla 6.8 se muestran los resultados de ambos modos de detección. Se puede observar que la diferencia más significativa entre éstos es el aumento de sensibilidad que sin llegar al valor teórico esperado presenta una mejora sensible. Este aumento resulta más evidente

para las concentraciones más bajas de ion cadmio; esto se debe a que el proceso de lavado de la membrana es más lento para altas concentraciones de analito. Este hecho resulta evidente en la disminución del LIRL y el LSRL. El  $LD_{ap}$  también mejora sensiblemente, disminuyendo aunque la diferencia no es muy grande. A título de ejemplo se ha mostrado en la figuras 6.15 y 6.16 el registro de las señales obtenidas para dos calibrados efectuados en las condiciones óptimas en ambos modos de detección.

**Tabla 6.8** Principales características del los dos modos de detección implementados. La sensibilidad está calculada con el ajuste lineal ( $H=K+s\cdot\log(X)$ ) y el límite de detección con el ajuste no lineal ( $H=A+B\cdot\log(X+C)$ , donde  $C=LD_{ap}$ ). El error en el  $LD_{ap}$  está calculado como el error estándar y en la sensibilidad como  $s_{(n-1)} \cdot t_{(n-2)}$ .

| Parámetro  | SIA con MDN                                   | SIA con MDD                                   |
|--|---|---|
| Sensibilidad ( $\text{mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ ) | 25,3 ( $\pm 0,6$ )                            | 39 ( $\pm 3$ )                                |
| Intervalo lineal (M)                             | $1\cdot 10^{-5}$ - $1\cdot 10^{-1}$           | $5\cdot 10^{-6}$ - $8,89\cdot 10^{-3}$        |
| $LD_{aparente}$ (M)                              | $5,9\cdot 10^{-6}$ ( $\pm 0,4\cdot 10^{-6}$ ) | $4,7\cdot 10^{-6}$ ( $\pm 1,0\cdot 10^{-6}$ ) |
| n lineal (r)/n no lineal                         | 8 (0,999) / 14                                | 7 (0,997)/13                                  |
| Estabilidad ( $\text{mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ )  | 0,425   | 0,746   |
| Repetitividad (mV)                               | 0,435   | 0,834   |
| Frecuencia de muestreo ( $\text{h}^{-1}$ )       | 60-120  | 30-60   |

## 6.5 Incorporación de una etapa de preconcentración en línea

Como se ha comprobado en el apartado anterior (§ 6.4), la sustitución del modo de detección normal por el modo de detección diferencial aporta mayor sensibilidad al sistema SIA y una pequeña disminución del límite de detección (tabla 6.8). No obstante, esta mejora no permite la aplicación del sistema diseñado en la determinación de ion cadmio en aguas de consumo donde la concentración máxima permitida es de 0,005 ppm (aprox.  $5\cdot 10^{-8}$  M) [REAL DECRETO 140/2003]. El límite de detección del sistema SIA en ambos modos de detección está por encima de este valor (tabla 6.8). Adicionalmente la presencia de ion cadmio en aguas de otra procedencia como aguas residuales la mayoría de las veces, está acompañada por la presencia de otros metales pesados como plomo y cobre que presentan interferencia en la respuesta del electrodo. En este caso, la concentración de catión cadmio permitida para el vertido a cauce público es 0,1 ppm (aprox.  $9\cdot 10^{-7}$  M) [Directiva 83/513/CEE]. Resulta, por tanto, necesaria la incorporación de una etapa de separación/preconcentración en línea que permita determinar concentraciones menores de ion cadmio y, simultáneamente, eliminar las interferencias de otros metales presentes en la muestra.

Con este objetivo se ha estudiado la implementación de una etapa de preconcentración en línea de ion cadmio, en forma de clorocomplejo, que permitirá solventar las limitaciones de los sistemas SIA (MDN y MDD) desarrollados. A continuación en los subapartados siguientes se describe detalladamente el proceso total de optimización.

### 6.5.1 Descripción del sistema experimental con etapa de preconcentración

El sistema SIA utilizado se muestra esquemáticamente en el apartado 6.2.1 de este capítulo, figura 6.2 con los dos modos de detección estudiados. La secuencia final del programa de gestión de fluidos se ha explicado en la tabla 6.3 (§ 6.2.4.3). Las etapas básicas de este proceso son: aspiración simultánea de la muestra y el reactivo durante 300s a través de la válvula solenoide (VS3); retención del  $[CdCl_4]^{2-}$  formado en la columna; y, finalmente, elución del cadmio retenido en forma de clorocomplejo utilizando una solución de  $NaNO_3$  1,5 M durante 240 s o 600 s, dependiendo del modo de detección.

En primer lugar se ha estudiado la composición del reactivo complejante óptima para conseguir la retención completa del ion cadmio presente en la muestra. También ha sido estudiada la influencia de la concentración del eluyente en la eficacia del proceso de elución. Estos estudios preliminares han sido realizados en discontinuo en tres etapas. La primera ha sido la preconcentración en una columna de intercambio aniónico de soluciones patrón de cadmio, preparadas en  $NaCl$ . En la segunda etapa se determinó la concentración de Cd (II) por EAA en la solución de eluato recogida a la salida de la columna durante el proceso de preconcentración. En la tercera etapa se ha procedido al análisis de estas mismas disoluciones en el sistema SIA con MDN (figura 6.1A). La comparación de los resultados obtenidos en estas dos últimas etapas permite verificar la coincidencia entre las medidas espectrofotométricos y potenciométricas, y obtener información sobre los posibles estados iónicos en que se encontraba el cadmio presente.

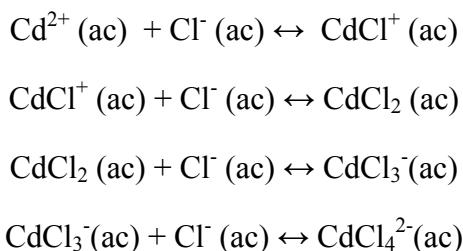
Una vez optimizada la concentración del reactivo complejante se estudió la eficacia de la etapa de elución para distintas concentraciones de  $NaNO_3$ . En este estudio también fueron analizadas alícuotas del cadmio eluido mediante EAA y potenciometría en el sistema SIA con modo de detección normal.

Finalmente, se han comparado los resultados obtenidos en discontinuo con los obtenidos al realizar la reacción de formación de clorocomplejo en línea, estudiando las variables que afectan a la formación del clorocomplejo, el proceso de preconcentración y el proceso posterior de determinación del ion cadmio eluido. El objetivo final es obtener registros analíticos lo más sensibles posibles, en un amplio intervalo de concentración con un máximo de repetitividad y reproducibilidad.

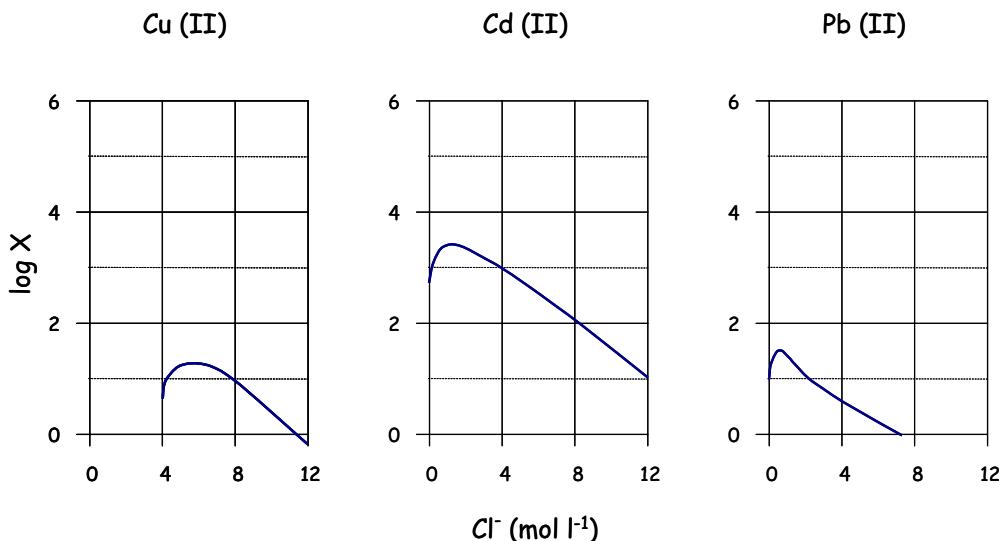
Se ha estudiado también el tipo de secuencia de preconcentración y elución, las dimensiones de la columna, la longitud del tubo de reacción (**D1+D2**), que es la distancia entre la VS3 y la entrada a la columna del sistema mostrado en la figura 6.2A, el tiempo de preconcentración óptimo y la distancia entre los electrodos (**L2**) en el modo de detección diferencial.

### 6.5.2 Estudio de la reacción de complejación en discontinuo

El ion cadmio forma complejos con diferentes haluros en soluciones acuosas [Marczenko, 1985], siendo menor la tendencia de formación de complejos cuando menor es el peso molecular del haluro,  $I^- > Br^- > Cl^-$  [Kallmann et al., 1960]. En este trabajo se optó utilizar el anión cloruro como complejante, teniendo en cuenta la estabilidad química de las soluciones de cloruro, en comparación con, por ejemplo, las soluciones de yoduro. El Cd (II) forma complejos con el anión cloruro siguiendo las siguientes reacciones [Snoeyink y Jenkins, 1995]:



Las diferentes estabilidades y la cinética de formación de los complejos metálicos, así como la selección de una concentración adecuada de reactivo complejante y de un intercambiador iónico adecuado, permiten separar el Cd (II) de los otros elementos metálicos, como ya se ha demostrado anteriormente por otros autores [Vandecasteele y Block, 1984; Ferreira et al., 1990; Neto et al., 1995a, Neto et al., 1995b; Hayashibe y Samaya, 1996; Burguesa et al., 1988, Couto et al., 1998]. En la figura 6.18 se pueden observar los diferentes coeficientes de distribución ( $\log X$ ) en una resina de intercambio aniónico como la de este trabajo [Vandecasteele y Block, 1984], referentes a cobre (II), cadmio (II), y plomo (II), en función de la concentración de anión cloruro. De esta manera, teniendo en cuenta los diferentes coeficientes de distribución, y la dependencia de la concentración  $Cl^-$  en la formación de los respectivos complejos, se pretende eliminar la interferencia de otros metales.



**Figura 6.18** Coeficientes de distribución (log X) referentes a cobre (II), cadmio (II) y plomo (II), en una resina de intercambio aniónico Dowex 1-X8, en función de la concentración de anión cloruro.

La utilización de una resina aniónica, concentraciones adecuadas de  $\text{Cl}^-$  y relaciones favorables de caudales y reactores, permitirán establecer condiciones experimentales para primar la formación y retención del complejo  $[\text{CdCl}_4]^{2-}$ , pudiendo eliminar otros cationes metálicos (especialmente Cu (II) y Pb (II)) en el eluato del proceso de preconcentración.

Para determinar la concentración de anión cloruro necesaria para la formación del complejo de cadmio  $[\text{CdCl}_4]^{2-}$ , se han estudiado disoluciones con distinta composición de NaCl y NaCl/HCl en un intervalo de concentración de 0,01 a 2,00 M. Las concentraciones de HCl estudiadas han sido 0,01 a 0,1 M. De esta manera, se pretendía estudiar el efecto combinado de la concentración de  $\text{Cl}^-$  y del pH ya que es necesaria una cantidad mínima de  $\text{Cl}^-$  y un gradiente de pH determinado para asegurar la complejación cuantitativa de todo el cadmio. Se optó por no estudiar concentraciones mayores de 2,00 M de  $\text{Cl}^-$  para evitar la formación de clorocomplejos con otros cationes metálicos interferentes [Vandecasteele y Block, 1984; Ferreira et al., 1990, Couto, 1999], como por ejemplo el catión Cu, Zn, Co, Fe o Mn. Así mismo una concentración elevada de  $\text{Cl}^-$ , podría provocar la elución del complejo de cadmio retenido. Diversos autores [Ferreira et al., 1990; Neto et al., 1995a] han señalado la importancia, para la formación del complejo, de trabajar en un medio ácido (HCl),

El procedimiento ha consistido en preconcentrar 5 ml de cada una de las soluciones preparadas con la misma concentración de  $\text{Cd}^{2+} 1 \cdot 10^{-4}$  M y las diferentes concentraciones estudiadas de NaCl y HCl. La elevada concentración de ion cadmio seleccionada permitirá asegurar que, si no existe saturación a este nivel de concentración tampoco existirá para concentraciones menores. Durante la etapa de preconcentración, el eluato ha sido recogido

y analizado, tanto por el método de referencia, espectroscopía atómica de absorción (EAA), como por el sistema SIA con modo de detección normal. Todos estos ensayos de preconcentración en discontinuo fueron realizados por triplicado en el sistema SIA de la figura 6.2 A, con la misma columna que se utilizará después en la optimización del sistema SIA con preconcentración en línea. A continuación, después de cada ensayo se ha eluido el cadmio preconcentrado con una disolución de  $\text{NaNO}_3$  de concentración elevada (2M) para asegurar la elución de todo el cadmio retenido [Couto, 1999].

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron verificar que para soluciones de  $\text{NaCl}$  de concentración menor o igual a 0,5 M, no había retención completa de ion cadmio en la resina, y para concentraciones mayores de 1,0 M tampoco, ya que en ambos casos se observó presencia de cadmio en el residuo de preconcentración. La concentración óptima parecía estar en el intervalo de concentración entre 0,5-1,0 M de  $\text{Cl}^-$ . Se repitieron los ensayos para concentraciones entre de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{HCl}$  entre 0,001-0,1 M, verificándose que la concentración mínima necesaria para que se produjese de forma cuantitativa la reacción de complejación era de 0,5 M  $\text{Cl}^-$  y 0,01 M  $\text{HCl}$ . Para concentraciones menores de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCl}$  se producía la pérdida de cadmio en la etapa de preconcentración. Esta relación podía variar en función de la concentración de  $\text{Cl}^-$ , resultando igualmente efectivas concentraciones mayores de  $\text{Cl}^-$  y menores de ácido. Finalmente, se escogió como óptima una concentración superior a 0,5 M de  $\text{Cl}^-$  para asegurar la retención cuantitativa del cadmio en la resina aniónica. Esta concentración es la que debería obtenerse después de la entrada de muestra y reactivo por la válvula solenoide (VS3, figura 6.2), para asegurar la reacción en línea. Si se tiene en cuenta la frecuencia de oscilación de la válvula solenoide, 25% aspiración de reactivo y 75 % aspiración de muestra, la concentración idónea para asegurar la concentración de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCl}$  en la reacción de complejación es 3,0 M de  $\text{NaCl}$  y 0,03 M de  $\text{HCl}$  (apartado 6.5.3.2), además se establece una situación de compromiso evitando que ocurra un gran consumo de reactivo y una elevada dispersión de analito.

Después de optimizada la concentración de reactivo complejante, se ha procedido al estudio de la composición de la solución de eluyente. Trabajos previos sobre la preconcentración de ion cadmio mediante la formación del complejo  $[\text{CdCl}_4]^{2-}$  demostraron que una disolución eluyente de  $\text{NaNO}_3$  proporcionaba una rápida elución y señales más reproducibles [Couto, 1999]. Se estudiaron concentraciones variables de nitrato de sodio entre 1,0-2,0 M, en presencia y ausencia de  $\text{HNO}_3$ . La introducción del medio ácido se realizó en base a estudios anteriores [Ferreira et al., 1990; Neto y col 1995a] que sugerían una mejora en el proceso de elución. El procedimiento ha consistido en preconcentrar 5 ml de soluciones preparadas con una concentración de ion cadmio (II)  $1 \cdot 10^{-4}$  M con reactivo complejante y en eluir después el cadmio retenido con 5 ml de soluciones de  $\text{NaNO}_3$  de distinta concentración.

La elución con ácido no presentó ventajas, y hacia necesaria la incorporación de un sistema tampón posterior para minimizar posibles variaciones en la respuesta del electrodo por efecto de gradientes de pH. Además, este ajuste provocaría una mayor dispersión del analito antes de la detección. Finalmente la concentración escogida fue 1,5 M NaNO<sub>3</sub>, concentración suficiente para permitir la elución total del cadmio retenido, sirviendo simultáneamente como solución ajustadora de la fuerza iónica.

La comparación de resultados del análisis del eluato, obtenidos por EAA y mediante detección potenciométrica en el sistema SIA con MDN, ha permitido concluir que la etapa de elución para la solución escogida ocurría correctamente con un rendimiento próximo al 100%. Dado que el intercambiador iónico está constituido por partículas con una granulometría muy pequeña y para evitar el empaquetamiento gradual, y consecuente la obstrucción final de la columna, la etapa de elución se realizó a contracorriente. Además el proceso en contracorriente favorece la elución del analito porque se mantienen el gradiente de concentración máximo durante el proceso de elución.

### 6.5.3 Etapa de preconcentración en línea

Una vez optimizadas la composición del reactivo complejante y de la solución eluyente, se ha procedido a la implementación por etapas de las distintas secuencias que configuran el proceso global en el sistema SIA con preconcentración en línea. En primer lugar se estudió el proceso de retención del clorocomplejo, llevando a cabo la reacción en discontinuo fuera del sistema; y la posterior elución y, detección del cadmio retenido mediante el sistema SIA con preconcentración y modo de detección normal (figura 6.2). La distancia entre la válvula solenoide y la parte inferior de la columna se ha fijado en 27 cm. Esta distancia (**D1+D2**) es el reactor donde se forma el clorocomplejo, a partir del analito presente en la muestra y el reactivo aspirados simultáneamente a través de la válvula solenoide (VS3). La distancia **L1** se ha mantenido en 20 cm (figura 6.1 A) y **L2** ha sido optimizada posteriormente en el sistema con preconcentración y detección diferencial.

#### 6.5.3.1 Reacción en discontinuo con preconcentración en línea

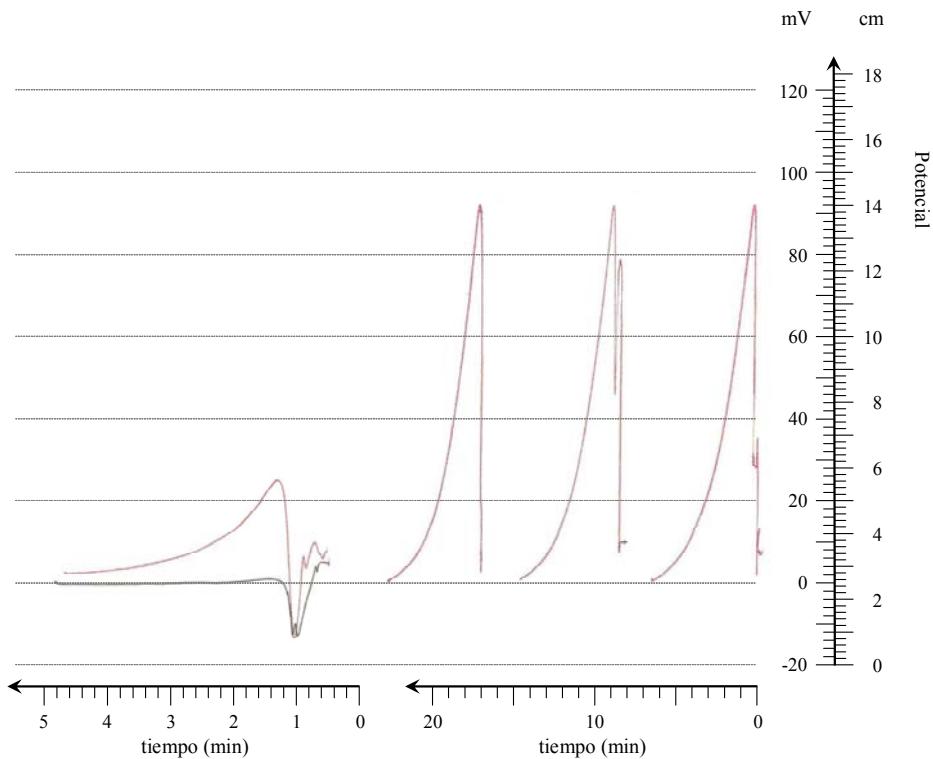
En esta primera etapa se ha estudiado la incorporación de la etapa de preconcentración y de detección en línea. De esta manera se ha evaluado simultáneamente la eficacia de la elución y la detección, antes de introducir la variable de reacción en línea, previa a la etapa de retención. Con este objetivo se han preparado soluciones patrón con distinta concentración de ion cadmio y la concentración de Cl<sup>-</sup> y HCl óptimas. Se ha establecido una secuencia de análisis que incluye la etapa de preconcentración y la etapa de elución. Esta consiste en la aspiración durante 180 segundos de los patrones y la elución posterior durante 120-240 s, en función de la concentración de ion cadmio. En este estudio se ha

fijado un caudal de aspiración a 0,78 ml/min. Este es el caudal máximo de paso que no ha provocado fenómenos de sobrepresión en el sistema. En este estudio previo, el caudal de elución se ha fijado en 1,70 ml/min.

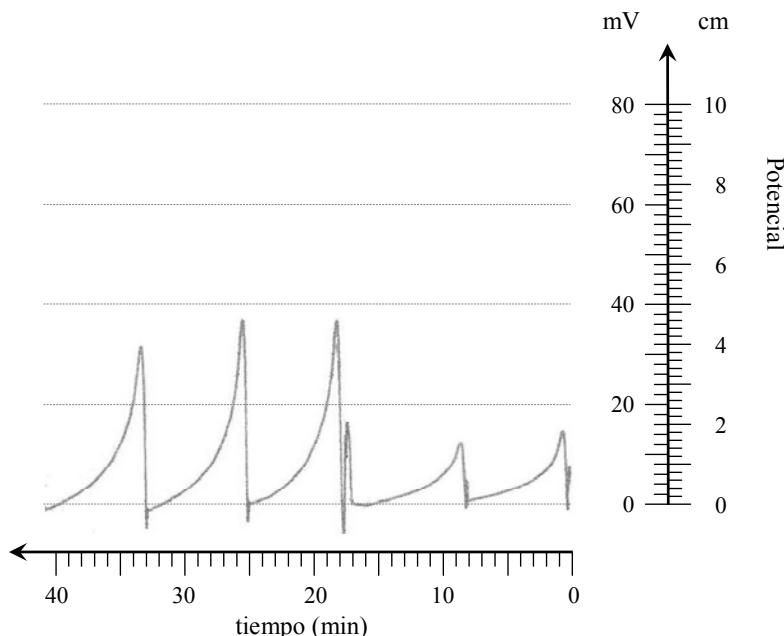
Los resultados obtenidos han confirmado la eficacia del proceso de preconcentración, elución y detección en línea. Se ha obtenido respuesta lineal entre  $5 \cdot 10^{-7}$  M -  $5 \cdot 10^{-4}$  M de ion cadmio. No obstante, en la línea de base se han observado problemas de fuerza iónica debidos a las características del sistema SIA implementado que ha sido necesario minimizar.

Durante el proceso de preconcentración existe una pequeña cantidad de patrón y reactivo que queda retenida sin preconcentrar en la distancia **D2**, así como parte del residuo de la preconcentración en la distancia **D3** (figura 6.2). Este volumen es impulsado hacia el detector durante el proceso de elución del ion cadmio. Esta pequeña fracción residual de la etapa de preconcentración pasa a través del detector potenciométrico en primer lugar, antes del analito eluido. Por este motivo se produce una oscilación en la línea de base. Con el objeto de eliminar esta discontinuidad se ha incorporado una etapa de lavado del canal (**D2+D3**) en dos pasos. El primero consiste en el lavado con agua y el segundo en la impulsión del agua que queda en mediante el llenado de todo el canal con la solución eluyente. En la figura 6.19 se muestran los resultados obtenidos en las distintas secuencias estudiadas. En A se muestra la señal obtenida sin ciclo de lavado, en B la señal obtenida cuando se introduce una etapa de lavado con agua. Se puede observar que aumenta la discontinuidad debido a la diferencia de fuerza iónica entre el agua y la solución de  $\text{NaNO}_3$  1,5M (D). En C se puede apreciar que la introducción de un segundo ciclo de lavado con eluyente elimina completamente el efecto de diferencia de fuerza iónica. Este segundo lavado se realiza con un volumen muy pequeño, estableciendo un compromiso entre sustitución del agua contenida en este canal (**D2+D3**), y pérdida de analito preconcentrado, ya que tiempos muy altos provocarían perdida de ion cadmio.

El ciclo final propuesto consta de cuatro etapas: 1<sup>a</sup>, preconcentración; 2<sup>a</sup>, limpieza con agua; 3<sup>a</sup>, eliminación de agua en **D2+D3** y 4<sup>a</sup>, elución hacia el detector. El tiempo de limpieza con agua se ha establecido en 30 segundos. En este tiempo y un caudal de elución de 1,70 ml/min se elimina toda el agua de lavado. Tiempos superiores a 60 s produjeron disminución de la señal, sobre todo a concentraciones bajas de cadmio (figura 6.20). También se ha evaluado el tiempo de acondicionamiento con  $\text{NaNO}_3$ , comprobándose que un tiempo de 25 s es suficiente para eliminar toda el agua sin provocar pérdida de analito. En todos los casos se ha aplicado este tiempo (figura 6.19 C).



**Figura 6.19** Estudio de la etapa de acondicionamiento necesaria antes de la etapa de detección. La  $[Cd^{2+}] = 5 \cdot 10^{-4} M$  en todos los casos menos D. El tiempo de aspiración es 180 s para la reacción efectuada en línea. Comenzando de derecha a izquierda se tiene: A sin lavado, B con lavado de agua durante 60 s, C con lavado de agua 60 s y de 25 s *con NaNO<sub>3</sub>*. Los últimos picos (D) son una comparación para  $5 \cdot 10^{-7} M$ /agua con una etapa de lavado con agua.



**Figura 6.20** Comparación de la influencia de tiempos de lavado con agua para dos concentraciones bajas de cadmio, de derecha a izquierda: (A)  $[Cd^{2+}] = 5 \cdot 10^{-7} M$ . Tiempos de lavado, 30 s y 60 s, y (B)  $[Cd^{2+}] = 5 \cdot 10^{-6} M$ . Tiempos de lavado, 28s, 30 s y 60 s. (Obsérvese en ambos casos la disminución de altura a 60 s)

### 6.5.3.2 Reacción y preconcentración en línea

Después de estudiada la etapa de preconcentración con reacción en discontinuo, la elución y la detección del ion cadmio retenido, sólo queda por implementar, como paso previo a la optimización global de todo el proceso, la reacción de preconcentración línea.

En primer lugar se ha verificado que la cinética de la reacción de complejación y de intercambio iónico entre el clorocomplejo y la resina son análogas a las obtenidas cuando la reacción se realiza en modo discontinuo fuera del sistema (§ 6.5.3.1). Se han estudiado las variables que afectan directamente a la reacción de complejación: caudal de aspiración, composición del reactivo y frecuencia de oscilación de la válvula solenoide (VS3) y, la distancia entre VS3 y la entrada a la columna (**D1+D2**).

Los caudales usados en sistemas de preconcentración en línea deben establecerse de modo que no comprometan la cinética de intercambio iónico, ni varíen drásticamente la presión en el sistema, garantizando una retención cuantitativa del analito. En este caso se ha estudiado el caudal de aspiración en función de la frecuencia de oscilación de la válvula, ya que se ha comprobado que la frecuencia de oscilación afecta al caudal de aspiración. Además la frecuencia de oscilación limita la composición del reactivo ya que la relación anión  $\text{Cl}^-/\text{HCl}$  optima es 0,75M/0,01M. Se han estudiado diversas frecuencias de oscilación de la válvula entre 0-100 %. Este factor es de gran importancia porque es necesario asegurar que, para las concentraciones de cadmio a analizar, la concentración de cloruro será suficiente para complejear todo el cadmio existente y a la vez minimizar el grado de dilución de la muestra durante el proceso de mezcla. Para frecuencias de 0 y 50 % el caudal es 0,77 y 0,75 ml/min respectivamente; mientras que para frecuencias de 10, 25, 75 y 100 %, es constante 0,71 ml/min. Se han estudiado dos frecuencias de oscilación distintas 50 y 25 %. Con distintas composiciones de reactivo complejante:  $\text{NaCl}$  1,5 M/  $\text{HCl}$  0,02 M y  $\text{NaCl}$  3,00 M/ $\text{HCl}$  0,03 M, respectivamente. En ambos casos se han obtenido buenos resultados, comparables a los obtenidos para la reacción en discontinuo. Se ha optado por la menor frecuencia de apertura 25% con el objeto de aumentar la interpenetración de muestra y reactivo complejante, disminuir el consumo de éste, y reducir la dilución de la muestra.

Finalmente, el caudal de aspiración se ha fijado en 0,71 ml/min, ya que este es el caudal más alto que no provoca sobrepresiones en el sistema y permite el funcionamiento correcto de la etapa de preconcentración en lo que respecta tanto a la cinética de la reacción de complejación como a la cinética de intercambio iónico. La oscilación de la válvula solenoide en un 25% y la composición del reactivo escogidas fueron idóneas para realizar la reacción en línea. Se han realizado estudios comparativos de calibrados efectuados con reacción previa en discontinuo y reacción en línea, y no se han obtenido resultados

significativamente distintos. Este hecho permite confirmar además que la distancia (**D1+D2**) entre la válvula solenoide (VS3) y la columna es suficiente para que la reacción de complejación se realice en toda su extensión. También se ha realizado el análisis de ion cadmio, en modo discontinuo, obtenido en el proceso de reacción/preconcentración en línea, con el objetivo de verificar que todo el cadmio es complejado y retenido. Los análisis se han efectuado con el sistema SIA con MDN presentado en la figura 6.1 A. Se ha verificado que no existe presencia de ion cadmio en el eluato lo que confirma que la reacción de complejación en línea es óptima.

En la tabla 6.9 se muestran los resultados obtenidos para dos calibrados efectuados para la misma secuencia de análisis, con la reacción en discontinuo y en línea. La secuencia es: 180 s de preconcentración, 30 s de lavado con agua, 30 s de acondicionamiento con eluyente y 360 s de elución/detección. La gestión de fluidos mediante la apertura/cierre de las válvulas, es la que se muestra en la tabla 6.3 del apartado 6.2.4.3.

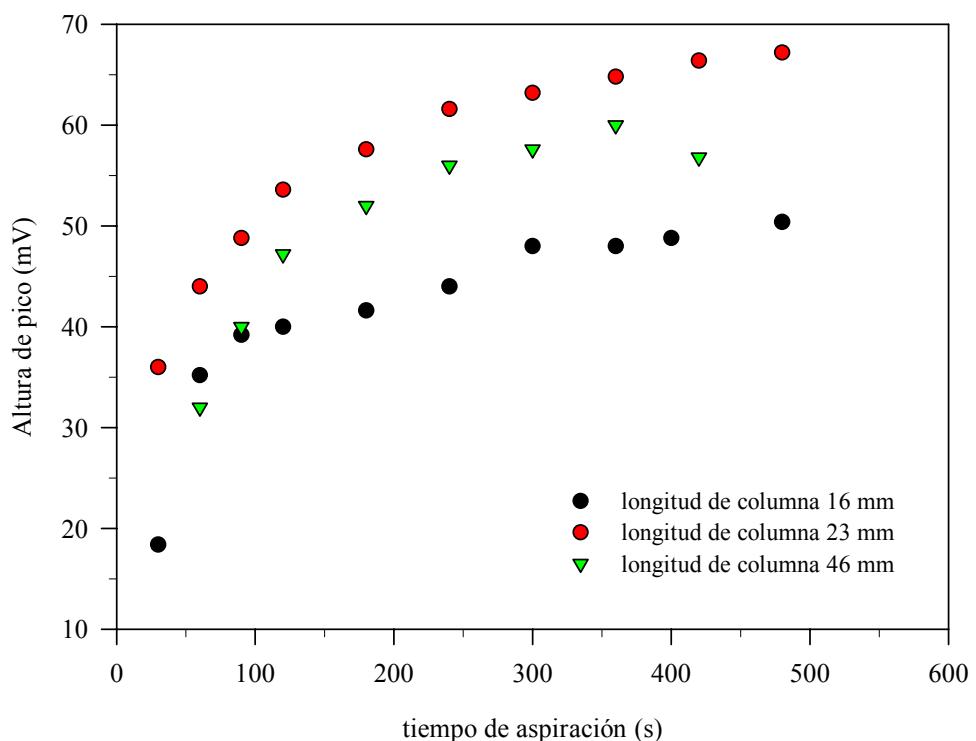
**Tabla 6.9** Estudio de la reacción de complejación en discontinuo/en línea.

| $[Cd^{2+}] (M)$      | <i>Reacción en discontinuo</i>                         | <i>Reacción en línea (25%)</i>                         |
|----------------------|--|--|
| $5 \cdot 10^{-7}$    | 3,2 mV   | 4 mV   |
| $5 \cdot 10^{-6}$    | 27,2 mV  | 25,6 mV  |
| $5 \cdot 10^{-5}$    | 52 mV  | 48,8 mV  |
| $5 \cdot 10^{-4}$    | 68 mV  | 66,4 mV  |
| <b>Ajuste lineal</b> | $H(mV)=140(\pm 16)+22(\pm 3) \cdot \log [Cd^{2+}] (M)$ | $H(mV)=137(\pm 17)+21(\pm 3) \cdot \log [Cd^{2+}] (M)$ |

### Estudio de la longitud de la columna

Uno de los parámetros más importantes del sistema propuesto es la longitud de la columna de intercambio iónico y la granulometría de las partículas constituyentes. Aunque el tamaño de la columna es fundamental para la etapa de preconcentración, el tamaño de partícula utilizado en el empaquetamiento también lo es. Tamaños elevados de columna pueden no ser convenientes porque aumentan la presión hidrodinámica del sistema y favorecen la dispersión del analito durante la etapa de elución. La eficacia de una columna está condicionada también por el tamaño del material empaquetado. El uso de partículas con menor granulometría permite la utilización de columnas de intercambio de menores dimensiones. En este caso se ha optado por una resina de granulometría de 200-400 *mesh*. Estas dimensiones garantizan una buena eficacia en el proceso de separación y permiten la implementación de una columna lo suficientemente reducida para que no exista un incremento de presión en el sistema.

Se han estudiado tres longitudes de columnas: 16, 23 y 46 mm. Las otras dimensiones de la columna han permanecido invariables. Se ha estudiado la influencia de la longitud en el proceso de preconcentración de una solución de Cadmio (II) de concentración  $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  a distintos tiempos de preconcentración. El sistema experimental utilizado es el mostrado en la figura 6.2 y las condiciones de operación las optimizadas antes (sub apartado anterior). En la figura 6.21 se muestran la comparación de las señales obtenidas.



**Figura 6.21** Influencia de la longitud de la columna y tiempo de aspiración en la señal analítica.

En ninguno de los casos se ha observado sobrepresión en el sistema, probablemente debido al tipo de conexiones utilizadas y al empaquetamiento moderado de la columna. Aunque si se ha observado disminución de la capacidad de preconcentración. La columna de 16 mm longitud es insuficiente para la retención completa del clorocomplejo, ya que se han obtenido señales analíticas menores que para las longitudes superiores. Para la segunda columna (23 mm) se ha obtenido un aumento de señal significativamente mayor que en las otras dos distancias. En el tercer caso (46 mm) la señal vuelve a disminuir. Probablemente debido a la dispersión de la muestra en la columna durante la etapa de elución. Por otro lado, la relación directa entre tiempo de aspiración y señal analítica se ha mantenido en las tres longitudes.

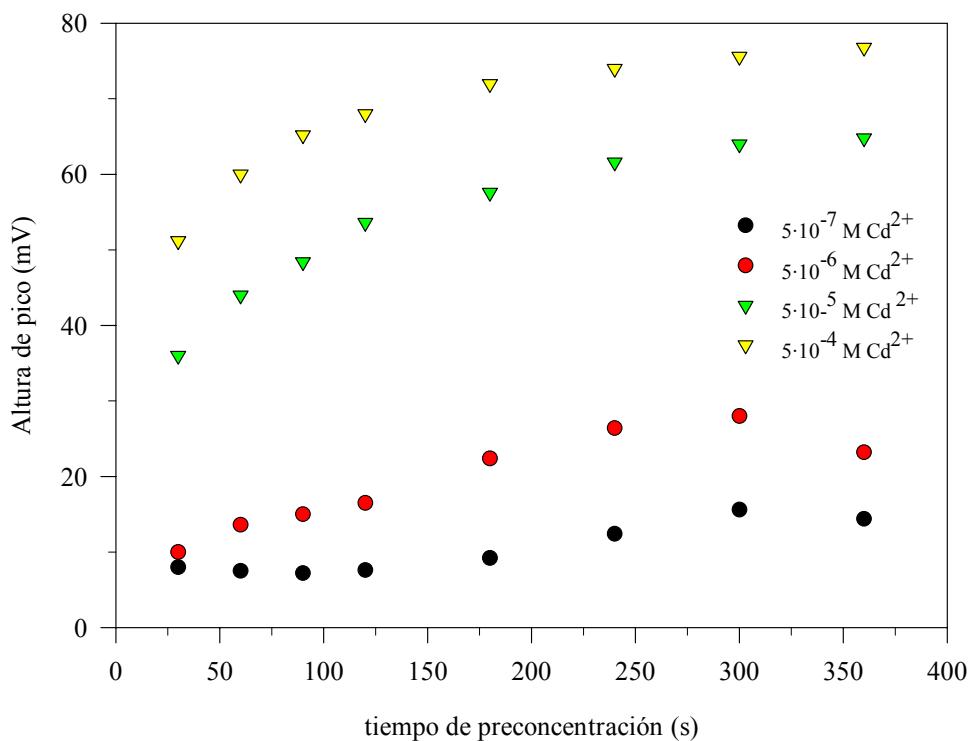
Finalmente, se ha escogido como óptima una columna de 23 mm de longitud. Para esta longitud no se ha observado saturación de la columna, salvo para concentraciones muy elevadas y tiempos de preconcentración superiores a 300 s (subapartado siguiente). Por

tanto, permite la retención cuantitativa del ion cadmio preconcentrado en forma de clorocomplejo en un amplio intervalo de concentración.

### **Estudio del tiempo de preconcentración**

También ha sido estudiada la influencia del tiempo de aspiración en la preconcentración de distintas concentraciones de ion cadmio. Esta variable es muy importante porque determina tanto el volumen de muestra preconcentrado, como el límite superior de saturación de la columna. El estudio se ha realizado para cuatro concentraciones distintas de Cd (II),  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  y  $5 \cdot 10^{-4}$  M, a distintos tiempos de aspiración comprendidos en un intervalo de 25-360 s. La columna utilizada ha sido de 23 mm de longitud y el caudal de aspiración de  $0,72 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  para una relación 1:3 reactivo/muestra.

En la figura 6.22 se muestran los resultados obtenidos. Se ha observado que para tiempos superiores a 300 s de aspiración se produce saturación de la columna. Este hecho resulta más evidente a concentraciones altas. Para concentraciones bajas en cambio, se observa claramente una ligera disminución de la señal a tiempos superiores. Este hecho es significativo para las concentraciones de cadmio  $5 \cdot 10^{-7}$  M y  $5 \cdot 10^{-6}$  M.



**Figura 6.22** Estudio de la influencia de tiempo de aspiración y la concentración en la etapa de preconcentración.

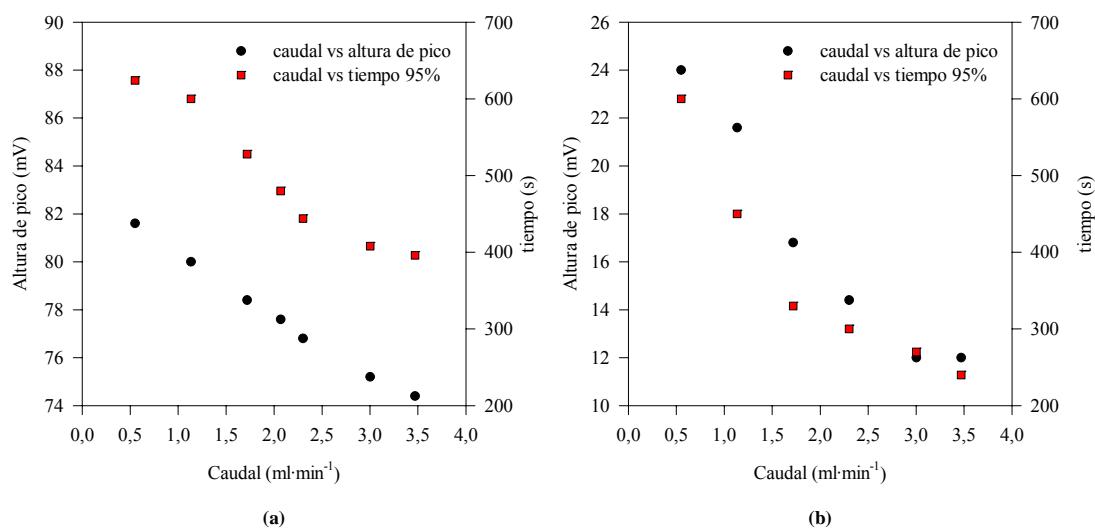
Por tanto, se verifica que, para un tiempo de 300 s, el Cd (II) es retenido cuantitativamente, mientras que para tiempos superiores se produce saturación de la columna en las concentraciones altas de Cd (II). Para concentraciones bajas se produce pérdida de ion

cadmio ya que el  $\text{Cl}^-$  presente en el reactivo, conjuntamente como el  $\text{NO}_3^-$ , actúa también como eluyente. Por tanto, se ha escogido como óptimo un tiempo de aspiración de 300 s, valor idóneo para la preconcentración en todo el intervalo de concentraciones de ion cadmio estudiado.

### **Estudio de caudal de elución**

El caudal de solución eluyente ha sido establecido para garantizar la eficacia del proceso de elución, pero a su vez se ha establecido un compromiso entre frecuencia de análisis y dispersión de la muestra. Se han estudiado valores de caudales de elución entre 0,55-3,47  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  y su efecto en dos concentraciones ion cadmio,  $5\cdot10^{-7} \text{ M}$  y  $5\cdot10^{-5} \text{ M}$ . Se ha verificado que este parámetro tiene influencia especialmente en la presión hidrodinámica del sistema y en la dispersión del analito sobre todo para concentraciones bajas de éste. En cambio no presenta una alteración significativa en la capacidad de elución. El estudio se ha realizado en el sistema SIA con preconcentración y modo de detección normal para un tiempo de aspiración de 300s y un caudal de aspiración de  $0,71 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  con un 25% de aspiración de reactivo.

En la figura 6.23 se muestra la señal obtenida en la etapa de elución a distintos caudales para las dos concentraciones de ion cadmio analizado, así como el tiempo de recuperación de línea base. Éste corresponde al tiempo que transcurre entre el máximo de la señal analítica y la disminución del máximo un 95%.



**Figura 6.23** Estudio del efecto del caudal de elución en la señal analítica, (a)  $[\text{Cd}^{2+}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  y (b)  $[\text{Cd}^{2+}] = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ .

Se ha observado que un aumento del caudal de elución influye negativamente en la señal analítica. Este efecto parece estar asociado a una cinética de intercambio lenta entre la

resina y el eluyente; a caudales mayores el tiempo de intercambio es menor y disminuye drásticamente la altura de pico, especialmente a concentraciones menores de ion cadmio. Para caudales pequeños, menores de  $1,70 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , el aumento de tiempo de elución es muy grande del orden de 600 s. Si a este tiempo se añade el de la etapa de preconcentración, el tiempo por análisis aumenta hasta 16 minutos por tanto, la frecuencia de análisis se reduce a  $4\text{h}^{-1}$ . Estableciendo un compromiso entre señal analítica y frecuencia de análisis, se ha fijado como idóneo un caudal de elución de  $1,70 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , a expensas de perder un poco de señal a concentraciones bajas. En el caso estudiado la disminución es de 9 mV, considerando el menor caudal. Por otro lado, la distancia operacional **L1** se ha mantenido constante e igual a 20 cm, distancia mínima y suficiente para permitir la unión entre la VS1 y los electrodos (§ 6.4.1) y que minimiza el tiempo de análisis.

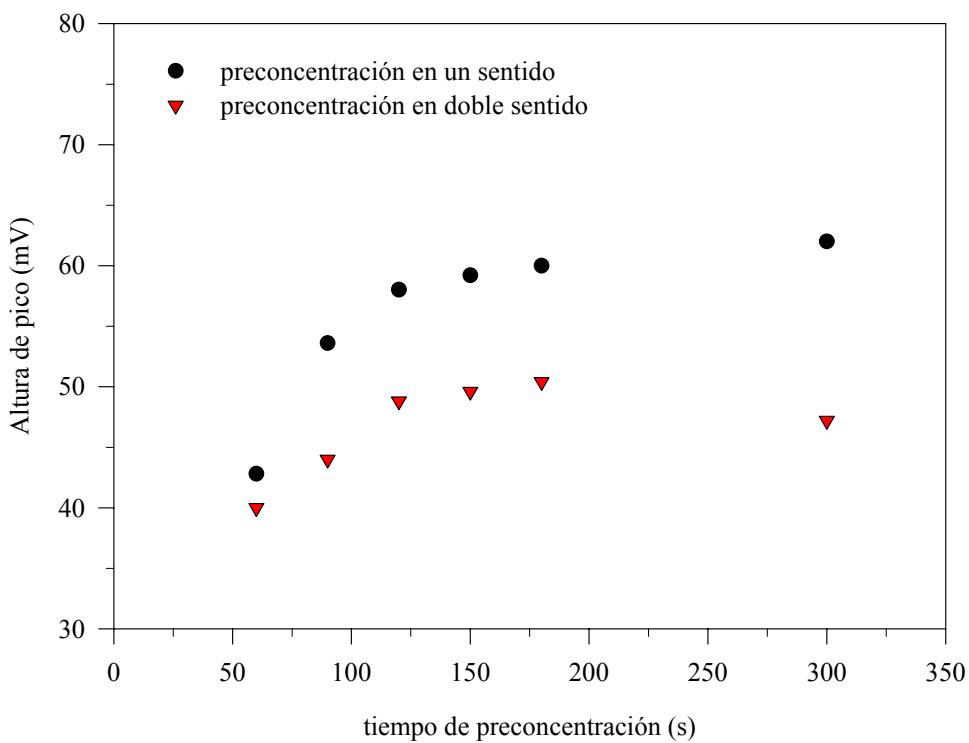
### **Secuencia de preconcentración /elución**

Una vez establecidas las condiciones de operación óptimas tanto para la etapa de preconcentración (caudal de aspiración, frecuencia de oscilación de la válvula y composición de reactivo), como para la etapa de elución/detección (caudal de elución y concentración de la solución eluyente), se ha estudiado la posibilidad de preconcentrar y eluir en ciclos dobles aprovechando la versatilidad de la técnica SIA. El estudio se ha basado en dividir cada una de las etapas de preconcentración en dos subetapas realizadas en ambos sentidos de flujo.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.24. Se ha experimentado con ciclos de preconcentración y elución en una, y dos etapas. Inicialmente se ha evaluado la respuesta obtenida al preconcentrar un volumen de muestra dividido en dos fracciones iguales pero en sentidos opuestos. El primer volumen se ha preconcentrado en la dirección de aspiración y el segundo en la dirección de impulsión. Esta variante no aporta ninguna ventaja ya que se ha obtenido una disminución de la señal por tanto, un menor nivel de preconcentración. El ion cadmio retenido en la primera etapa en forma de clorocomplejo es eluido por el  $\text{Cl}^-$  libre presente en la segunda fracción de muestra/reactivo que se preconcentra en sentido opuesto.

Se ha estudiado también el proceso de elución en una y dos etapas. En la primera etapa se ha aspirado la mitad de eluyente a través de la columna en el mismo sentido que el segmento de muestra/reactivo y se ha reservado en un tubo de acumulación adicional colocado a la salida de la columna. En la segunda etapa se ha eluido con la mitad del volumen de eluyente en contracorriente hacia el detector. Se ha observado una mayor dispersión en el ciclo doble de elución, lo que ha provocado picos dobles y señales un 20%

menor que para la elución en un solo sentido. Finalmente se ha establecido como idóneo un ciclo de preconcentración y elución en una sola etapa.

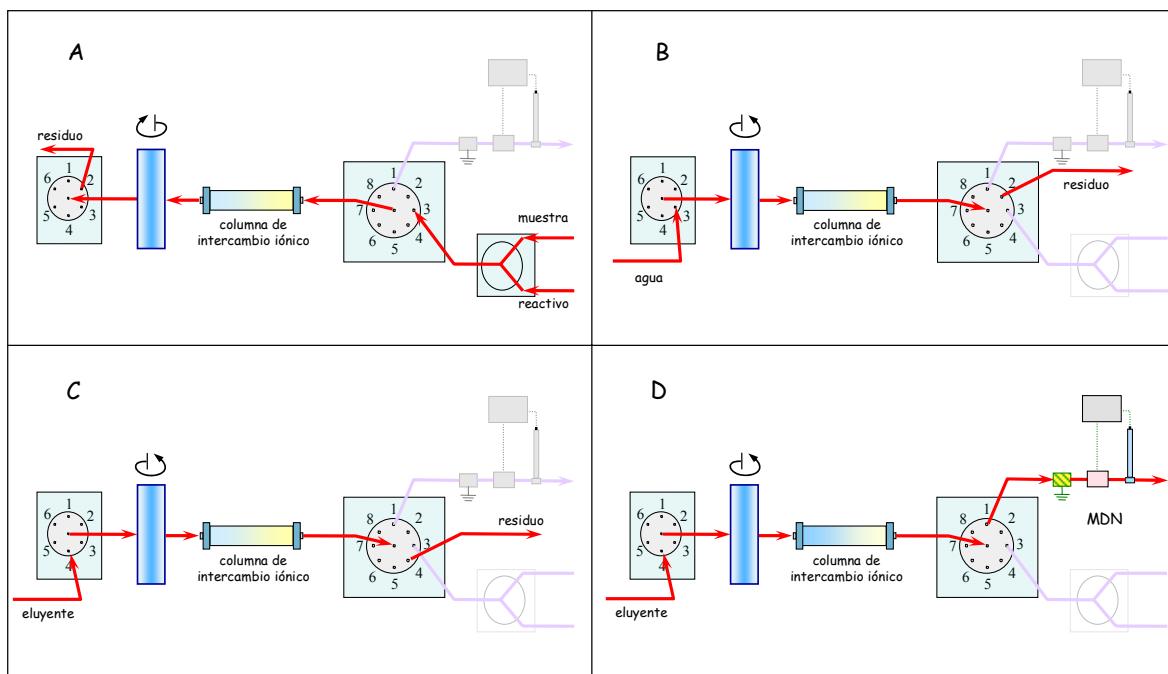


**Figura 6.24** Comparación de la etapa de preconcentración en una y dos etapas. La  $[Cd^{2+}]$  es  $5 \cdot 10^{-4} M$ , y el tiempo de aspiración variable. En el ciclo en dos etapas los tiempos de aspiración e impulsión parciales se han calculado en función del  $Q_{asp}=0,71 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $Q_{imp}=1,70 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a través de la columna.

El ciclo final ha quedado definido con las condiciones optimizadas en este apartado y finalmente queda establecido como se esquematiza en la figura 6.25. La secuencia de etapas parciales ya se ha mostrado resumida en la tabla 6.3 del apartado 6.2.5.

La primera etapa es la etapa de preconcentración (A) y consiste en la aspiración a un  $Q=0,71 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , de una mezcla muestra/reactivo (3:1) a través de la válvula solenoide, comunicada con la VS1 a través del puerto 3 mientras que el sobrante de mezcla de reacción sale por el puerto 2 de la VS2 y va al residuo. La segunda etapa (B) es de limpieza del sistema desde el canal central de VS2 hasta el canal central de la VS1. Consiste en el paso de agua desde el puerto 3 de la VS2 a través de la columna hasta el puerto 2 de la VS1. Con esta etapa se consiguen eliminar los restos de mezcla muestra/reactivo y las interferencias que provoca en la línea de base. La tercera etapa consiste en llenar todo el sistema con el eluyente  $NaNO_3 1,5 M$  para eliminar los restos del agua de lavado. De esta manera se evitan las alteraciones en la línea de base debidas a la presencia de soluciones de distinta fuerza iónica (agua/eluyente) a su paso por el detector. Esta etapa se realiza comunicando el puerto 4 de la VS2 a través de la columna con el puerto 4 de VS1. La

última etapa es la elución del cadmio retenido hacia el detector. Se basa en la comunicación del puerto 4 de la VS2 a través de la columna con el puerto 1 de VS1 comunicado con el detector. En este canal es donde se implementan los dos modos de detección estudiados.



**Figura 6.25** Ciclo de análisis propuesto para el análisis de ion cadmio con etapa de preconcentración en línea y detección en modo normal, para el sistema SIA implementado.

Previamente al ciclo de análisis es necesario efectuar una etapa de acondicionamiento de la columna. Aunque normalmente se realiza una vez al día, esta etapa se repite cuando se observa una disminución de la reproducibilidad entre señales analíticas. La solución acondicionadora utilizada es el mismo reactivo complejante. El acondicionamiento es necesario ya que el continuo paso de la solución eluyente de  $\text{NaNO}_3$ , contribuye a la conversión de  $\text{Cl}^-$  a  $\text{NO}_3^-$  en la columna de intercambio iónico.

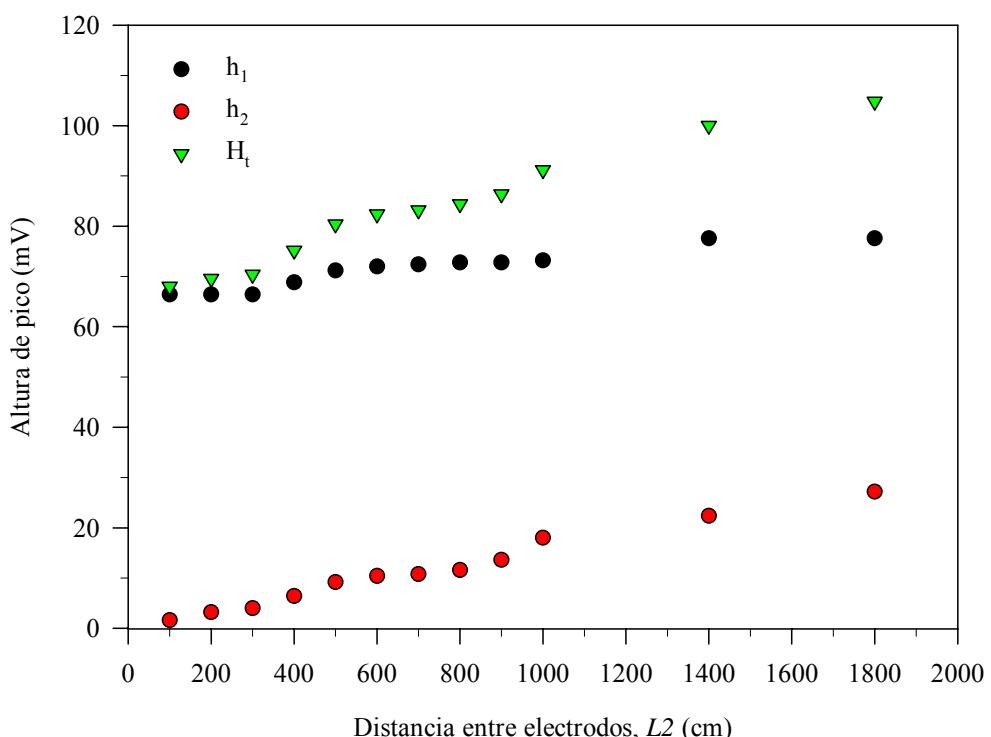
#### 6.5.3.3 Estudio de la etapa de detección en el sistema con modo de detección diferencial

Después de establecer las condiciones de operación óptimas para la etapa de preconcentración y elución, se ha estudiado la influencia del caudal de elución y la distancia entre electrodos en el modo de detección diferencial. Análogamente al estudio realizado sin preconcentración (§ 6.4.3), el principal objetivo de este estudio es establecer las condiciones idóneas que aseguren una mayor señal analítica, estableciendo un compromiso entre señal y frecuencia de análisis.

### Influencia de la distancia entre electrodos

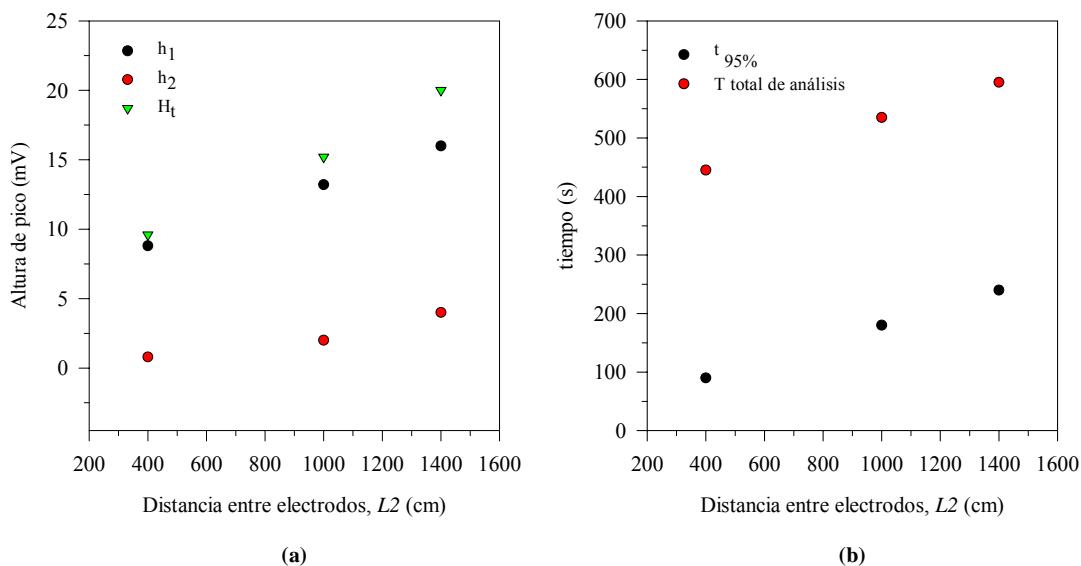
La distancia  $L1$ , como en el estudio sin preconcentración, ha sido fijada en 20 cm con el objeto de minimizar la dispersión del analito. En primer lugar se ha estudiado el efecto de la separación entre electrodos en la señal analítica. Las distancias estudiadas están comprendidas en un intervalo entre 100-1800 cm (figura 6.26). Se ha estudiado la variación de la señal en función de la longitud manteniendo constante un caudal de elución de  $0,71\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  y la concentración analizada, por duplicado, de ion cadmio ha sido  $5\cdot10^{-5}\text{M}$ . El sistema utilizado ha sido el mostrado en la figura 6.2 con el modo de detección diferencial (figura 6.1 B).

Se ha observado que, a distancias menores de 500 cm, la separación entre electrodos no es suficiente, ya que la señal analítica teórica se ve reducida debido a pequeña señal del segundo pico. A estas longitudes se produce una solapado importante entre señales ya que cuando comienza a salir el segundo pico todavía no se ha recuperado la línea de base. Esto se hace evidente para la primera señal que es ligeramente menor a distancias menores de 400 cm respecto a distancias mayores en que se mantiene constante. A partir de 400 cm el aumento de la segunda señal es continuo, lo que resulta evidente cuando se verifica que la señal total aumenta en la misma cantidad que lo hace la segunda señal. A partir de 400 se obtiene separación entre picos, llegando a obtenerse importantes incrementos en la señal a 1400 y 1800 cm.



**Figura 6.26** Influencia de la distancia entre electrodos para el sistema SIA con preconcentración en línea y modo de detección diferencial.

Se ha estudiado también la influencia de la distancia entre electrodos para concentraciones menores de ion cadmio. El objetivo es verificar que la separación entre electrodos no provoca la dispersión del analito a bajas concentraciones, lo que provocaría una disminución importante de señal. Se ha estudiado la respuesta obtenida para una concentración de ion cadmio  $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$  a tres longitudes, 400, 1000 y 1400 cm. Se ha observado que es necesaria una distancia mínima para evitar el solapamiento entre los picos, incluso a concentraciones bajas. De las tres distancias ensayadas, la que permite una diferenciación mayor entre señales es 1400 cm (figura 6.27 (a)). A distancias menores se observa solapamiento entre picos. Incluso a 1000 cm, tanto la primera como la segunda señal son, respecto a 1400 cm, menores. A pesar de que la frecuencia de análisis también se ve influenciada proporcionalmente por la distancia (figura 6.27 (b)), se verifica que, incluso a concentraciones bajas, la distancia idónea para obtener la máxima señal analítica es 1400 cm. En estas condiciones, el aumento de dispersión del analito por efecto de la distancia queda compensado por el aumento de señal analítica al producirse una mayor separación entre electrodos.

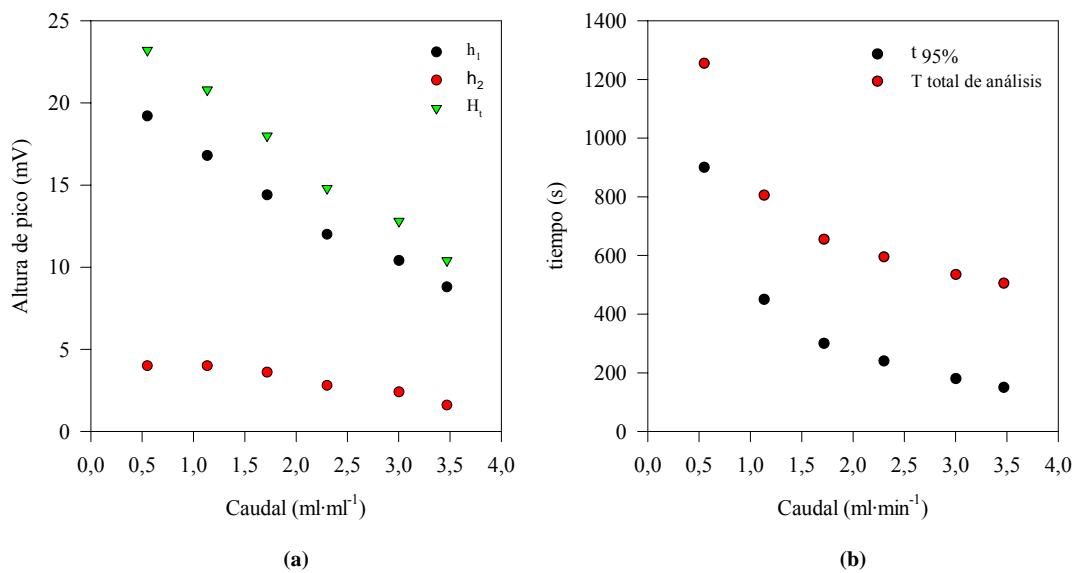


**Figura 6.27** Influencia de la longitud  $L_2$ , en la respuesta para  $[\text{Cd}^{2+}] = 5 \cdot 10^{-7} \text{M}$  en el modo de detección diferencial. (a) Influencia de la distancia en la señal y (b) influencia de la distancia en el tiempo de análisis.

### Influencia del caudal de elución

Se ha estudiado la influencia del caudal de elución en la señal obtenida en el modo de detección diferencial. Los caudales estudiados están comprendidos en el intervalo de 0,55 a  $3,47 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Las concentraciones de ion cadmio analizadas han sido  $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$  y  $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . En la figura 6.28 (a) se muestran los resultados obtenidos para la menor concentración estudiada,  $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$  de ion cadmio. Se ha comprobado que un aumento de caudal provoca una disminución importante de la señal analítica. Esta disminución está relacionada con una cinética lenta de intercambio; ya que cuanto mayor es el caudal menor es el tiempo de

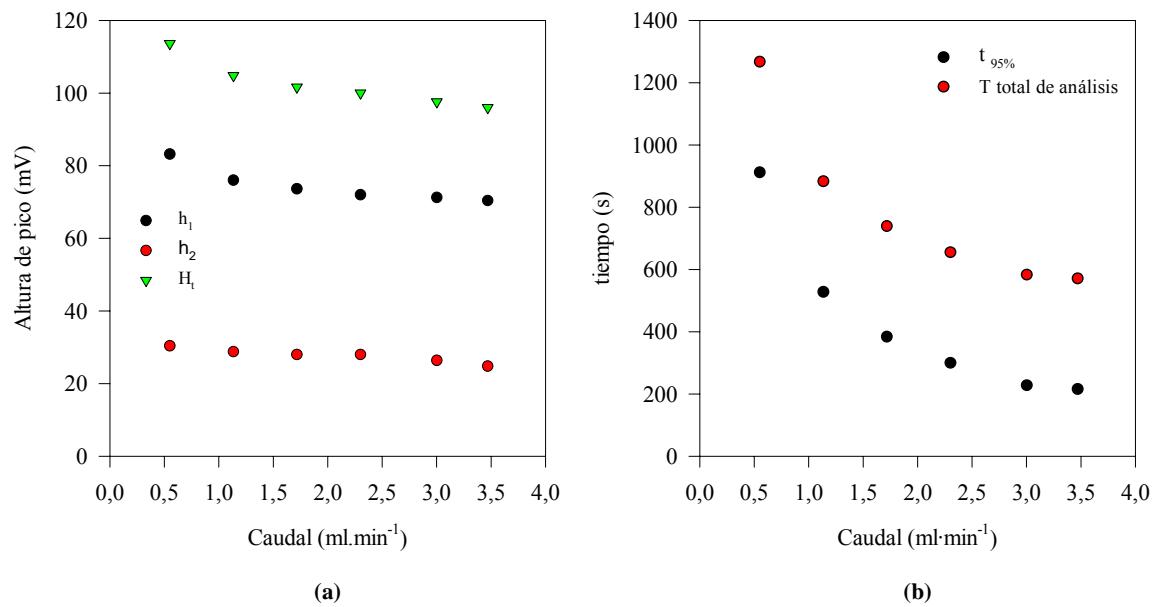
intercambio y menor es la cantidad de catión cadmio eluido. La primera señal disminuye a la mitad de su valor inicial para el caudal más alto, a pesar de que la distancia que existe desde la válvula (VS1) hasta el primer detector tubular (L1) es mínima. La segunda señal analítica ( $h_2$ ) casi llega a anularse, porque también contribuye el efecto de la dispersión debido a la distancia. En la figura 6.28 (b) se comprueba que al aumentar el caudal disminuye drásticamente el tiempo de análisis casi a la mitad entre los valores límite.



**Figura 6.28** Influencia del caudal de elución en el modo de detección diferencial para concentraciones bajas de analito,  $[Cd^{2+}] = 5 \cdot 10^{-7} M$ .

Para concentraciones altas de ion cadmio, el comportamiento observado es el mismo, aunque la disminución de señal analítica al aumentar el caudal no es tan drástica. En la figura 6.29 (a) se han representado las señales analíticas obtenidas para una concentración de  $5 \cdot 10^{-5} M$  de ion cadmio. A mayor caudal se produce también una mayor dispersión del analito en la etapa de elución/detección, pero ésta no provoca una disminución importante de señal que incluso llega a estabilizarse, en el caso del primer pico y el pico total. La dispersión es mayor para la segunda señal como en el caso anterior. En la figura 6.29 (b) se muestran el tiempo de análisis total y el tiempo parcial de recuperación de la línea de base. Los valores son ligeramente superiores que los obtenidos para la concentración inferior, pero no existen grandes diferencias.

Finalmente, se ha establecido un compromiso entre frecuencia de análisis y señal analítica para ambas concentraciones, estableciéndose como idóneo un caudal de 1,70 ml/min.



**Figura 6.29** Influencia del caudal de elución en el modo de detección diferencial para concentraciones altas de analito,  $[Cd^{2+}] = 5 \cdot 10^{-5} M$ .

Como resumen del proceso de optimización realizado para la determinación de ion cadmio en el sistema SIA con preconcentración en línea y dos modos de detección, en la tabla 6.10 se muestran las principales condiciones implementadas.

**Tabla 6.10** Características de operación del sistema SIA con MDN y MDD.

| Etapa                   | Parámetro – Valor óptimo                            |       |
|-------------------------|---|-------|
| <b>Preconcentración</b> | <i>Composición reactivo:</i> NaCl 3M + HCl 0,03 M   |       |
|                         | <i>Oscilación VS3:</i> 25 %                         |       |
|                         | <i>t aspiración:</i> 300s                           |       |
|                         | <i>Caudal:</i> 0,71 ml·min⁻¹                        |       |
| <b>Elución</b>          | <i>Volumen muestra / reactivo:</i> 2662 µl / 887 µl |       |
|                         | <i>Solución eluyente:</i> NaNO <sub>3</sub> 1,5 M   |       |
| <b>Detección</b>        | <i>Caudal:</i> 1,70 ml·min⁻¹                        |       |
|                         | <b>MDN</b>  |       |
|                         | L1  | 20 cm |
|                         | L2  | 5 cm  |
|                         | <b>MDD</b>  |       |
|                         | 20 cm   |       |
|                         | 1400 cm   |       |

#### 6.5.4 Caracterización de los modos de detección con preconcentración en línea

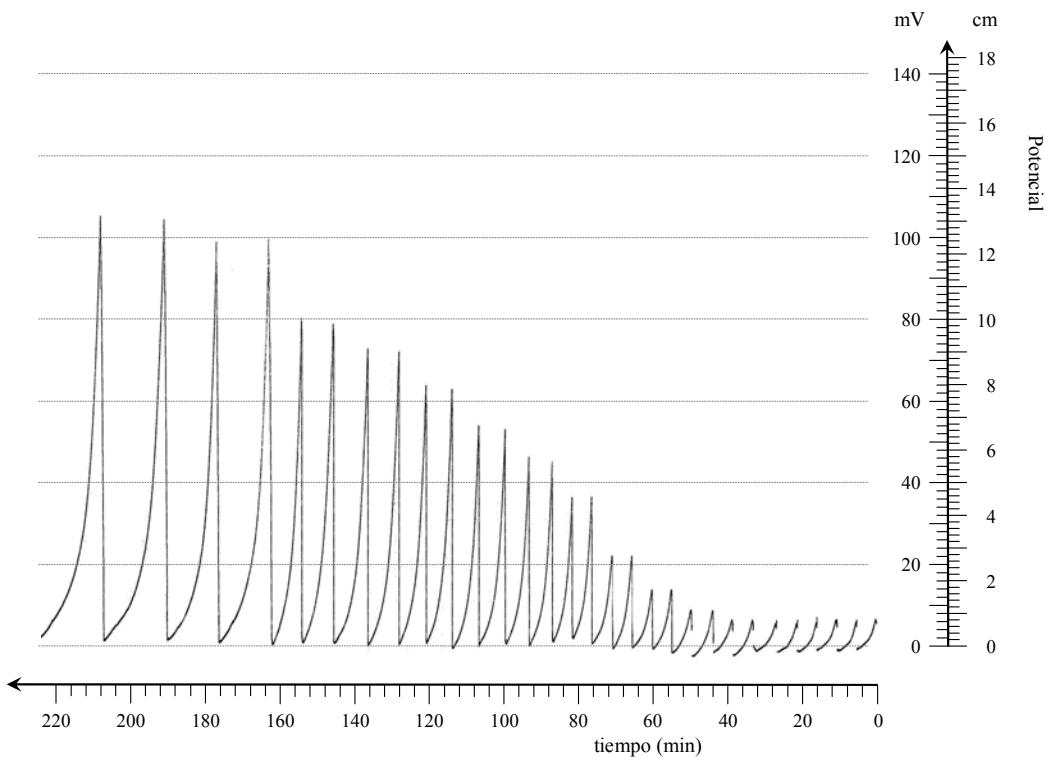
Después de la optimización de la etapa de preconcentración en línea y de las condiciones idóneas de detección para los dos sistemas implementados (MDN y MDD), se han efectuado las correspondientes curvas de calibración, con soluciones patrón de ion cadmio y, se han caracterizado los dos sistemas de detección. Los parámetros evaluados han sido los correspondientes a la curva de calibración, la repetitividad, la reproducibilidad en el empaquetamiento, la estabilidad del potencial y la frecuencia de muestreo. Los resultados comparativos de ambos sistemas se muestran resumidos en el apartado 6.5.5, en la tabla 6.11. Todos los parámetros han sido evaluados como se detalla en el capítulo 3 y del

mismo modo que en el § 6.4.4. La descripción pormenorizada de éstos se detalla a continuación.

La caracterización de los parámetros que definen las curvas de calibración se ha realizado a partir de las señales obtenidas en dos calibrado tipo realizados con soluciones patrón de ion cadmio, en un intervalo de concentración  $1 \cdot 10^{-8}$ - $8,89 \cdot 10^{-3}$ M para el modo de detección normal y  $1 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ M para el modo de detección diferencial. Las curvas de calibración han sido obtenidas por representación de las alturas de pico medidas frente al logaritmo de la concentración (asimilado a actividad) para cada patrón analizado por duplicado. La sensibilidad ha sido obtenida como la pendiente en la zona de respuesta lineal (zona Nerstiana). El LIRL y el LSRL han sido establecidos como los dos extremos del intervalo lineal (zona Nerstiana de respuesta), para cada uno de los modos de detección. El cálculo del límite de detección se ha efectuado mediante un ajuste no lineal de todos los datos experimentales del calibrado exceptuando los puntos en que se produce saturación de la columna de intercambio aniónico. Se ha utilizado la ecuación de Nikolskii-Eisenman,  $H=A+B \cdot \log(X+C)$ , donde el parámetro C puede considerarse el límite de detección aparente del sistema en ausencia de interferencias (§ 3.3.2.2).

Los resultados obtenidos han demostrado que existen, también en este sistema SIA con preconcentración, diferencias significativas entre los dos modos de detección. Para el MDD se ha obtenido un menor intervalo lineal y  $LD_{ap}$  que para el modo de detección normal. El intervalo lineal para MDN es  $2,5 \cdot 10^{-7}$ M- $1 \cdot 10^{-3}$ M, con un  $LD_{ap}=1,5 \cdot 10^{-7}$ M y una sensibilidad de  $27,6(\pm 1,2)$  mV·dec<sup>-1</sup> (figura 6.33). Para el MDD el intervalo lineal es  $2,5 \cdot 10^{-7}$ M- $2,5 \cdot 10^{-5}$  M, con un  $LD_{ap}=1,8 \cdot 10^{-7}$ M y una sensibilidad de  $36,8(\pm 1,9)$  mV·dec<sup>-1</sup>. Aunque en ninguno de los dos sistemas de detección se ha obtenido la pendiente teórica de  $29,5$  mV·dec<sup>-1</sup> (MDN) y  $59$  mV·dec<sup>-1</sup> (MDD). Los valores obtenidos en el resto de calibrados realizados en este estudio son similares. No se han obtenido diferencias significativas entre ellos. La frecuencia de muestreo en ambos sistemas coincide y se encuentra en 5 análisis por hora.

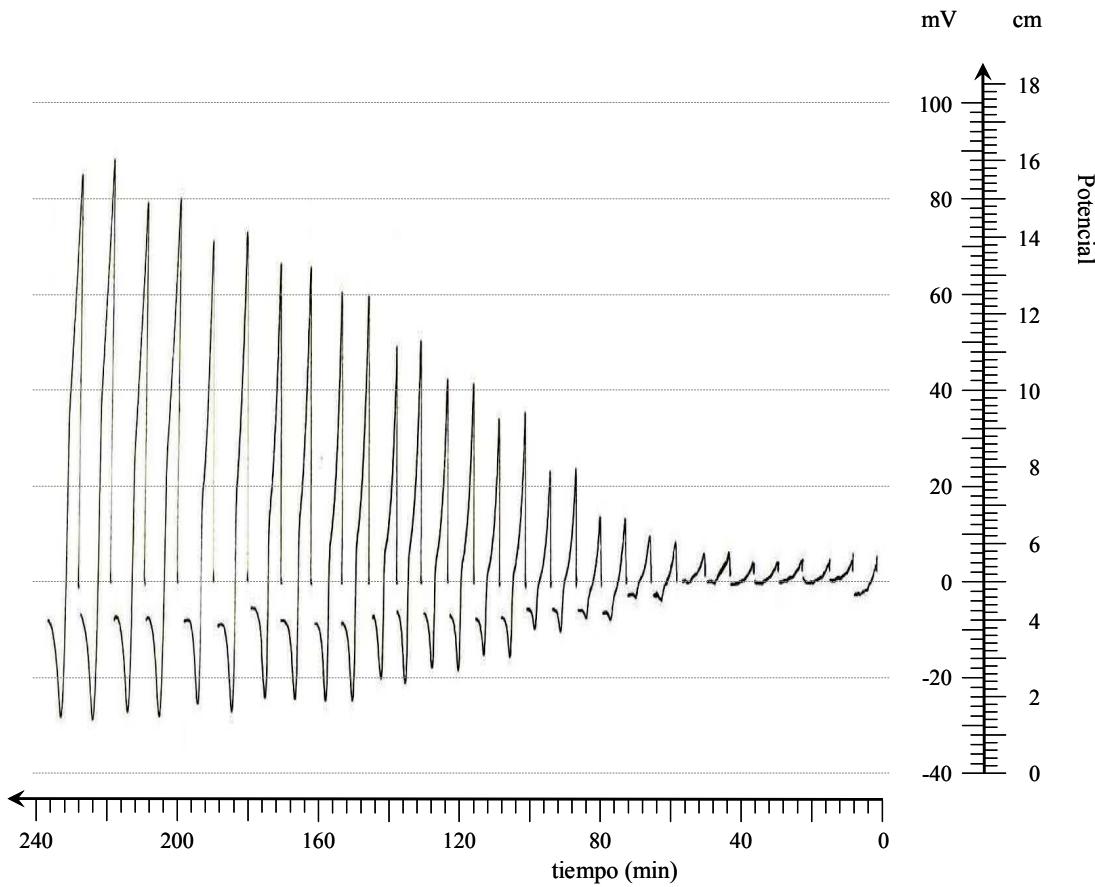
A título de ejemplo, en las figuras 6.30 y 6.31, se muestran los registros de las señales obtenidas para dos calibrados efectuados en las condiciones óptimas (tabla 6.11) en ambos modos de detección para el sistema SIA con etapa de preconcentración.



**Figura 6.30** Fiagrama obtenido en el sistema SIA con preconcentración en línea para el modo de detección normal. Los análisis se han realizado por duplicado. Las concentraciones analizadas son de derecha a izquierda:  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  M y  $1 \cdot 10^{-3}$  M.

La repetitividad de la señal analítica ha sido evaluada realizando 10 replicados de 2 patrones dentro del intervalo lineal de trabajo, efectuados al realizar un calibrado, en cada uno de los sistemas. Las concentraciones estudiadas han sido  $5 \cdot 10^{-7}$  y  $5 \cdot 10^{-6}$  M de ion cadmio. La desviación estándar obtenida en todos los casos está alrededor del 1,5%.

La estabilidad de los potenciales ha sido determinada mediante la realización de calibrados sucesivos durante un día de trabajo. Los resultados mostraron una buena estabilidad de los electrodos con una variación en la sensibilidad de  $\pm 0,202$  mV·dec<sup>-1</sup> para MDN y  $\pm 0,894$  mV·dec<sup>-1</sup> para MDN. La estabilidad ha sido estimada como la desviación estándar del promedio de sensibilidades de tres calibrados.

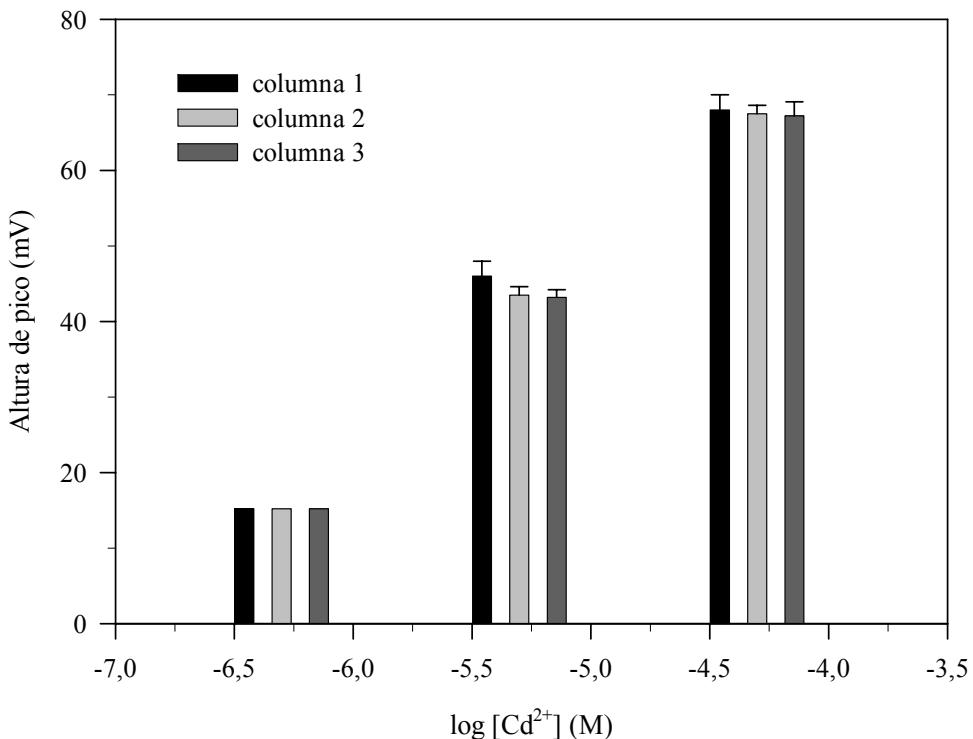


**Figura 6.31** Fiagrama obtenido en el sistema SIA con preconcentración en línea para el modo de detección diferencial. Los análisis se han realizado por duplicado. Las concentraciones analizadas son de derecha a izquierda:  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  M y  $1 \cdot 10^{-3}$  M.

Uno de las etapas que puede plantear problemas de reproducibilidad en el sistema SIA con preconcentración es el empaquetamiento de las columnas utilizadas en esta etapa. La estabilidad del potencial y la repetitividad de la señal analítica suministrada por los electrodos son función exclusivamente del estado de estos. Para asegurar su adecuado funcionamiento, los electrodos son pulidos y acondicionados de nuevo cuando disminuye su respuesta (§ 6.2.2.2). Por tanto, la variable que puede limitar la reproducibilidad del sistema con preconcentración es la preparación de las columnas. En la figura 6.32 se muestra la comparación de las señales obtenidas para diferentes concentraciones en diferentes columnas. Se ha verificado que no existen diferencias significativas en el empaquetamiento de distintas columnas.

El estudio ha consistido en preparar tres columnas y evaluarlas en el sistema SIA con preconcentración, en el modo de detección normal, mediante el análisis de tres concentraciones de ion cadmio. Las concentraciones analizadas por triplicado con cada una de las columnas han sido  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  y  $5 \cdot 10^{-5}$  M. También se ha aplicado el test t por parejas a la media de cada una de las series de resultados obtenidos con cada columna y no

se han obtenido diferencias significativas entre valores, ya que  $t_{cal}$  ha sido menor en todos los casos que el estadístico  $t_{tab}$  para 2 grados de libertad. Se han comparado los resultados para las tres combinaciones posibles entre columnas: 1-2, 2-3, 1-3. El valor del promedio del estadístico  $t_{cal}=1,58$  menor a  $t_{tab}=4,30$ , por lo tanto se acepta la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre columnas.



**Figura 6.32** Estudio de la reproducibilidad en el empaquetamiento de columnas. La concentraciones analizadas son iguales para los tres casos, de izquierda a derecha:  $5 \cdot 10^{-7}$  M,  $5 \cdot 10^{-6}$  M y  $5 \cdot 10^{-5}$  M.

La capacidad de la columna ha sido determinada experimentalmente por diferencia de pesada después de preconcentrar hasta saturación una solución  $5 \cdot 10^{-5}$  M de cadmio. El valor obtenido ha sido  $0,6 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mg de resina}$ . El tiempo de vida de la columna ha sido de un mes con soluciones patrón.

### 6.5.5 Comparación de los sistemas de detección

En la tabla 6.11 se resumen los resultados obtenidos para ambos sistemas. Se puede observar que la diferencia más significativa es la mayor sensibilidad del MDD respecto al MDN que sin llegar al valor teórico mejora sensiblemente (tabla 6.12). La pendiente de la curva de calibración es superior, aunque el aumento es menos importante que en el sistema sin preconcentración y no sólo no se ha alcanzado la sensibilidad teórica de  $59 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$ , sino que esta ha disminuido respecto al sistema sin etapa de preconcentración (tabla 6.12). Se ha de tener en cuenta que la pendiente obtenida cuando se trabaja con un electrodo únicamente (MDN) tampoco es la teórica sino menor. El  $LD_{ap}$  también mejora

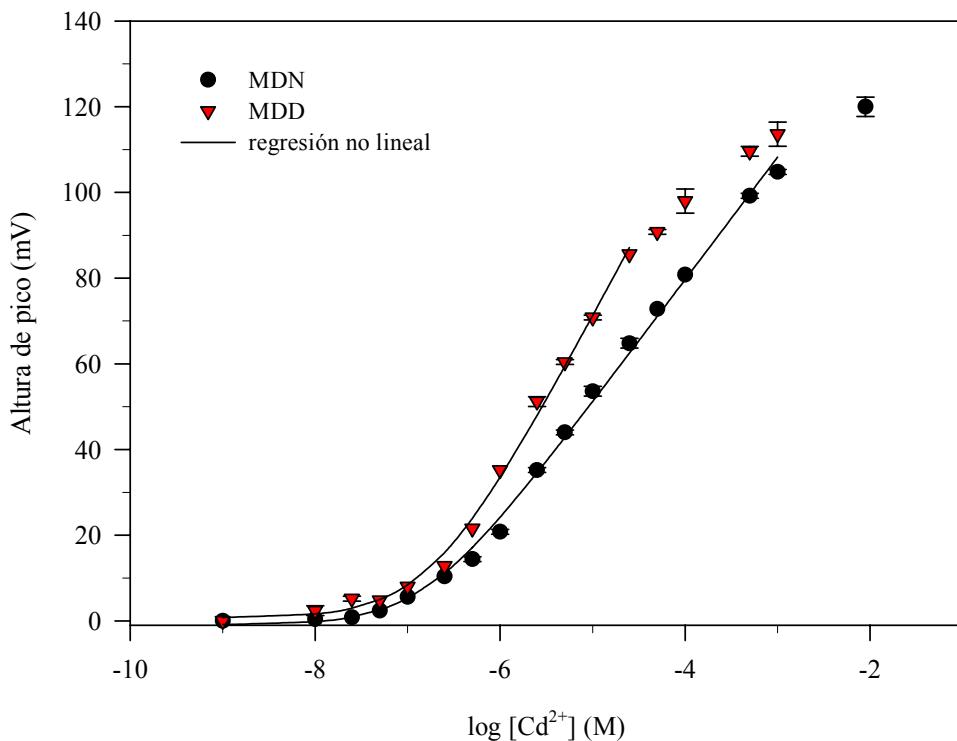
sensiblemente en ambos casos, aumentando en una década respecto al sistema sin preconcentración. El intervalo lineal se ha desplazado aproximadamente dos décadas de concentración respecto al sistema sin preconcentración, ya que el LIRL ha disminuido casi dos órdenes de magnitud en los dos modos de detección. Esto se explica si se tiene en cuenta el factor de preconcentración alcanzado, aproximadamente del orden de 30 (§ 6.6). La frecuencia de muestreo se ha estimado en  $5\text{ h}^{-1}$  para ambos sistemas. Esta frecuencia de análisis tan baja es debida al elevado tiempo de recuperación de la línea de base, que en el caso más importante supone casi 500 s. A éste se ha de añadir el tiempo de preconcentración, lo que supone un tiempo total de análisis de 14 min. en el caso más desfavorable. Este efecto está asociado con la elevada fuerza iónica del eluyente (solución de  $\text{NaNO}_3$  1,5M) que provoca un retardo importante en la recuperación de la respuesta del electrodo.

**Tabla 6.11** Principales características del los dos modos de detección implementados en el sistema con preconcentración en línea. La sensibilidad está calculada con el ajuste lineal ( $H=K+s\cdot\log(X)$ ) y el límite de detección con el ajuste no lineal ( $H=A+B\cdot\log(X+C)$ ,  $\text{LD}_{\text{ap}}=C$ ). El error en el  $\text{LD}_{\text{ap}}$  está calculado como el error estándar y en la sensibilidad como  $s_{(n-1)} \cdot t_{(n-2)}$ . En la repetitividad  $^a5\cdot10^{-6}\text{M}$  y  $^b5\cdot10^{-7}\text{M}$ .

| Parámetro  | SIA con MDN                             | SIA con MDD                               |
|--|---|---|
| Sensibilidad ( $\text{mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ ) | $27,6 (\pm 1,2)$                        | $36,8 (\pm 1,9)$                          |
| Intervalo lineal (M)                             | $2,5\cdot10^{-7}\text{--}1\cdot10^{-3}$ | $2,5\cdot10^{-7}\text{--}2,5\cdot10^{-5}$ |
| $\text{LD}_{\text{aparente}}$ (M)                | $1,5\cdot10^{-7} (\pm 0,3\cdot10^{-7})$ | $1,8\cdot10^{-7} (\pm 0,4\cdot10^{-7})$   |
| $n$ lineal ( $r/n$ no lineal)                    | $11 (0,998) / 16$                       | $7 (0,999) / 12$                          |
| Estabilidad ( $\text{mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ )  | 0,202                                   | 0,894                                     |
| Repetitividad (%) RSD)                           | $1,76^a/1,57^b$                         | $1,80^a/1,78^b$                           |
| Frecuencia de muestreo ( $\text{h}^{-1}$ )       | 5                                       | 5   |

En la figura 6.33 se muestran las curvas de calibración realizadas correspondientes al ajuste no lineal.

El método propuesto para la determinación de ion cadmio con dos modos de detección permite su análisis en un amplio intervalo de concentraciones, desde  $2,5\cdot10^{-7}\text{--}1\cdot10^{-3}\text{M}$ . El límite de detección ( $\text{LD}_{\text{ap}}$ ) de  $1,5\cdot10^{-7}\text{ M}$  alcanzado permite la determinación de ion cadmio en aguas residuales [Directiva 83/513/CEE]. Las características de ambos sistemas de detección no difieren significativamente y pueden utilizarse indistintamente para el análisis de aguas.



**Figura 6.33** Curvas de calibración obtenidas para dos calibrados efectuados con el sistema SIA en el modo de detección normal y en el modo de detección diferencial. Cada punto es la media de dos determinaciones. El error se ha calculado como  $s_{(n-1)}$ .

## 6.6 Caracterización de la etapa de preconcentración en línea

Con el objeto de evaluar la eficacia de la etapa de preconcentración se ha calculado el factor de preconcentración. Este cálculo se ha realizado de dos modos diferentes, como la relación de los límites de detección en el sistema sin preconcentración respecto al sistema con preconcentración (FP), y con el balance de masa comparando la respuesta obtenida en el sistema SIA con/sin etapa de preconcentración (FP\*). Se han utilizado los ajustes no lineales, considerando exclusivamente la zona lineal de respuesta con el objeto de minimizar el error de cálculo. Las dos estimaciones se han realizado para ambos modos de detección. Lógicamente, los valores obtenidos en los dos casos no han de diferenciarse significativamente, ya que la etapa de preconcentración es idéntica.

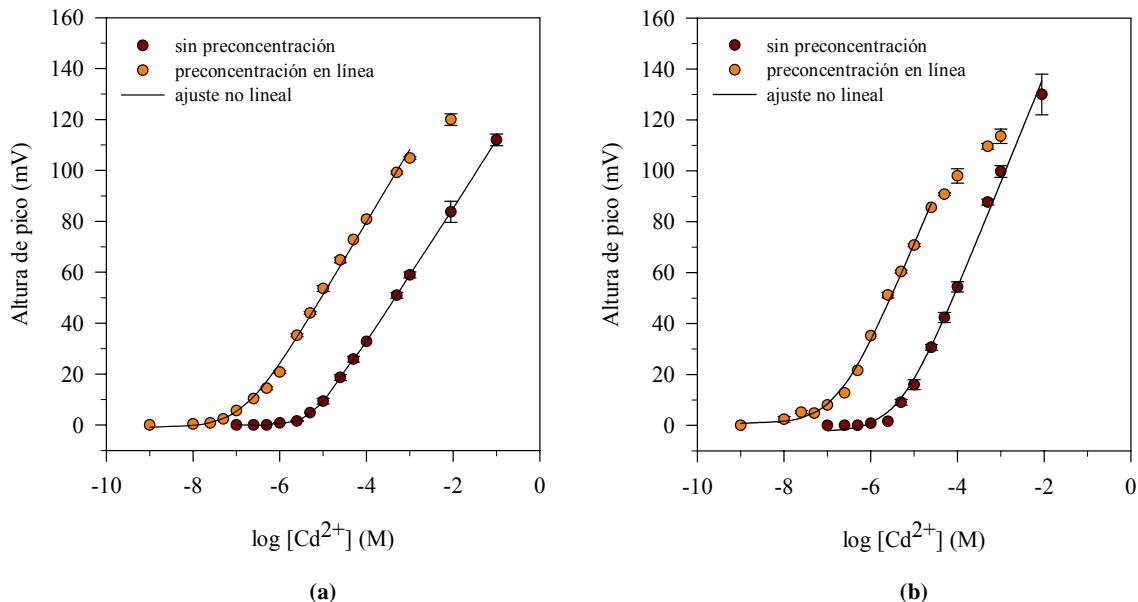
En la tabla 6.12 se resumen los resultados obtenidos en el cálculo del factor de preconcentración a partir de la relación entre los límites de detección para los dos modos de detección (ecuación 3.19). Se puede observar que el factor de preconcentración es del mismo orden de magnitud para los dos modos de detección, lo que verifica que las diferencias existentes sólo son debidas al propio sistema de detección.

**Tabla 6.12** Estimación del factor de preconcentración como la relación de límites de detección.

| Parámetro de calibración             | SPC MDN                               | CPC MDN                                 | SPC MDD                                 | CPC MDD                                   |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---|---|
| Intervalo lineal (M)                 | $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-1}$ | $2,5 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ | $5 \cdot 10^{-6}$ - $8,9 \cdot 10^{-3}$ | $2,5 \cdot 10^{-7}$ - $2,5 \cdot 10^{-5}$ |
| Sensibilidad (mV·dec <sup>-1</sup> ) | 25,3 ( $\pm 0,6$ )                    | 27,6 ( $\pm 1,2$ )                      | 39 ( $\pm 3$ )                          | 36,8 ( $\pm 1,9$ )                        |
| LD <sub>aparente</sub> (M)           | $5,9 \cdot 10^{-6}$                   | $1,5 \cdot 10^{-7}$                     | $4,7 \cdot 10^{-6}$                     | $1,8 \cdot 10^{-7}$                       |
| Factor de preconcentración           | -                                     | 39                                      | -                                       | 26  |

SPC: sin preconcentración, CPC: con preconcentración.

En la figura 6.34 se muestran a título de ejemplo las dos gráficas de calibrados comparativos para los dos modos de detección sin y con etapa de preconcentración en línea.



**Figura 6.34** Curvas de calibración comparativas para los sistemas sin/con etapa de preconcentración en línea, con ajuste no lineal. (A) Modo de detección normal y (b) modo de detección diferencial.

El factor de preconcentración está en torno a 30 en ambos sistemas, aunque si se compara la figura 6.34 (a) con la figura 6.34 (b) se puede observar que la respuesta del electrodo es más lineal para el modo de detección normal (a) que para el modo de detección diferencial (b). Utilizando las curvas de calibración pertenecientes al ajuste no lineal se ha estimado para cada método la concentración equivalente que tiene en el sistema sin preconcentración la señal obtenida en el sistema con preconcentración. Este cálculo se ha realizado en la zona lineal de la curva obtenida. En tabla 6.13 se muestran los resultados obtenidos. Se ha podido que en el sistema con MDN la relación de concentración (FP\*) obtenida se mantiene del orden de 50 para todas las concentraciones mientras que en el MDD es función de la concentración y disminuye con ésta. Parece evidente que en las condiciones de elución/detección utilizadas, el MDD no responde igual en todo el intervalo de concentración; este hecho está provocado por el solapamiento de las señales obtenidas en

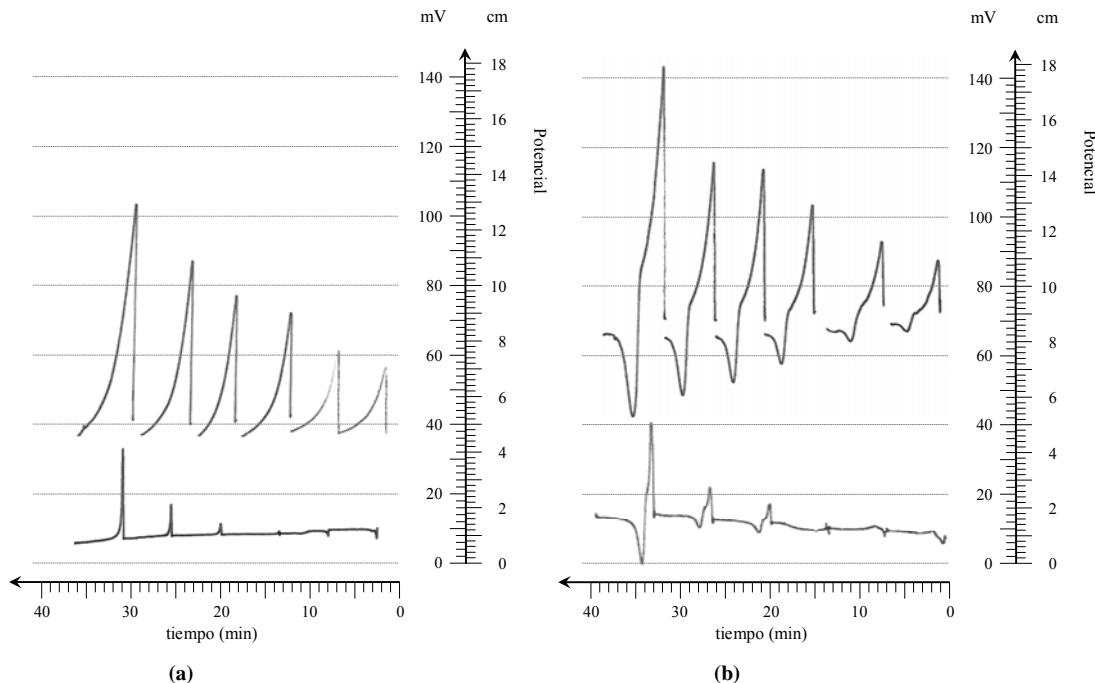
el modo de detección diferencial a concentraciones mayores de catión cadmio. Se puede observar que la sensibilidad empeora comparativamente respecto al modo de detección normal (tabla 6.12). De todas maneras, la versatilidad del sistema propuesto permite la determinación de ion cadmio a bajas concentraciones por debajo del límite de detección del electrodo, en dos condiciones distintas.

**Tabla 6.13** Ajustes no lineales para las curvas de calibración mostradas en la figura 6.34. El error está estimado como el error estándar en las curvas y como  $s_{(n-1)}$  para el FP\*.

|                  |  | <b>MDN</b>  |
|------------------|--|-------------|
| <b>SPC</b>       | $E=139,0 (\pm 0,9) + 26,8 (\pm 0,3) \cdot \log ([\text{Cd}^{2+}] + 5,9 \cdot 10^{-6} (\pm 0,5 \cdot 10^{-6}))$ |             |
| <b>CPC</b>       | $E=194 (\pm 3) + 28,6 (\pm 0,6) \cdot \log ([\text{Cd}^{2+}] + 1,5 \cdot 10^{-7} (\pm 0,3 \cdot 10^{-7}))$     |             |
|                  |  | <b>MDD</b>  |
| <b>SPC</b>       | $E=222 (\pm 6) + 42,2 (\pm 1,5) \cdot \log ([\text{Cd}^{2+}] + 4,7 \cdot 10^{-6} (\pm 1,0 \cdot 10^{-6}))$     |             |
| <b>CPC</b>       | $E=272 (\pm 1) + 40,3 (\pm 1,9) \cdot \log ([\text{Cd}^{2+}] + 1,8 \cdot 10^{-7} (\pm 0,4 \cdot 10^{-7}))$     |             |
| <b>FP* (MDN)</b> |  | $54 \pm 13$ |
| <b>FP* (MDD)</b> |  | $25 \pm 7$  |

FP\*: Estimado por interpolación de la respuesta obtenida en el sistema CPC en el ajuste lineal del sistema SPC.

A continuación en la figura 6.35 se muestran dos registros comparativos de la señal obtenida en los sistemas sin/con preconcentración en línea, para ambos métodos de detección. Las concentraciones analizadas son de derecha a izquierda:  $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ ,  $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ,  $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ,  $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$  y  $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ .



**Figura 6.35** Comparación de la señal obtenida para los sistemas con/sin preconcentración en línea. (a) Modo de detección normal y (b) modo de detección diferencial.

Finalmente, a modo de conclusión puede decirse que a pesar del incremento de señal obtenido para los dos modos de detección, resulta más idóneo el método de detección normal para ser aplicado en el análisis de muestras reales cuando éstas se encuentran en un amplio intervalo de concentración. En este sistema, la respuesta del electrodo se acerca más al comportamiento ideal durante un intervalo más amplio de concentraciones.

## 6.7 Análisis de muestras reales

Previamente a realizar el análisis de muestras, se ha realizado un estudio de eficacia del sistema para la eliminación de metales interferentes, especialmente ion plomo y cobre.

### 6.7.1 Evaluación del grado de interferencia

Los principales cationes con grado de interferencia significativo en la respuesta del electrodo sensible a ion cadmio, son el plomo y el cobre (§ 6.4.1.1). La presencia habitual de estos metales junto con cadmio en las posibles muestras a analizar, hace necesaria la validación de la eficacia del sistema de eliminación e impone un estudio sobre la influencia de la presencia de estos metales en los resultados analíticos.

Se han realizado estudios de verificación de la interferencia de estos iones en el sistema con preconcentración y modo de detección normal, para un intervalo de concentración de iones interferentes de  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-3}$  M.

En primer lugar se ha estudiado la ampliación del ciclo de lavado para eliminar los restos de patrón y muestra, que se realiza después de la etapa de preconcentración. Se ha estudiado el tiempo crítico a partir del cuál disminuye la señal analítica. Finalmente, el tiempo de lavado ha quedado establecido en 45 s. Este tiempo resultó ser suficiente, sin provocar pérdida de señal, para la eliminación de todos los restos que quedan en los intersticios de la columna y en el canal que la comunica con la válvula selectora de 8 vías (VS1). El ion cadmio permanece adsorbido en los lugares activos de la columna de intercambio iónico en forma de clorocomplejo.

Para realizar este estudio han sido analizadas soluciones puras de ion cadmio, en el intervalo de concentración  $5 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-4}$  M, y soluciones mixtas de  $\text{Cd}^{2+}$  con  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  en concentraciones variables. Se han realizado calibrados simultáneos en todo el intervalo lineal de respuesta con distintas concentraciones de ion interferente ( $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-3}$  M). Se ha analizado la respuesta obtenida en presencia y ausencia de interferente comparando la media de las alturas de pico obtenidas en cada uno estos calibrados respecto a un calibrado de ion cadmio sin interferente. Se ha aplicado el criterio estadístico de la prueba  $t$  por parejas para la media de valores y en ningún caso se ha superado el valor del estadístico  $t$

tabulado. Por ejemplo, para un concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  de  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$  se ha obtenido un estadístico  $t_{\text{cal}}=0,84$  menor que el valor crítico tabulado  $t_{\text{tab}}= 3,18$  y, para un concentración de  $\text{Pb}^{2+} 1 \cdot 10^{-4} \text{M}$  se ha obtenido un estadístico  $t_{\text{cal}}=1,41$  menor que  $t_{\text{tab}}= 3,18$ ; verificándose que no existen diferencias significativas entre las alturas de pico.

Se puede concluir que según la composición de las muestras a analizar, se consigue eliminar tanto la interferencia debida a ion cobre como a ion plomo sin alterar la determinación de ion cadmio. Por lo tanto se confirma la efectividad de la etapa de preconcentración y del ciclo de lavado en la eliminación de estos interferentes.

Existen referencias bibliográficas que presentan otras alternativas a la eliminación de interferentes antes de la determinación potenciométrica de cadmio. Han sido estudiada la eliminación de interferentes mediante el uso de soluciones tampón enmascarantes con salicilaldoxima [Ito et al., 1997] que permitía reducir la interferencia de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Ag}^+$ . Trojanowicz propone diversas alternativas de enmascarantes químicos e intercambio iónico para eliminar las interferencias provocadas por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , como la reducción previa de metales interferentes con hidroxilamina, complejación con neocuproina y retención con un intercambiador aniónico [Trojanowicz et al., 1998]. La solución implementada en este trabajo presenta ciertas limitaciones respecto a las referencias citadas pero presenta algunas ventajas como por ejemplo la sencillez del sistema experimental y del ciclo de preconcentración, elución y detección.

#### 6.7.2 Determinación de ion cadmio en muestras reales

El sistema SIA utilizado en el análisis de muestras reales es el mostrado en la figura 6.2 A. Se ha utilizado el modo de detección normal ya que como se ha visto antes presenta unas mejores características de respuesta (§ 6.6).

Las muestras analizadas proceden de una tierra contaminada por diversos metales pesados, proveniente de la ciudad de Torreón (Méjico). La presencia de una industria metalúrgica en la propia ciudad provocó la contaminación de zonas próximas, en un radio de 20 km. En la actualidad la zona está en proceso de descontaminación. Desde el año 2000 hasta la fecha se ha estado realizando un seguimiento anual de la eficacia de las tareas de remediación de las zonas contaminadas. El estudio realizado en el Grup de Sensors i Biosensors consiste básicamente en el seguimiento de la disminución de  $\text{Pb}^{2+}$  a lo largo del tiempo. Se escogieron 7 muestras correspondientes a la primera serie analizada en este estudio donde la concentración de ion cadmio se supone cercana al límite de detección ( $\text{LD}_{\text{ap}}$ ) del método propuesto.

Se trata de muestras muy complejas de analizar por la presencia de otros metales en concentraciones muy elevadas. Los metales presentes en mayor concentración son  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , a un nivel de concentración 20 y 100 veces superior a la de  $\text{Cd}^{2+}$ . Hay que sumar además el medio fuertemente ácido de éstas ( $\text{pH}=0$ ), ya que son muestras de tierra mineralizadas con  $\text{HNO}_3$  para obtener la disolución de los metales. Se plantean dos problemas importantes para el análisis de estas muestras. El primero es el medio ácido que puede modificar la reacción de formación del clorocomplejo. El segundo es la elevada concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  que también puede afectar a la etapa de preconcentración. Este metal es capaz de formar clorocomplejos y, aunque tienen una constante de formación muy pequeña, se encuentra en una concentración 100 veces superior. Por tanto, antes de realizar el análisis de estas muestras se ha efectuado un estudio previo para evaluar el grado de influencia de las variables expuestas en el proceso de complejación.

El estudio previo realizado ha consistido en efectuar calibrados simultáneos de ion cadmio en el intervalo de concentración lineal ( $5 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-4}$  M), en presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  en una concentración 100 veces superior en relación a cada una de las concentraciones de ion cadmio en el patrón y, también con el pH ajustado con  $\text{HNO}_3$  concentrado. La combinación de los dos efectos,  $\text{Zn}^{2+}$  y pH ácido ha sido estudiada también conjuntamente. Los resultados obtenidos han permitido establecer que la variable que más afecta a la reacción de complejación y a la etapa de preconcentración es el medio ácido. En estas condiciones se ha observado una disminución de señal del 30% en presencia de ácido, mientras que el efecto de la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  no representa una variación significativa respecto a la señal obtenida sólo para cadmio. Las señales no difieren más que el propio valor obtenido de RSD (%) para el método.

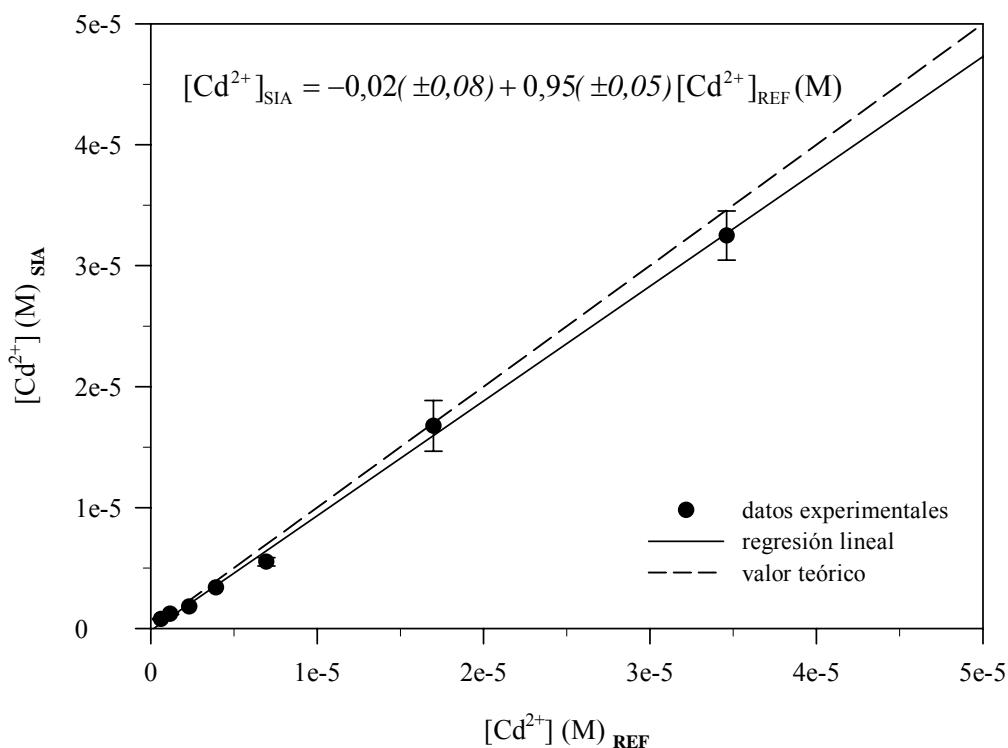
Por tanto, antes de analizar las muestras en el sistema propuesto se ha realizado un ajuste del pH con una disolución concentrada de  $\text{NaOH}$  hasta  $\text{pH}=2,0$ . Este es el pH en el que se encuentra la mezcla de muestra y reactivo después de la confluencia en la válvula solenoide (§ 6.5.2). Se ha utilizado una solución concentrada para minimizar la dilución del analito y se ha tenido en cuenta el volumen final adicionado antes del cálculo de la concentración de ion cadmio en las muestras.

Las muestras se han analizado por dos métodos. El sistema SIA propuesto con detección potenciométrica en el modo normal y como método de referencia la técnica de espectrofotometría de absorción atómica de llama. Las muestras se han analizado por duplicado en el sistema SIA, con un calibrado previo con soluciones patrón en un intervalo comprendido entre  $5 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-4}$  M.

La calidad de los resultados obtenidos por el sistema SIA implementado se ha evaluado con los resultados obtenidos por el método de referencia. Se han aplicado dos criterios estadísticos la prueba  $t$  por parejas y la comparación de métodos por regresión lineal [Miller & Miller, 1993].

Se ha aplicado la prueba  $t$  por parejas a las diferencias de las concentraciones obtenidas en ambas relaciones. Se ha obtenido un valor de  $t_{cal}=-0,27$  y el valor crítico de  $t_{tab}$  para  $n-1$  grados de libertad es 2,45, para un nivel de confianza del 95%. Por tanto como el valor calculado es menor que éste, se acepta la hipótesis nula, y puede considerarse estadísticamente equivalentes los resultados obtenidos por el método SIA.

Aunque sólo se hayan realizado 7 determinaciones experimentales, como el intervalo de aplicación es bastante amplio, se ha aplicado el test de la regresión lineal. El resultado obtenido se muestra en la figura 6.36. Los parámetros de la regresión lineal y los respectivos límites de confianza para un nivel de significación del 95%, se muestran en la misma figura, con un factor de correlación de 0,998. Los valores obtenidos confirman la ausencia de diferencias significativas entre los dos métodos utilizados. En la situación ideal, la ordenada es igual al valor teórico de 0,0 y la pendiente junto con el coeficiente de correlación al valor teórico de 1,0.



**Figura 6.36** Evaluación comparativa de los resultados obtenidos en el análisis de Cd<sup>2+</sup> en las muestras reales. Regresión directa del método SIA frente al método de referencia (EAA).

El sistema propuesto permite la determinación de ion cadmio para niveles de concentración dos décadas por debajo del límite inferior de respuesta lineal del detector usado, hasta un valor de  $2,5 \cdot 10^{-7} M$ , haciendo posible la determinación de este catión en el intervalo de 0,0281-112 ppm de  $Cd^{2+}$ . El sistema SIA permite determinar ion cadmio en un intervalo muy amplio de concentraciones con un límite de detección aparente de 0,015 ppm para el modo de detección normal y 0,02 ppm para el modo de detección diferencial.

## **6.8 Conclusiones**

El sistema SIA implementado con los dos modos de detección, constituye una buena alternativa a los métodos antes descritos para la determinación potenciométrica de ion cadmio [Motonaka et al., 1984; Lin et al., 1987; Gangaiah y Naidu, 1988; Buchberger et al., 1991; Ito et al., 1997]. Esta técnica permite la determinación de ion cadmio para niveles de concentración inferiores al límite inferior de respuesta lineal del electrodo. La incorporación de una columna de intercambio iónico aporta selectividad al sistema, eliminando posibles interferencias debidas a  $Pb^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , además de disminuir el límite práctico de preconcentración. El sistema propuesto permite la determinación de ion cadmio en un intervalo muy amplio de concentraciones, mayor que el de la espectrofotometría de absorción atómica de llama (0-2 ppm), y permite analizar concentraciones de cadmio inferiores al LIRL del electrodo con mayor sensibilidad analítica mediante el modo de detección diferencial.

El método implementado permite la automatización del análisis de ion cadmio de forma sencilla y a un coste reducido tanto si se valora la instrumentación utilizada, como si se tiene en cuenta el consumo de reactivos. Es por tanto, una buena alternativa a los métodos espectrofotométricos más sofisticados y con mayor coste de mantenimiento.

## 6.9 Bibliografía

- Alegret, S.; Alonso, J.; Bartroli, J.; Lima, J.L.F.C.; Machado, A.A.S.C.; Paulis, J.M.** "Flow-through sandwich PVC matrix membrane electrode for flow injection analysis", *Analytical Letters*, **18** (A18), 2291-2303, (1985).
- Alpizar, J.; Crespí, A.; Cladera, A.; Forteza, R.** "Simultaneous determination of chloride and fluoride ions in waters by sequential-injection analysis", *Electroanalysis*, **8** (11), 1051-1054, (1996a).
- Alpizar, J.; Crespí, A.; Cladera, A.; Forteza, R.** "Simultaneous determination of chloride and pH in waste waters", *Laboratory Robotics and Automation*, **8** (3), 165-170, (1996b).
- APHA-AWWA-WEF**; "Standard methods for the examination of water and wastewater", 20th edition. Ed. APHA-AWWA-WEF, 4500-O<sub>3</sub>A, (1999).
- Araújo, A.N.; Costa, R.C.C.; Lima, J.L.F.C.** "Application of sequential injection analysis to the assay of lead retention characteristics by poly(vinylpyrrolidone): trace analysis of lead in waters", *Analytical Sciences*, **15** (10), 991-994, (1999).
- Barber, R.** "Técnicas sandwich en análisis por inyección en flujo", **Tesis doctoral**, Universitat Autònoma de Barcelona, (1992).
- Baccan, N.; Miranda, C.E.S.; Reis, B.F.** "Pré-concentração empregando extrações fase líquida-fase-sólida em sistemas de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica", *Química Nova*, **19** (6), 623-635 (1996).
- Bailey, P.L.** "Analysis with Ion-Selective Electrodes", Heyden & Son Ltd., London, (1976).
- Barquero, E.J.** "Disseny, construcció i evaluació d'analitzadors per a la monitorització mediambiental", **Tesi doctoral**, Universitat Autònoma de Barcelona, (2001).
- Bettridge, D.; Dagless, E.L.; Fields, B., Graves, N.K.** "A highly sensitive flow-through phototransducer for unsegmented continuos-flow analysis demonstrating high-speed spectrophotometry at the parts per 10<sup>9</sup> level and a new method of refractometric determinations", *Analyst*, **103**, 897-908, (1978).
- Buchberger, W.; Haddad, P.R.; Alexander, P.W.** "Separation of metal complexes of ethylenediaminetetraacetic acid in environmental water samples by ion chromatography with UV and potentiometric detection", *Journal of Chromatography*, **558** (1), 181-186, (1991).
- Bulska, E.; Walcerz, M.; Jedral, W.; Hulanicki, A.** "On-line preconcentration of lead and cadmium for flame atomic absorption spectrometry using a flow-through electrochemical microcell", *Analytica Chimica Acta*, **357** (1-2), 133-140, (1997).
- Burguera, J.L.; Burguera, M.; Townshend, A.** "Determination of zinc and cadmium by flow injection analysis and chemiluminescence", *Anaytical Chimica Acta*, **127** , 199-201, (1981).
- Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual**, Bio-Rad Laboratories, 1414 Harbour Way South, Richmond, CA 94804.
- Chen, H.; Jin, J.; Wang, Y.** "Flow injection on-line coprecipitation-preconcentration system using copper(II) diethyldithiocarbamate as carrier for flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium, lead and nickel in environmental samples", *Analytica Chimica Acta*, **353** (2-3), 181-188, (1997).
- Couto, C.M.C.C.; Lima, J.L.F.C; Montenegro, M.C.B.S.** "Increased sensitivity potentiometric detectors for FIA", *Analytical Sciences*, **13**, 403-408, (1997).
- Couto, C.M.C.C.; Lima, J.L.F.C.; Montenegro, M.C.B.S.M., Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.** "Potentiometric flow injection determination of cadmium in waste waters including in-line ion-exchange separation/concentration", *Analytica Chimica Acta*, **366** (1-3), 155- 161, (1998).

- Couto, C.M.C.M.** “Desenvolvimento e aplicaçao de sistemas de fluxo contínuo de alta sensibilidade com detecçao potenciométrica”, **Dissertaçao de Doutoramento**. Faculdade de Farmacia, Universidade do Porto, (1999).
- Couto, C.M.C.M., Montenegro, M.C.B.S.M.** “Detectores potenciométricos para sistemas de analise por injeçao em fluxo, evaluaçao e aplicaçao”, *Química Nova On line*, **23** (6), (2000).
- da Silva, C.L.; Masini J.C.** “Determination of Cu, Pb, Cd, and Zn in river sediment extracts by sequential injection anodic stripping voltammetry with thin mercury film electrode”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **367** (3), 284-290, (2000).
- Directiva 83/513/CEE del Consejo**, de 26 de septiembre de 1983, relativa a los valores límite y a los objetivos de calidad para los vertidos de cadmio (**DOCE nº 291 / 1983-10-24**).
- Fang, Z.; Ruzicka, J.; Hansen, E.H.** “An efficient flow-injection system with on-line ion-exchange preconcentration for the determination of trace amounts of heavy metals by atomic absorption spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, **164**, 23-39, (1984).
- Fang, Z.** “Flow injection separation and preconcentration”, VCH Publishers, Weinheim, (1993).
- Fehér, X.Z.; Tóth, G.N.; Pungor, E.** “A detailed study of sample injection into flowing streams with potentiometric detection”, *Analytica Chimica Acta*, **98** (2), 193-203, (1978).
- Ferreira, J.R.; Zagatto, E.A.G.; Zezzi, M.A.; Brienza, S.M.B.** “Determination of zinc in plants by flow injection spectrophotometry with ion-exchange separation”, *Analyst*, **115** (6), 779-782, (1990).
- Ferreira, I.M.P.L.V.O.** “Construçao, avaliaçao e aplicaçao de detectores potenciométricos tubulares para FIA baseados em membranas cristalinas homogéneas”, **Dissertaçao de Doutoramento**, Faculdade de Farmacia, Universidade do Porto, (1994).
- Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Lima, J.L.F.C.** “Tubular potentiometric detector for flow injection based on homogeneous crystalline membranes sensitive to copper, cadmium and lead”, *Analyst*, **119**, 209-212, (1994).
- Frenzel, X.W.** “Enhanced performance of ion-selective electrodes in flow injection analysis: non-nernstian response, indirect determination, differential detection and modified reverse flow injection analysis”, *Analyst*, **113** (7), 1039-1046, (1988).
- Gangaiah, T.; Naidu, G.R.K.** “Potentiometric determination of cadmium in water”, *Proceedings of the Indian National Science Academy, Part A: Physical Sciences*, **54** (1), 114-16, (1988).
- Goodman & Giman's.** “The pharmacological basis of therapeutics”, 9<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill, New York, (1996).
- Greenway, G.M.; Nelms, S.M.; Skhosana, I.; Dolman, S.J.** “A comparison of preconcentration reagents for flow injection analysis flame atomic spectrometry”, *Talanta*, **51** (14), 1909-1915, (1996).
- Gubeli, T.; Christian, G.D.; Ruzicka, J.** “Fundamentals of Sinusoidal Flow Sequential Injection Spectrophotometry”, *Analytical Chemistry*, **63**, 2407-2413, (1991).
- Haemmerli, A.; Janata J.; Brown, H.M.** “A flow injection system for measurement of chemical response time of microelectrodes”, *Analyst*, **114**, 115-121, (1982).
- Hansen, E.H.; Krug, F.J.; Ghose, A.K.; Ruzicka, J.** “Rapid determination of nitrogen, phosphorus and potassium in fertilisers by flow injection analysis”, *Analyst*, **102** (1219), 714-722, (1977).
- Hashemi, P.; Olin, A.** “Equilibrium and kinetic properties of a fast iminodiacetate based chelating ion exchanger and its incorporation in a FIA-ICP-AES system”, *Talanta*, **44** (6), 1037-1053, (1997).

- Hayashibe, Y.; Sayama, Y.** "Determination of trace amounts of cadmium in a hydrometallurgical zinc refining process stream by a flow-injection method with on-line preconcentration and spectrophotometric detection", *Analyst*, **121** (1), 7–11, (1996).
- <http://www.epa.gov>, consultada en Febrero de 2004.
- <http://www.fia.com>, consultada en Febrero de 2004.
- Infante, H.G.; Fernandez-Sanchez, M.L.; Sanz-Medel, A.** "Ultratrace determination of cadmium by atomic absorption spectrometry using hydride generation with in situ preconcentration in a palladium-coated graphite atomizer", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **11**(8), 571-575, (1996).
- Ito, S.; Asano, Y.; Wada, H.** "Development of highly sensitive cadmium ion selective electrodes by titration method and its application to cadmium ion determination in industrial waste water", *Talanta*, **44** (4), 697-704 (1997).
- IUPAC**, Analytical Chemistry Division on Analytical Nomenclature, *Pure and Applied Chemistry*, **66**, 2527, (1994).
- IVaska, A.; Ruzicka, J.** "From flow injection to sequential injection comparison of methodologies and selection of liquid drives", *Analyst*, **118**, 885-889, (1993).
- Kallmann, S.; Oberthin, H.; Liu, R.** "Determination of cadmium in zinc concentrates and other zinc rich materials. A cation procedure", *Analytical Chemistry*, **32**, 58-60, (1960).
- Klaassen, C.D.** "Casarett & Doull's Toxicology: The basic Science of Poisons", 5<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill, New York, (1996).
- Lapa, R.A.S.; Lima, J.L.F.C.; Barrado, E.; Vela, H.** "Determination of low levels of nitrates in natural waters by direct potentiometry using an ion-selective electrode of improved sensitivity", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **66** (1), 71-78, (1997).
- Lenehan, C.H.; Barnett, N.W.; Lewis, S.W.** "Sequential injection analysis", *Analyst*, **127**, 997-1020, (2002).
- Lin, S.; Wang, X.; Wang, Y.; Zeng, Y.** "Determination of cadmium in waste waters with an ion-selective electrode", *Fenxi Huaxue*, **15** (9), 861, (1987).
- Liu, Y.; Ingle, J.D.** "Automated on-line ion-exchange trace enrichment system with flame atomic absorption detection", *Analytical Chemistry*, **61**, 520-524, (1989a).
- Liu, Y.; Ingle, J.D.** "Automated two-column ion exchange system for determination of the speciation of trace metals in natural waters", *Analytical Chemistry*, **61**, 525 – 529, (1989b).
- Luca, G.C.; Reis, B.F; Zagatto, E.A.G.; Montenegro, M.C.B.S.M.; Araùjo, A.N.; Lima, J.L.F.C.** "Development of a potentiometric procedure for determination of glycerol and 2,3-butanediol in wine by sequential injection analysis", *Analytica Chimica Acta*, **366**, 193-199, (1998).
- Lurie, J.** "Handbook of Analytical Chemistry", Editorial MIR, Moscow, (1975).
- Marczenko, Z.** "Separation and Spectrophotometric Determination of Elements", John Wiley and Sons, Chichester, (1985).
- Marshall, G.D.; van Staden, J.F.** "Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis", *Process Control and Quality*, **3**, 251-261, (1992).
- Marshall, G.D.; van Staden, J.F.** "Analyte enrichment using sequential-injection analysis", *Instrumentation Science and Technology*, **25** (4), 307-320, (1997).
- Miller, J.C.; Miller, J.N.** "Estadística para química analítica." 2<sup>a</sup> edición. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, (1993).

- Minczewski, J.; Chwastowaska, J.; Dybcziynski, R.** "Separation and preconcentration methods in inorganic trace analysis", Ellis Horwood, Chichester, (1976).
- Motonaka, J.; Ikeda, S.; Tanaka, N.** "Potentiometric titration of mixtures of cadmium, calcium, and magnesium ions with a cadmium ion-selective electrode", *Bunseki Kagaku*, **33** (10), 551-555, (1984).
- Neto, J.A.G.; Bergamin, H.; Sartini, R.P.; Zagatto, E.A.G.** " Determination of cadmium in foodstuffs and plant materials by flow injection-spectrophotometry including ion exchange", *Analytica Chimica Acta*, **306** (2-3), 343-349, (1995a).
- Neto, J.A.G.; Bergamin, H.; Zagatto, E.A.G.; Drug, F.J.** "Determination of cadmium in fertilizers by flow-injection spectrophotometry", *Analytica Chimica Acta*, **308** (1-3), 439-445, (1995b).
- Oms, M. T.; Cerdà, A.; Cerdà, V.** "Preconcentration by flow reversal in conductimetric sequential injection analysis of ammonium", *Electroanalysis*, **8** (4), 387-390, (1996).
- Parczewski, A.; Stepak, R.** " Random error in the CCS (cells connected in series) potentiometric method", *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, **316**(1), 29-31, (1983).
- Parczewski, A.** "Signal processing with a summing operational amplifier in multicomponent potentiometric titrations", *Talanta*, **34** (6), 586-588, (1987).
- Parczewski, A.** "Determination of two metals from a single potentiometric titration curve The application of two indicator electrodes", *Talanta*, **35** (6), 473-478 (1988).
- Pasekova, H.; Sales, M.G.; Montenegro, M.C.B.S.M.; Araújo, A.N., Polasek, M.** "Potentiometric determination of acetylsalicylic acid by sequential injection analysis (SIA) using a tubular salicylate-selective electrode", *Journal pharmaceutical and biomedical*, **24** (5-6), 1027-1036, (2001).
- Pimenta, A.M.; Araújo, A.N.; Montenegro, M.C.V.B.S.M.** "Sequential injection analysis of captopril based on colorimetric and potentiometric detection", *Analityca Chimica Acta*, **438**(1-2), 31-38, (2001).
- Porta, V.; Sarzanini, C.; Mentasti, E.** "On-line preconcentration and ICP determination for trace metal analysis" *Mikrochimica Acta*, **3** (3-6), 247-255, (1989).
- Pungor, E.; Toth, K.; Nagy, G.** "Ion and Enzyme electrodes in Biology and Medicine", Ed. M. Kessler, Urban ans Schwarzenberger, Munchen, (1976).
- Rao, S.S.** "Optimization. Theory and Applications", 2<sup>nd</sup> ed.; John Wiley & Sons, New Delhi, (1987).
- REAL DECRETO 140/2003**, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE nº 45-2003 / 2003-02-21).
- Rodier, J.** "L'Analyse de l'eau", 8<sup>e</sup> Edition, Dunod Technique, Paris, (1997).
- Rubí, E.; Forteza, R.; Cerdà, V.** "Preconcentration and colorimetric determination of Fe (III) by sequential injection analysis", *Laboratory Robotics and Automation*, **8** (3), 149-156, (1996).
- Rubí, E.; Jiménez, M.S.; Bauzá de Mirabó, F.; Forteza, R.; Cerdà, V.** "Preconcentration and atomic-absorption determination of iron by sequential- injection analysis", *Talanta*, **44** (4), 553-562, (1997).
- Ruzicka, J.; Hansen, E.H.** "Part IV. The solid-state cadmium(II) electrode in EDTA titrations and cadmium buffers", *Analytica Chimica Acta*, **63**, 115-128, (1973).
- Ruzicka, J.; Hansen, E.H.** "Flow Injection Analysis. Part I: A new concept of fast continuous flow analysis", *Analytica Chimica Acta*, **78**, 145, (1975).

- Ruzicka, J.; Hansen E.H.; Zagatto, E.A.** "Flow injection analysis : Part VII. Use of ion-selective electrodes for rapid analysis of soil extracts and blood serum. Determination of potassium, sodium and nitrate", *Analytica Chimica Acta*, **88** (1), 1-16, (1977).
- Ruzicka, J.; Hansen, A.H.** "Flow injection analysis: Part X. theory, techniques and trends", *Analytica Chimica Acta*, **99** (1), 37-76 , (1978).
- Ruzicka, J.; Marshall, G.D.** "Sequential Injection: a New Concept for Chemical Sensors, Process Analisys and Laboratory Assays", *Analytica Chimica Acta*, **237**, 329-343, (1990).
- Snoeyink, V.L.; Jenkins, D.** "Química del agua", Ed. Limusa, México D. F., (1995).
- Stepak, R.** "Application of cells connected in series as a means to enhance the sensitivity of potentiometric analysis", *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, **315** (7), 629-30, (1983).
- Tao, S.; Shijo, Y.; Wu, L.; Lin, L.** "Preconcentration of trace amounts of silver and cadmium by ion exchange and micro-extraction from water for flame atomic absorption spectrometry", *Analyst*, **119** (7), 1455-1458, (1994).
- Tóth, K.; Lindner, E.; Pungor, E.; Kolev, S.D.** "Flow-injection approach for the determination of the dynamic response characteristics of ion-selective electrodes. Part 2. Application to tubular solid-state iodide electrode", *Analytica Chimica Acta*, **234**, 57-65, (1990).
- Trojanowicz, M.; Alexander, P.W.; Hibbert, D.B.** "Flow-injection potentiometric determination of free cadmium ions with a cadmium ion-selective electrode", *Analytica Chimica Acta*, **370** (2-3), 267-278, (1998).
- Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D.** "Flow Injection Analysis, Principles e Applications", Ed. Ellis Horwood, Chichester, (1987).
- Vandecasteele, C.; Block, C.B.** "Modern methods for trace element determinations", Jonh Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, England, (1984).
- Wang, J.; Hansen, E.H.** "Coupling on-line preconcentration by ion-exchange with ETAAS: A novel flow injection approach based on the use of a renewable microcolumn as demonstrated for the determination of nickel in environmental and biological samples", *Analytica Chimica Acta*, **424** (2), 223-232, (2000).
- Wang, J.; Hansen, E.H.** "Coupling sequential injection on-line preconcentration by means of a renewable microcolumn with ion-exchange beads with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry: Comparing the performance of eluting the loaded beads with transporting them directly into the graphite tube, as demonstrated for the determination of nickel in environmental and biological samples", *Analytica Chimica Acta*, **435** (2), 331-342, (2001).
- Wang, J.; Hansen, E. H.** "Sequential injection on-line matrix removal and trace metal preconcentration using a PTFE beads packed column as demonstrated for the determination of cadmium by electrothermal atomic absorption spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometri*, **17** (3), 248-252, (2002a).
- Wang, J.; Hansen, E.H.** "Development of an automated sequential injection on-line solvent extraction-back extraction procedure as demonstrated for the determination of cadmium with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, **456** (2), 283-292, (2002b).
- Xu, Z-H.; Pan H-Y.; Xu, S-K.; Fang Z-L.** "A sequential injection on-line column preconcentration system for determination of cadmium by electrothermal atomic absorption spectrometry", *Spectrochimica Acta, Part B*, **55** (3), 213-219, (2000).



# **Microsistemas**



# Capítulo 7

---

## *Desarrollo de sistemas miniaturizados de gestión de fluidos. Modelización y aplicación al análisis de ion nitrito*

---

### 7.1 Introducción

El primer microsistema analítico fue desarrollado en 1979 por la Universidad de Stanford [Terry et al., 1979]. Se fabricó un cromatógrafo de gases en un chip de silicio y, aunque no fue comercialmente viable, permitió verificar la posibilidad de miniaturizar instrumentación analítica compleja. No obstante hubo que esperar hasta el año 1990 en que Manz, A. et al. [1990] adoptaron de nuevo la idea, proponiendo un nuevo concepto en química analítica que denominaron microsistemas de análisis total (*micro-total analysis systems*,  $\mu$ TAS). Los  $\mu$ TAS son sistemas analíticos miniaturizados que incorporan todos los elementos necesarios para la realización del procedimiento analítico.

En lo últimos 10 años y dentro de este ámbito, se ha hecho un considerable esfuerzo investigador dirigido al desarrollo de microsistemas de gestión de fluidos. Este es el elemento clave del  $\mu$ TAS ya que constituye la estructura básica de soporte sobre la que se integraran el resto de elementos. Este esfuerzo se ha concentrado especialmente en el desarrollo de nuevos principios para una gestión eficiente de fluidos en entornos miniaturizados (microfluídica), el desarrollo de nuevas técnicas de microfabricación, o

adaptación de las preexistentes, para la obtención de estas estructuras de soporte [Reyes et al., 2002] y el estudio y aplicación de nuevos materiales para su construcción.

Tras esta primera etapa, y una vez accesibles diferentes estructuras de soporte miniaturizadas para la gestión de fluidos se ha iniciado una segunda fase centrada en el desarrollo e integración de elementos activos y pasivos miniaturizados capaces de realizar una gestión automatizada de los fluidos en dichas estructuras. En esta fase todavía no se han alcanzado los objetivos marcados, por lo que existe un número muy reducido de estos componentes accesibles comercialmente. Por este motivo, la aplicación de los  $\mu$ TAS en muestras reales se ha realizado con sistemas híbridos (Meso Sistemas) donde solo la estructura soporte de la gestión de fluidos esta realmente miniaturizada.

### **7.1.1 Elementos básicos para la gestión de microfluidos**

El desarrollo de microsistemas de análisis total exige la integración de numerosos elementos pasivos y activos, todos ellos miniaturizados, con un alto grado de compatibilidad. Hasta el momento, muchos de ellos se han diseñado individualizadamente y su operatividad experimental, integrados en un microsistema, todavía no ha sido evaluada. Para validar su funcionamiento se ha acudido, habitualmente, a la realización de simulaciones basadas en modelos teóricos. Estos modelos exigen un conocimiento profundo del comportamiento hidrodinámico de los fluidos a microescala.

A continuación se detallan las características principales de algunos elementos miniaturizados, activos y pasivos, utilizados en la gestión de fluidos que se encuentran en una fase muy avanzada de desarrollo. Así mismo se describirán sucintamente algunos de los fenómenos y propiedades hidrodinámicas de los fluidos a escala micro que han dirigido el diseño de tales dispositivos.

#### *7.1.1.1 Elementos activos*

En los sistemas microfluídicos se utilizan caudales muy pequeños, por tanto el desarrollo de microbombas capaces de trabajar con precisión a caudales muy bajos es crítico. Diversos sistemas, cada uno de ellos con sus ventajas y desventajas particulares, pueden ser utilizados para controlar el movimiento de los fluidos. La generación de presión puede ser inducida mediante ultrasonidos, elementos piezoelectrinos, dispositivos neumáticos en el chip, bombas de fuerza centrífuga, electrocinéticas, y también por dispositivos externos al chip como bombas, sistemas neumáticos o a través de reservorios de fluidos. Las propiedades de los flujos inducidos por presión no están bien caracterizadas. Esta técnica genera, normalmente, caudales altos y es un sistema fácil de controlar desde dispositivos externos al chip. Presentan, sin embargo, como limitaciones importantes, la dificultad de

integrar los componentes en el microchip y su control físico mediante válvulas de difícil escalado que tienen diámetros inferiores a 10  $\mu\text{m}$ . Además, estos sistemas producen dispersión de perfiles laminares [Polson, 2001].

Las microbombas se clasifican en dos categorías: mecánicas y no-mecánicas. Las primeras incluyen diferentes tipos entre los que se encuentran las bombas peristálticas y las de pistón [Shoji, 1999]. El caudal y la presión máximas obtenidas son función directa de las válvulas y actuadores utilizados. La Universidad de Twente ha desarrollado una microbomba donde se han empleado técnicas de microfabricación en silicio para obtener el cuerpo de la bomba y enlace anódico del silicio al cristal. Su funcionamiento es análogo al de una bomba peristáltica y está integrada por tres válvulas piezoeléctricas activas. El grupo de van Lintel ha construido un bomba utilizando válvulas de silicio antiretorno [van Lintel et al., 1988]. Esashi y Shoji, han creado bombas de polisilicio fabricadas por microfabricación de superficie [Sequeira et al., 2002]. Sin embargo, la realidad, es que no hay bombas micromecánicas capaces de trabajar durante tiempos largos con suficiente estabilidad a los caudales bajos requeridos para estos sistemas. Este factor complica su uso en microsistemas dedicados con funcionamiento autónomo.

Las técnicas de bombeo que no requieren partes mecánicas, utilizan como fuerza impulsora en la generación de movimiento interacciones de campo eléctrico. Estas bombas aprovechan el efecto electrohidrodinámico, electroosmótico y los ultrasonidos. En las bombas ultrasónicas, el movimiento del fluido es inducido por las ondas. Las bombas electroosmóticas implican el bombeo de un líquido a través de un tubo capilar al que se aplica un campo eléctrico externo. El transporte electroosmótico es ideal cuando se quiere minimizar la dispersión efectiva y se trabaja en canales pequeños, pero presenta la desventaja de su difícil control. Además está influenciado por las propiedades particulares del fluido [Tice, 2004] y es difícil mantener constante el gradiente de potencial a grandes distancias.

Los sistemas de bombeo más utilizados a escala micro son los basados en fenómenos electrocinéticos, o de presión inducida, aunque también se han implementado otras soluciones comentadas anteriormente.

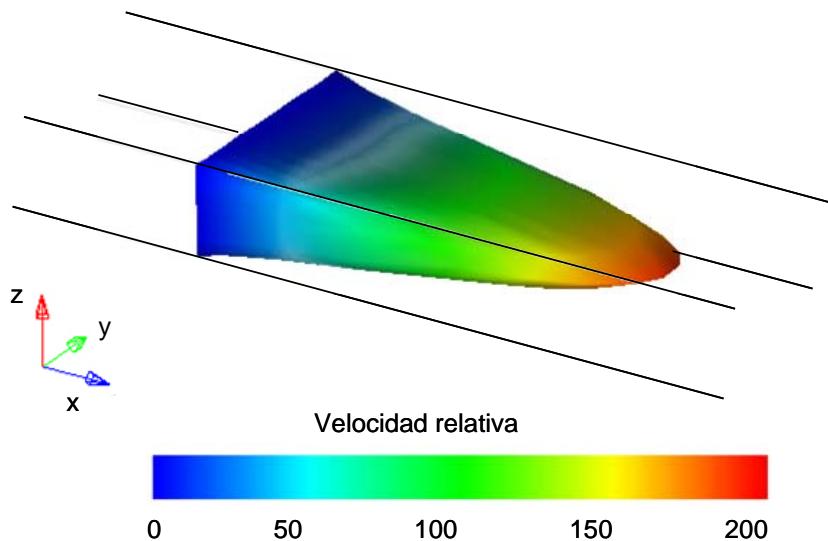
El flujo de un líquido a través de un microcanal se puede caracterizar por el número de Reynolds (Re), definido este como:

$$\text{Re} = \frac{\rho \cdot V_m \cdot L}{\mu} \quad \text{ecuación 7.1}$$

donde,  $L$  es la cota más grande del canal,  $\mu$  es la viscosidad,  $\rho$  es la densidad del fluido, y  $V_m$  es la velocidad media del flujo. En la mayoría de los microcanales,  $L$  es igual a  $4A/P$  donde  $A$  es el área representativa del canal y  $P$  es el perímetro del canal. Debido a las reducidas dimensiones de los microcanales,  $Re$  es generalmente mucho menor de 100, a menudo menor de 1. En este régimen del número de Reynolds, el flujo es totalmente laminar y no existe ninguna turbulencia. La transición al flujo turbulento ocurre generalmente para número de Reynolds de 2000. El flujo laminar proporciona los medios para que las moléculas se pueden transportar de una manera relativamente fiable a través de microcanales. Sin embargo, se ha de resaltar que incluso en Reynolds por debajo de 100, es posible que se den fenómenos como la separación del flujo [Kamholz et al., 2001].

De los métodos de impulsión comentados anteriormente los más utilizados son aquellos en los que el líquido se bombea a través de un dispositivo de desplazamiento positivo como las microburetas o las bombas peristálticas.

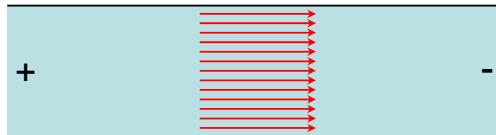
La resolución de la ecuación de Navier-Stokes para un flujo laminar en un canal rectangular impulsado por un sistema de presión, considerando que la velocidad del líquido en las paredes es cero, determina un perfil parabólico de la velocidad dentro del canal (figura 7.1).



**Figura 7.1** Perfil de velocidad característico dentro de un canal de microchip correspondiente a un flujo laminar, obtenido en un bombeo mecánico.

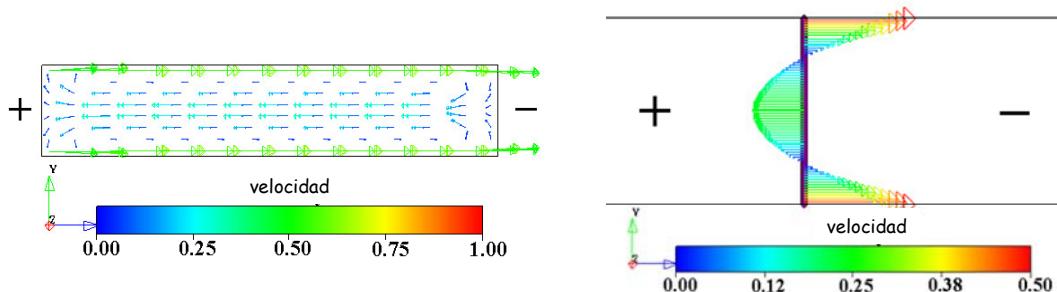
Este perfil parabólico de la velocidad tiene implicaciones significativas para la distribución de las moléculas transportadas dentro de un canal. Los sistemas de flujo impulsados por presión puede ser una solución barata y absolutamente reproducible para el bombeo de líquidos en elementos de microfluídica. Actualmente, la tendencia a desarrollar microbombas funcionales integradas en el microchip, permite prever la utilización futura de estos sistemas de bombeo en aplicaciones de miniaturización.

El bombeo electrosmótico es el mecanismo de impulsión más utilizado en los sistemas microfluídicos. Si las paredes de un microcanal adquieren una determinada carga eléctrica, fenómeno habitual en la mayoría de las superficies, en la capa adyacente a dicha superficie se formará una segunda capa eléctrica de iones de signo contrario. Cuando se aplica un campo eléctrico a través del canal, los iones en la segunda capa se mueven hacia el electrodo de la polaridad opuesta. Esto provoca el movimiento del fluido cercano a las paredes y la transferencia vía fuerzas viscosas creando un movimiento convectivo del líquido en el canal. Si el canal está abierto en los electrodos, como normalmente ocurre, el perfil de velocidad es uniforme a través de todo lo ancho del canal (figura 7.2).



**Figura 7.2** Perfil de velocidad característico dentro de un canal abierto sometido a un bombeo electroosmótico.

Sin embargo, si el campo eléctrico se aplica a través de un canal cerrado (o existe una contrapresión en los dispositivos de bombeo), se forma un canal de recirculación central donde el líquido se mueve en una dirección opuesta al que está en las paredes (figura 7.3). En canales cerrados, la velocidad a lo largo de la línea central del canal es el 50% de la velocidad en las paredes.



**Figura 7.3** Perfil de velocidad en un canal cerrado o parcialmente obstruido sometido a un bombeo electroosmótico.

Una de las ventajas del flujo electrocinético es que el perfil de velocidad evita las discrepancias de difusión que ocurren en los sistemas de flujo inducido por presión. Sin embargo, la dispersión de la muestra en forma de ensanchamiento de la banda sigue siendo un problema en el bombeo electroosmótico. Una desventaja adicional es que el flujo electrocinético requiere a menudo voltajes muy altos. Esto exige la utilización de fuentes de alimentación externas y consecuentemente imposibilita la miniaturización completa del dispositivo. Otra desventaja significativa del flujo electrocinético es su dependencia de las características superficiales del canal de flujo. Las proteínas, por ejemplo, pueden fijarse por adsorción a las paredes, cambiando substancialmente la carga superficial y, por tanto,

alteran la velocidad del fluido. Esto puede dar lugar a variaciones imprevisibles, a largo plazo, del caudal.

En tanto no se consiga que los sistemas de impulsión miniaturizados alcancen un nivel de prestaciones óptimo y un grado de compatibilidad adecuado con los elementos de microfluídica, los sistemas híbridos constituyen la solución aplicable de forma más inmediata. Estos se basan en sistemas de bombeo neumático o hidrodinámico, adaptados externamente a los canales del elemento de microfluídica. Estos sistemas permiten la inserción y mezcla de disoluciones, así como, la aplicación en técnicas de separación de alta presión o otras técnicas en que la dispersión pueda ser despreciada o innecesaria [Polson, 2001].

#### 7.1.1.2 Grado de mezcla a Reynolds bajos

El control del proceso de mezcla puede ser crucial en análisis químico y en síntesis. En la química convencional, la mezcla se consigue mediante fenómenos convectivos, por ejemplo mediante agitadores mecánicos. Sin embargo, como se ha mencionado en la sección anterior, el número de Reynolds para el flujo de líquidos en microcanales es bastante pequeño y, en esas condiciones, la turbulencia no tiene lugar. En los microsistemas, el flujo es laminar y la difusión es el mecanismo de mezcla. El proceso de difusión es el resultado de un gradiente de concentración en un sistema heterogéneo. Esta evolución puede ser descrita mediante la primera ley de Fick según la cual el flujo es proporcional al gradiente de concentración (ecuación 7.2),

$$J(x, t) = -D \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} \quad \text{ecuación 7.2}$$

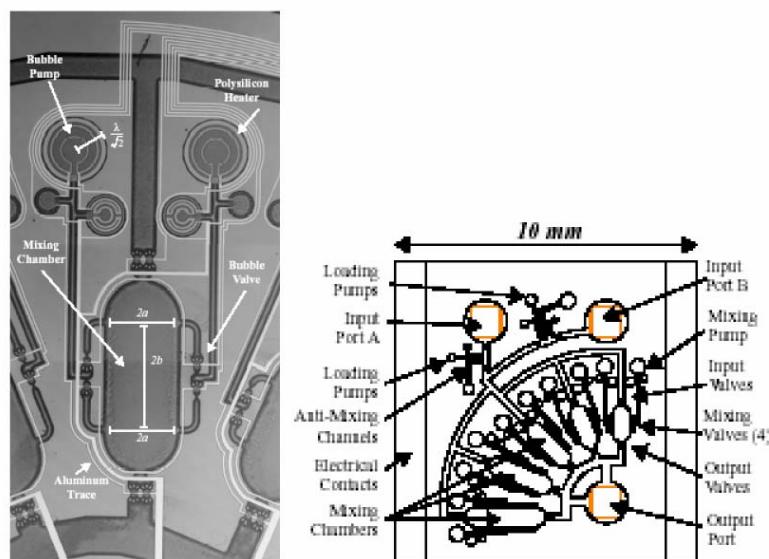
donde el  $J(x, t)$  es el flujo de especies dada una localización  $x$  en un tiempo  $t$ , y  $c$  es la concentración de las especies. Una medida de la distancia útil de mezcla es la relación con la distancia de difusión, la cual viene determinada por la ecuación 7.3

$$L_D = \sqrt{2Dt} \quad \text{ecuación 7.3}$$

donde  $L_D$  es la longitud de difusión y  $t$  es el tiempo de mezcla. Como se deduce de esta ecuación, el tiempo de mezcla es pequeño y por tanto el factor más importante en estructuras pequeñas es la difusión. A partir de esta premisa se pueden utilizar diferentes estrategias para diseñar mezcladores eficientes capaces conseguir el grado de mezcla necesario a escala micro. Al final de este apartado se mostrarán algunos mezcladores (*micromixers*) utilizados en sistemas de microfluídica.

La agitación con instrumentos mecánicos es otro proceso eficiente que ocurre a números de Reynolds altos y frecuente para muchas aplicaciones a escala macro. Sin embargo implementar agitadores en microcanales es tecnológicamente imposible. Una solución para conseguir la agitación en sistemas microfluídicos es la introducción de trayectorias caóticas dentro del flujo mediante la geometría específica del canal [Ottino et al., 1988]. La sección de un flujo caótico está constituida por segmentos de flujo transversales que favorecen el grado de mezcla y se traducen en una importante reducción de la longitud de difusión comparada con los sistemas de flujo sin agitación. En la bibliografía se pueden encontrar distintas teorías que explican los fenómenos de convección caótica [Ottino et al., 1988; Aref, 1990, y 2002]. Con el objetivo de producir partículas con trayectoria caótica, la velocidad debe ser bidimensional, y dependiente del tiempo. En este sentido, Fountain visualizó por primera vez una estructura tridimensional de flujo empleando la inyección continua de un colorante fluorescente, demostrando la existencia de trayectorias caóticas [Fountain et al., 1998]. Más adelante se describirán algunas estrategias para inducir la agitación caótica en microcanales.

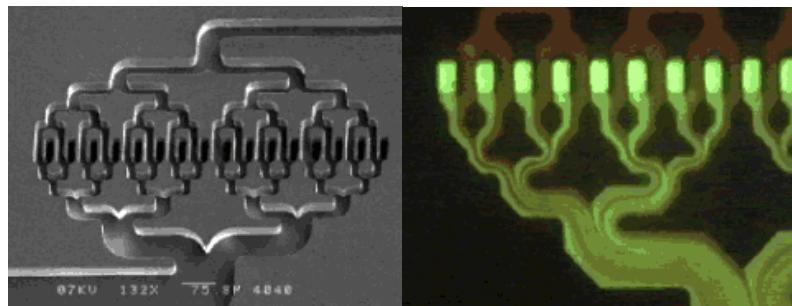
Muchos de los micromezcladores diseñados pueden clasificarse como mezcladores activos o pasivos. Los mezcladores activos son aquellos que externamente tienen alguna forma de control activo sobre el flujo. Normalmente con ellos se obtiene un excelente grado de mezcla. Sin embargo, lo más usual es que se utilicen actuadores electrocinéticas o térmicos, válvulas y bombas que son muy difíciles de fabricar, integrar y manejar en un sistema microfluídico. En la figura 7.4 se muestra la complejidad de un mezclador activo fabricado mediante MEMS por Evans [1997].



**Figura 7.4 (a)** Bomba de burbujas en un mezclador microfluídico y **(b)** mezclador en disposición de Y.

Los micromezcladores pasivos no utilizan entrada de energía excepto la presión necesaria para mover el flujo. Las principales ventajas son la simplicidad de construcción y operación, y su bajo coste. A pesar de estas ventajas y del aceptable grado de mezcla que se consigue, el menor número de mezcladores pasivos descritos en la bibliografía es significativamente menor que el de activos.

La estrategia general utilizada para conseguir la mezcla de dos flujos laminares en microcanales es aumentar el área de contacto entre los fluidos. Bessoth et al. [1999] aumentaron el tiempo neto de difusión mediante la división de cada flujo en una corriente multilaminada. Como el tiempo de difusión es proporcional al cuadrado de la distancia de difusión (ecuación 7.3), la división de flujos a mezclar provoca una alternancia que lamina el flujo y provoca una disminución del tiempo de mezcla. La subdivisión de cada flujo en  $n$  capas laminadas aumenta el tiempo de contacto en  $n^2$ . En la figura 7.5 se muestra un ejemplo de éste micromezclador que, en este momento, ya está comercializado [www.c2v.nl].



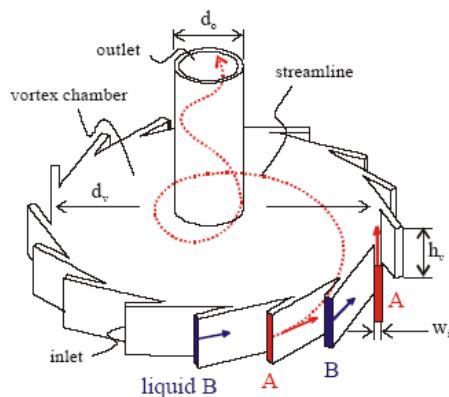
**Figura 7.5** Fotografía de un micromezclador laminado de vidrio-silicio-vidrio constituido por 32 microcanales de 20  $\mu\text{m}$  anchura, diseñado por el grupo de Manz y procesado por c2v.

En la bibliografía se pueden encontrar micromezcladores basados en el mismo principio. El mezclador descrito por Ehrfeld et al., se basa en dos flujos introducidos en sentido opuesto que circulan por unos canales interdigitales de geometría sinusoidal [Ehrfeld et al., 1999, 2000]. Otro diseño de micromezclador es el formado por múltiples puntos de entrada de fluido a un compartimiento de mezcla [Miyake et al., 1993].

Böhm et al. [2001] han utilizado un micromezclador vortex para el estudio de reacciones con cinética rápida. El reactor consiste en 16 entradas tangenciales para inyectar los fluidos que se mezclan en la cámara circular del vortex y donde la velocidad es lo suficientemente alta para inducir el remolino del flujo (figura 7.6).

Recientemente se han propuesto nuevos diseños de micromezcladores para promover la mezcla mediante la convección caótica en el flujo. Un ejemplo es el microcanal en tres dimensiones en forma de serpentín diseñado por Liu et al. [2000]. El aumento de grado de

mezcla es debido a la inestabilidad que se produce en el flujo laminar al circular por este tipo de canal.



**Figura 7.6** Geometría del micromezclador vortex diseñado por Böhm et al. [2001].

El micromezclador, está basado en el concepto de convección caótica, consiste en un serpentín tridimensional, en el que los canales cuadrados y rectos de 300  $\mu\text{m}$  están dispuestos en planos ortogonales. Han sido microfabricados en silicio mediante la técnica de grabado anisotrópico húmedo usando KOH. Con esta geometría, el flujo que circula se reorienta continuamente provocando la mezcla. Este fenómeno llamado convección caótica puede ser utilizado para conseguir mezcla en micromezcladores pasivos sin la necesidad de recurrir a complicados mezcladores activos. La convección caótica viene determinada por la distorsión y elongación de las interfases de material y se traduce en una rápida mezcla. Este tipo de geometría en tres dimensiones también se ha transferido a otros materiales como PMDS [Beebe et al., 2001].

La visualización de los experimentos con flujo llevada a cabo por Liu et al. [2000], se ha realizado usando una solución de hidróxido de sodio con fenolftaleína. Para comprobar el grado de mezcla se utilizó un microscopio con el que se observaron los cambios de color debidos a la reacción entre los reactivos. Los resultados de sus experimentos indican que, tanto para el canal cuadrado como para el canal de serpentín, el grado de mezcla se incrementa al aumentar el número de Reynolds de 6 a 70. Por otro lado, las soluciones se mezclan con más rapidez en el canal de serpentín que en el canal cuadrado, por el orden de magnitud del número de Reynolds obtenido.

Mientras que los resultados indican que sucede la convección caótica, la limitación de la técnica de visualización del flujo representa un inconveniente para conocer la mezcla efectiva que se produce [Munson y Yager, 2004]. Para optimizar el diseño de los micromezcladores pasivos en base a la teoría del caos y modelos de predicción se requieren medidas experimentales de caudal. Por otro lado, para observar los efectos que

ocurren en la convección caótica, los flujos secundarios, y adquirir un conocimiento del proceso de mezcla a longitudes de microescala, son necesarios modelos numéricos que permitan realizar simulaciones de estos flujos. Los modelos pueden ser útiles para establecer alternativas y escoger, a priori, la más idónea sin necesidad de experimentación [Patalay, 2002].

Como conclusión puede decirse que todas las estrategias utilizadas hasta el momento se basan en el aumento de grado de mezcla relacionado directamente con un aumento del contacto entre flujos. Se pueden conseguir distintos grados de mezcla, desde la total de un vortex hasta la parcial de los otros sistemas comentados. En todos los casos se induce un aumento de la turbulencia en el flujo derivada de los obstáculos que éste se encuentra en su circulación, que se traduce en un aumento del número de Reynolds. Existen estudios recientes que han demostrado la influencia de la geometría y la anchura del canal en el incremento del número de Reynolds [Mengeaud et al., 2002].

En esta tesis, el sistema de mezcla utilizado está constituido por canales lineales que cambian de dirección a través de codos consecutivos. La presencia de un codo provoca la generación local de un flujo turbulento que se traduce en un aumento de mezcla entre las soluciones. Las dimensiones de los canales son 200  $\mu\text{m}$  de profundidad y una anchura media de 0,7 mm, con una longitud total de 270 mm. Para esta geometría, los valores de velocidad lineal y número de Reynolds son ligeramente superiores a los referenciados en la bibliografía. En este microsistema, las velocidades lineales están comprendidas entre 3-18 cm/s y los números de Reynolds entre 10-25. En otros sistemas MEMS con canales de 200  $\mu\text{m}$ , las velocidades de flujo son del orden 10 cm/s y los números de Reynolds de 1-10.

Adicionalmente, se ha de considerar que la utilización de técnicas de conmutación [Zagatto et al., 1999] utilizadas en la gestión de fluidos en el microchip, ha permitido establecer un sistema microfluídico que se comporta igual que un reactor de tanque agitado (RCTA). Por lo tanto, el grado mezcla existente en este sistema híbrido es superior a los referenciados en la bibliografía.

### **7.1.2 Ventajas e inconvenientes de los microsistemas**

Las principales ventajas de los sistemas microfluídicos están directamente relacionadas con su tamaño [Erickson y Li, 2004]. La disminución de escala permite realizar determinaciones en menor tiempo ya que disminuyen tanto los volúmenes utilizados como las distancias recorridas. Ello repercute en una reducción del consumo de muestras y reactivos y, en una minimización de los residuos generados. La reducción de tamaño aumenta las posibilidades de automatizar el procedimiento analítico global ya que

simplifica la integración de las etapas de pretratamiento necesarias. Adicionalmente, la miniaturización facilita el acceso a nuevas técnicas que no son viables a escala macro. Otra ventaja muy importante que cabe destacar es la portabilidad que va asociada directamente con las reducidas dimensiones de los microsistemas.

Una de las principales desventajas de los sistemas miniaturizados es la necesidad de trabajar con sistemas de detección de alta sensibilidad. Este problema está relacionado con la pequeña área de lectura accesible y los pequeños volúmenes de muestra a detectar. La manipulación de muestras biológicas también se ve dificultada por la biocompatibilidad de los materiales utilizados y cuando se trabaja con células vivas, el medio de conservación puede ser también una limitación. Otro inconveniente es la posibilidad de contaminación entre muestras debido a procesos de adsorción/desorción del analito o reactivos en la superficie del microsistema. La presencia de burbujas de aire en el sistema es también un problema, especialmente en el caso de la detección espectrofotométrica, ya que pueden quedar retenidas en la celda de detección. Finalmente otra limitación de los sistemas microfluídicos viene determinada por la necesidad de alcanzar un grado de mezcla adecuado de los fluidos. Este problema es especialmente significativo en microreactores de síntesis o en sistemas analíticos con reacción química.

## 7.2 Introducción experimental

El diseño y construcción de la instrumentación analítica incorporando elementos miniaturizados ya disponibles y elementos convencionales compatibles con los primeros, permite explotar de forma inmediata las ventajas asociadas al binomio miniaturización/integración en un numeroso abanico de aplicaciones analíticas reales.

El sistema diseñado y estudiado en este capítulo ha sido necesariamente un sistema híbrido. En este prototipo se pueden diferenciar dos tipos de componentes, los activos, como el sistema de impulsión/aspiración de fluidos o el sistema de detección, y los pasivos como el propio elemento de gestión de fluidos. En este caso los actuadores activos externos de gestión de fluidos utilizados han sido válvulas de tres vías y una microbureta automática. Se han utilizado soluciones miniaturizadas, pero convencionales, para los componentes activos ya que el desarrollo e integración de microcomponentes activos es un tema muy complejo que sobrepasa los objetivos de esta tesis. El sistema de gestión de fluidos es un microchip de silicio con microcanales de 200  $\mu\text{m}$  de profundidad.

En el diseño y construcción de los elementos pasivos, como ya se ha explicado antes en el §7.1, existen diferentes tecnologías bien estudiadas y desarrolladas para la miniaturización de sistemas de gestión de fluidos. En este sistema inicial se ha utilizado la tecnología de

IC, basada en el silicio como material principal, que aprovecha la infraestructura preexistente en el ámbito de la microelectrónica. Esta tecnología presenta numerosas ventajas, como son el elevado grado de estandarización de los procesos constructivos, la posibilidad de fabricación a gran escala y el bajo coste del dispositivo. Como inconvenientes, presenta el elevado coste inicial de las infraestructuras de fabricación, el elevado tiempo de desarrollo de los prototipos y la inevitable bidimensionalidad de las estructuras fabricadas.

El objetivo principal de esta parte final del trabajo ha sido el desarrollo de la infraestructura básica necesaria para implementar un sistema miniaturizado de gestión de fluidos con actuadores externos convencionales pero miniaturizados y su validación posterior. Una vez implementada la instrumentación básica y desarrollado el programa de control, el trabajo efectuado a continuación se puede dividir en tres grandes bloques. La primera parte ha consistido en la validación y caracterización del microsistema mediante diversos estudios preliminares sin reacción química. En una segunda fase se ha desarrollado el modelo que describe el comportamiento del fluido en el microchip mediante dos abordajes distintos, influencia del volumen aspirado a caudal constante y el contrario, influencia del caudal a volumen constante. Finalmente, se ha estudiado la reacción modelo utilizada en diversos capítulos de esta tesis que es la determinación de ion nitrito, pero a escala micro, procediendo, tras la optimización de las condiciones operacionales, a su aplicación al análisis de muestras reales procedentes de una planta piloto de aguas residuales urbanas. Los resultados obtenidos se detallan en los apartados siguientes.

### **7.3 Descripción del sistema**

En este apartado se realiza la descripción del sistema desarrollado dividida en dos partes. La primera es el diseño, construcción e integración de todos los elementos que constituyen el microsistema con detección óptica implementado. La segunda parte se centra en la explicación detallada del programa de gestión que ha sido necesario desarrollar para controlar de forma precisa y reproducible el funcionamiento de todos los componentes del sistema, desde el sistema de bombeo y gestión de fluidos hasta la adquisición de datos.

En la figura 7.7 se muestra un esquema del sistema de gestión de fluidos implementado. Los detalles particulares de cada componente se detallan a continuación.

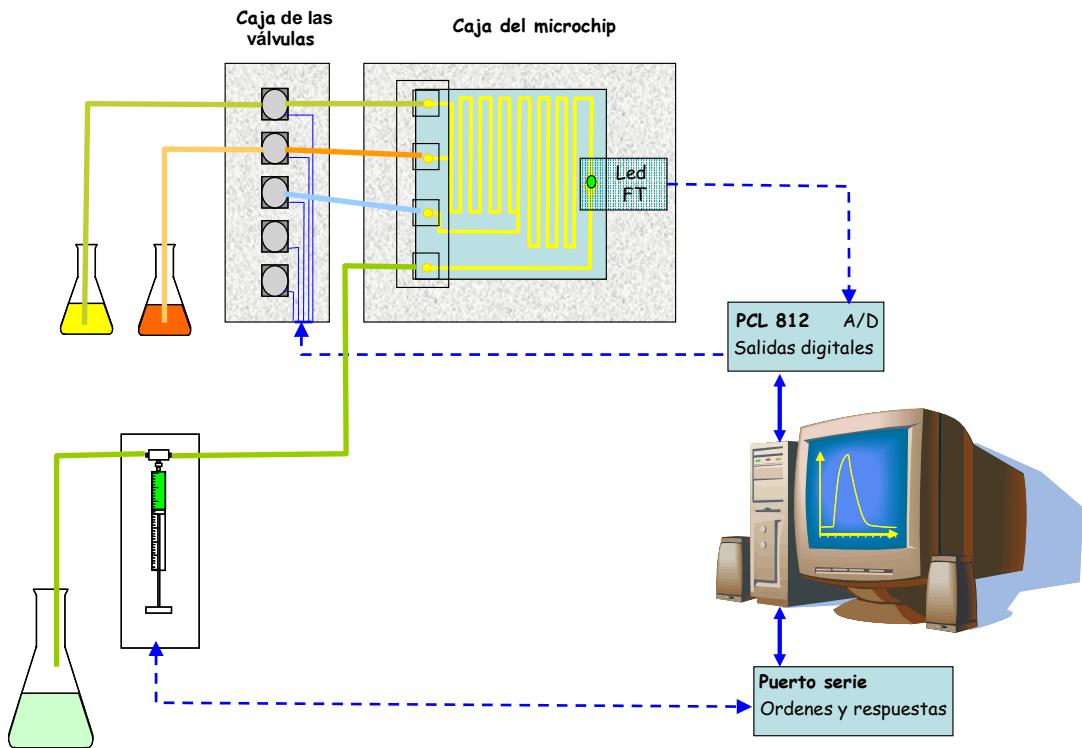


Figura 7.7 Diagrama del sistema de gestión de fluidos miniaturizado diseñado y construido.

### 7.3.1. Diseño del sistema

El núcleo instrumental del sistema está constituido por dos módulos principales, los componentes responsables del movimiento y gestión de fluidos, microbureta y válvulas, y el sistema de gestión de microfluidos, microchip y detector. El ordenador permite la gestión integrada de todo el sistema, en base a un programa realizado en lenguaje visual-BASIC y desarrollado íntegramente para esta aplicación.

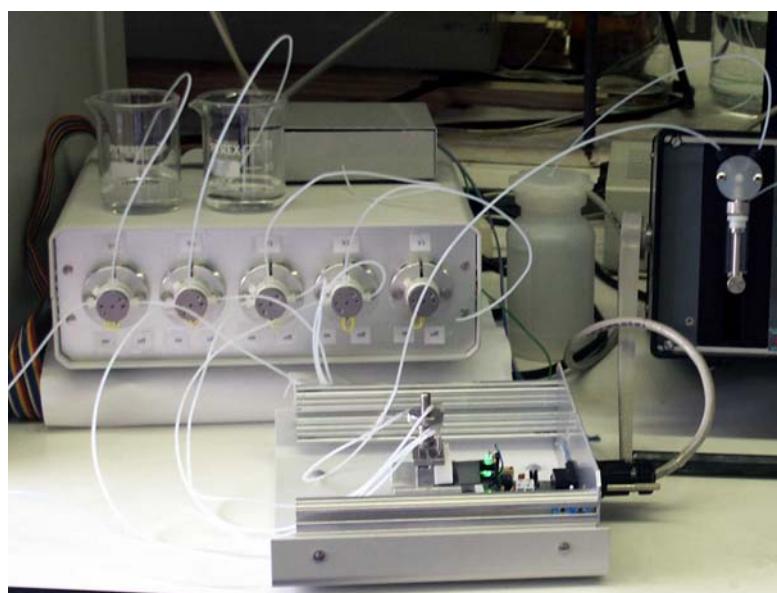
La comunicación entre los elementos principales del sistema, microbureta y válvulas de tres vías se realiza de dos modos distintos. La microbureta se comunica mediante un bus RS-485, para el que se utiliza un conversor RS-485/RS-232, y para las válvulas de 3 vías se realiza la comunicación con el ordenador a través de una placa A/D conectada a una interfase específica para las válvulas.

Las características físicas de los elementos que integran el microsistema aparecen comentadas a continuación. Con más detalle se especifica el diseño y construcción del microchip y, el sistema de detección.

- *Microbureta:* XP 3000 Modular Digital Pump, CAVRO. El cabezal de ésta es exteriormente de PTFE e interiormente de Kel-F. La jeringa es de vidrio Pyrex y el cabezal del émbolo de Kel-F. Las jeringas utilizadas son de volúmenes variables: 2500, 1000 y 250  $\mu$ l. En todos los casos el recorrido del motor es 3000 pasos.

- *Microchip*: diseñado por el Grup de Sensors i Biosensors y construido por Centro Nacional de Microelectrónica (CNM).
- *Tubos conexión al microchip*: tubo de PTFE de Tecator de diámetro interno 0,8 mm y diámetro externo 1,57 mm., de longitud variable en función de las condiciones experimentales.
- *Válvulas*: válvulas solenoides de 3 vías con referencia 161T031 de NResearch conectadas al ordenador mediante una interfase Cool Drive Valve Drivers for 161 series/12 vdc: 161D5X12 de NResearch. Esta interfase es necesaria porque ayuda a mantener el voltaje de la señal de salida desde la placa de A/D constante y además, asegura que las válvulas no se calienten y funcionen de modo reproducible durante todo el tiempo de operación.
- *Sistema de detección*: LED emisor de  $\lambda=525$  nm y fotodiodo construido por el Departamento de Ingeniería Electrónica y Comunicaciones del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A), del Centro Politécnico Superior.
- *Conexión del microchip al sistema de gestión*: sistema compuesto por una pieza de PTFE que encaja perfectamente con las entradas del microchip, y queda sellada por un soporte de acero que permite la fijación y comunicación del microchip a las salidas de las válvulas de tres vías.
- *Ordenador Pentium IV*: control y adquisición de datos.
- *Placa de adquisición de datos*: modelo PCL-812PG.

A continuación se presenta en la figura 7.8 un detalle del sistema desarrollado, donde se pueden ver la caja de las válvulas de 3 vías, la microbureta y la caja con el soporte diseñado especialmente para el microchip y el sistema de detección.



**Figura 7.8** Vista general de los actuadores externos y la caja del microchip con el sistema de detección.

### 7.3.1.1 Diseño y construcción del microchip

El diseño y construcción de componentes microfluídicos corresponde a parte de los objetivos de un subproyecto, enmarcado dentro de un proyecto de investigación desarrollado en colaboración con el Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) y el GSB. El objetivo final es el desarrollo de dispositivos para aplicaciones en microsistemas de análisis por inyección en flujo ( $\mu$ FIA).

Los microchips desarrollados tienen cuatro configuraciones básicas. La diferencia entre ellos estriba en el número de entradas/salidas del microchip (4-6) y en el número de ventanas (1-2). Las dimensiones de los canales son las mismas en todos los diseños aunque varía el recorrido interno de éstos. En la figura 7.9 se muestra un detalle de la oblea de silicio con los cuatro microchips construidos, donde se pueden observar los microcanales, las entradas/salidas y las microcélulas de medida óptica.

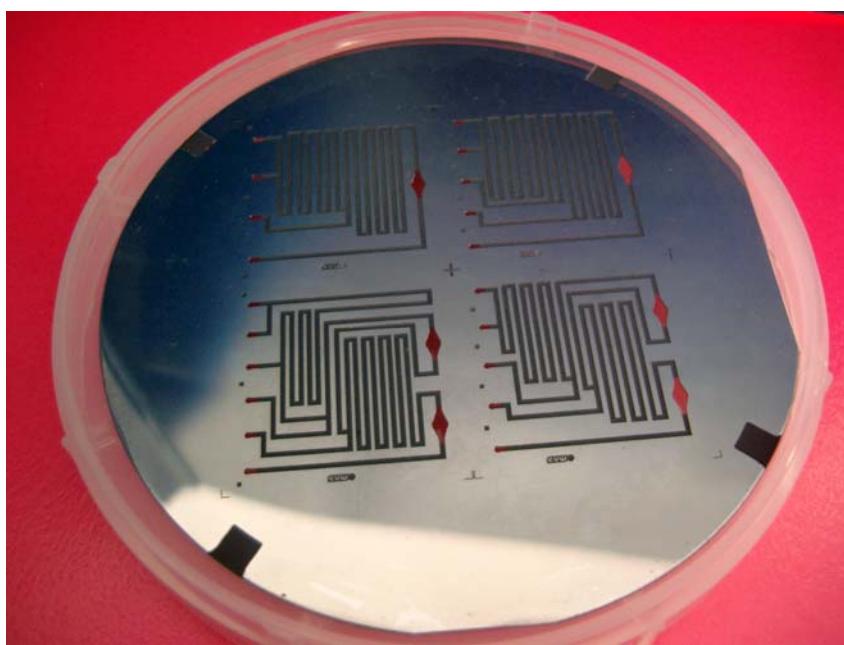
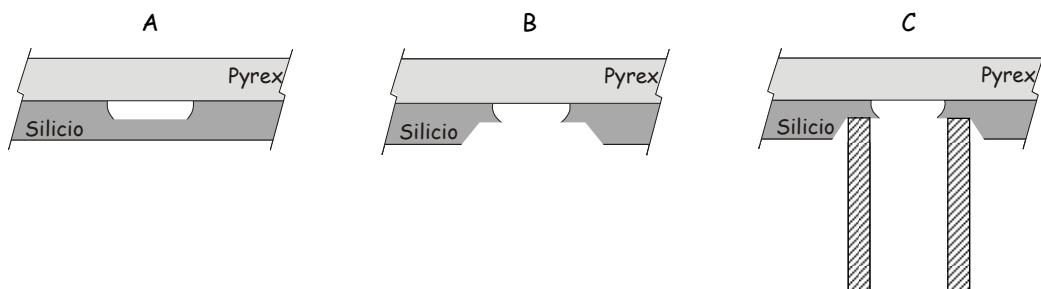


Figura 7.9 Oblea de silicio con los cuatro microsistemas diseñados.

La tecnología aplicada en la construcción de los microchips está basada en la micromecanización del silicio. Las estructuras del microsistema de flujo incluyen microcanales, las células del detector, y las aberturas de entrada-salida de líquidos. Las estructuras se han fabricado en obleas de silicio de 100 mm de diámetro, dopado tipo **p**, y un grosor de 375  $\mu$ m. Los canales (figura 7.10 A) han sido definidos por grabado isotrópico seco (*reactive ion etching*, RIE) con una profundidad de 200  $\mu$ m. Se ha utilizado una capa de aluminio como máscara durante el proceso RIE. Los canales son

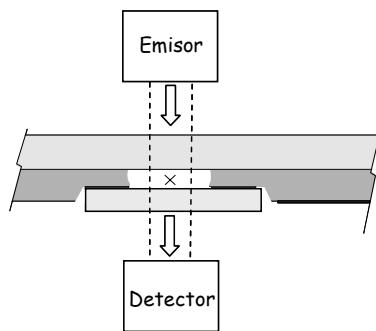
recubiertos por un cristal de Pyrex (Corning 7740), enlazado a la superficie del silicio por la técnica de soldadura anódica.



**Figura 7.10** Estructura de los microcanales en silicio. (A) Canales, (B) entrada/salida y área del detector, (C) entrada/salida de las conexiones externas.

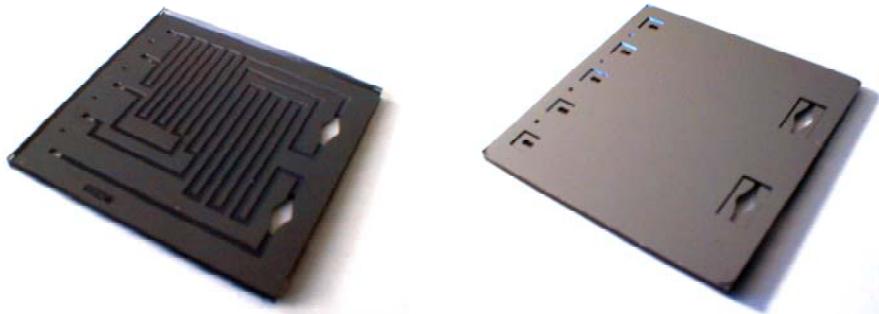
Las aberturas de entrada-salida y las áreas del detector han sido definidas por grabado anisotrópico húmedo del silicio desde la parte posterior hasta la profundidad del canal usando una solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) [Merlos et al., 1993] (figura 7.10 B), utilizando dióxido de silicio como máscara. El grabado se para con una capa del dióxido de silicio en el canal, no es mostrado en la figura. Las únicas diferencias entre la entrada-salida y las áreas del detector son las dimensiones y las geometrías de los canales y los agujeros de la parte posterior. Los tubos metálicos están conectados con las aberturas de entrada-salida mediante un soporte diseñado y construido con este objeto para conectar el microchip con la microbureta y las válvulas externas (figura 7.10 C).

Las estructuras de los microsistemas se han diseñado para ser utilizadas con detectores ópticos. Las dimensiones de las aberturas de la parte posterior del área del detector son 5,6 x 3,4 mm<sup>2</sup>. Para poder efectuar medidas basadas en detección óptica ha sido necesario unir el microchip con un cristal (también Pyrex 7740) que sella el área del detector para permitir que la luz pase a través de la estructura (figura 7.11). Se ha desarrollado un sistema óptico de detección miniaturizado que se describe en la sección siguiente. Está basado en la detección de cambios de absorbancia del fluido que circula a una longitud de onda específica.



**Figura 7.11** Celda del detector para medidas ópticas.

Han sido diseñadas estructuras de microfluídica con diversas configuraciones (figura 7.9), que las hacen viables para su uso en diferentes tipos de sistemas de gestión de fluidos basados en técnicas SIA o FIA. En la figura 7.12 se muestra un ejemplo de una vista de los dos lados, derecha (cristal) e izquierda (silicio). En la fotografía izquierda, se observan los cinco puertos de entrada-salida y dos áreas de detección [Baucells et al., 2001].

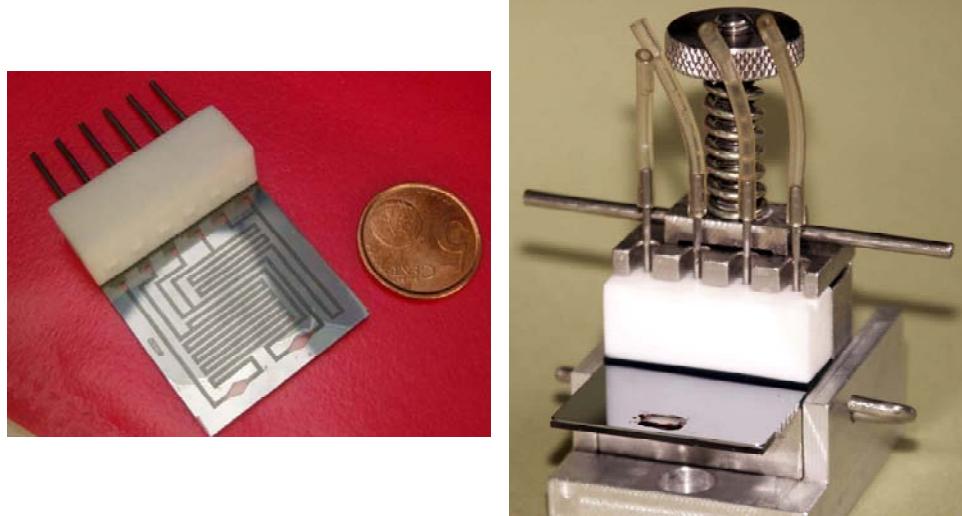


**Figura 7. 12** Fotografías de uno de los microchip desarrollados. A) Parte superior (cristal) y B) parte inferior (silicio), en donde se pueden observar las cinco entradas-salidas y las dos áreas de detección.

Las dimensiones del microchip son un cuadrado de 31,85 x 31,85 mm. Con este tamaño caben cuatro microestructuras en una oblea de silicio de 100 milímetros de diámetro. El grueso del cristal del pyrex es 1 milímetro. La anchura de los microcanales es 600  $\mu\text{m}$  en la máscara, lo que ha dado lugar a una anchura real en el silicio de cerca de 800  $\mu\text{m}$ . Por tanto la sección transversal de los canales es aproximadamente de  $800 \times 200 \mu\text{m}^2$ . Ha de tenerse en cuenta que las dimensiones del canal no se pueden hacer demasiado pequeñas, ya que el régimen microfluídico es laminar y la pérdida de presión está influenciada por las fuerzas viscosas [Gravesen et al., 1993], que se incrementan al reducir la sección transversal. Esto significa que el tamaño del canal ha de ser mayor que un cierto valor mínimo que se necesita para tener un flujo útil. Esta limitación en las dimensiones es también útil para minimizar el problema de la formación de burbujas y los efectos negativos de la tensión superficial del líquido.

### 7.3.1.2 Diseño y construcción del soporte del microchip

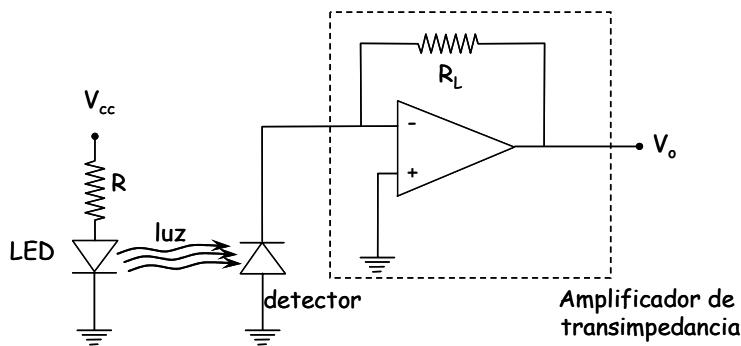
El soporte de sujeción del microchip está constituido por cinco piezas de acero. A la base se sujetan un soporte en forma de L, sobre el que reposa el microchip presionado por una pieza de PTFE. Esta pieza conecta los cuadrados de entrada/salida con unos tubos de acero que se comunican directamente a las válvulas de seis vías. Todo el conjunto es presionado por una pieza de acero que actúa como una pinza, sujetada por presión mediante un tornillo. En la figura 7.13 a la izquierda se muestra la pieza de PTFE con las conexiones de acero que la atraviesan y un detalle de los resaltos cuadrados que encajan perfectamente con las entradas/salidas del microchip. En la fotografía de la derecha se muestra el soporte con el microchip montado y las conexiones externas.



**Figura 7.13** Fotografías del sistema de conexión y fijación utilizado para comunicar el microchip con las válvulas y la microbureta.

#### 7.3.1.3 Sistema de detección

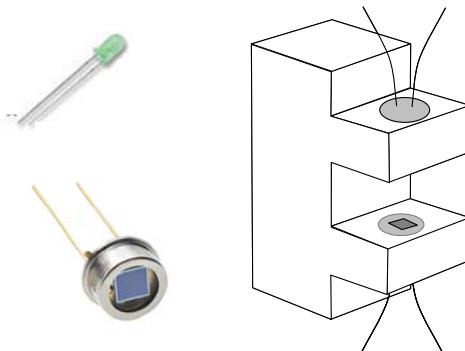
El sistema consiste en un emisor de luz tipo LED (modelo RL5-G8045 de Super Bright LEDs) que emite a 525 nm en un ángulo de 45° con una intensidad de 8000 mcd para una intensidad eléctrica de 20 mA. Como  $V_{cc}$  es de 5V se utiliza una resistencia  $R$  de 250  $\Omega$  para que la intensidad a través del LED sea de 20 mA. En estas condiciones la potencia de emisión del LED es de 23 mW. Para la detección de la luz transmitida a través de la celda del microchip se utiliza un fotodiodo de silicio (FDS100 de Thorlabs) que tiene un área activa de 13 mm<sup>2</sup>. En la figura 7.14 se muestra el esquema eléctrico del emisor-detector.



**Figura 7.14** Esquema eléctrico del sistema de emisión y detección desarrollado.

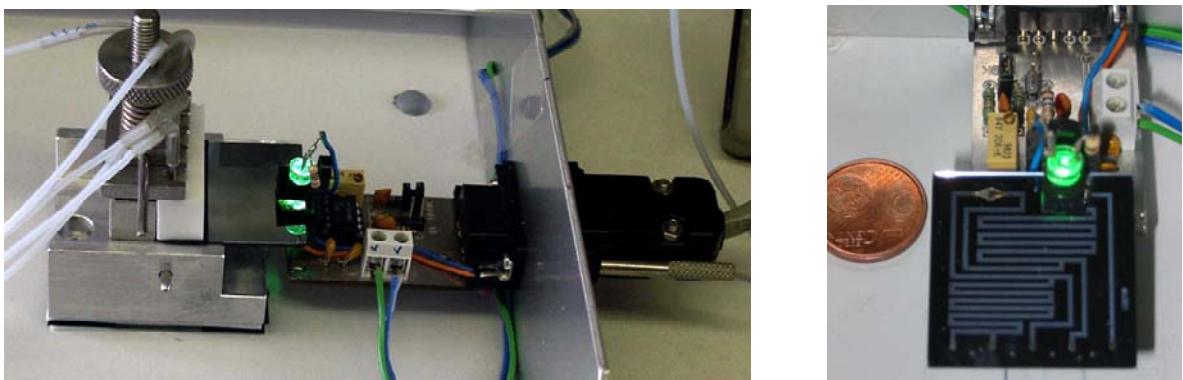
Para la fijación de ambos dispositivos se utiliza un optoacoplador al que se le han extraído los elementos originales para implementar el emisor y detector mencionados, a una distancia que permita la inserción del microchip. Finalmente se utiliza un amplificador operacional en que la ganancia es aproximadamente igual al valor de  $R_L$ . El valor de  $R_L$  se selecciona desde el conmutador (10 k $\Omega$ , 100 k $\Omega$ , 10 M $\Omega$ ). En este caso se utiliza una resistencia de 10 k $\Omega$ . En la figura 7.15 se muestra un detalle del sistema de emisión-

detección integrado en el optoacoplador. También se muestra una fotografía del LED y el fotodiodo.



**Figura 7.15** Esquema físico de la implementación del LED y el fotodiodo en un optoacoplador.

Finalmente, en la figura 7.16 se muestra un detalle del sistema de detección ya implementado físicamente con el LED y el fotodiodo en funcionamiento. Y un detalle del LED visto desde arriba.



**Figura 7.16** Detalles del sistema de detección implementado.

El cristal de borosilicato (Pirex), grosor 1 mm, utilizado en las células ópticas, permite una transmisión de luz mayor del 90% a través de la ventana, siempre que se trabaje a longitudes de onda comprendidas entre 400 nm y 2  $\mu$ m. Por lo tanto, no tiene ninguna influencia en las medidas.

La señal analítica es el voltaje de salida que es inversamente proporcional a la absorción de radiación producida por el fluido en la celda de medida. Esta señal es adquirida por la tarjeta A/D y todo el sistema es controlado por el programa de gestión desarrollado para esta aplicación. La absorbancia ha sido calculada, a partir de la relación de voltajes antes y después del proceso de absorción (ecuación 7.4). Como el cociente del voltaje a la salida del detector para la solución problema y el voltaje a la salida para una solución de referencia. Según el estudio realizado, la medida de  $V_0$  ha sido establecida con agua desionizada o con el reactivo utilizado, previamente a la medida de la muestra.

$$Abs = -\log\left(\frac{V}{V_0}\right) \quad \text{ecuación 7.4}$$

En este caso las soluciones portadoras utilizadas han sido agua desionizada y el reactivo (capítulo 3). La absorción de radiación por parte de ambos fluidos era similar. En ambos casos, el voltaje de salida ha sido del orden de 0,860 voltios, por lo tanto si  $V_0=0,860$  voltios, los valores máximos que pueden obtenerse de absorbancia cuando existe paso de colorante o producto de la reacción por el detector están entorno a 2,93-1,93 UA, determinadas por potenciales de salida (V) de 0,001-0,01 V. Por tanto, disponemos de un intervalo de medida lo suficientemente amplio para las aplicaciones ha realizar dentro de este estudio.

### 7.3.2 Descripción del programa de gestión

#### Objetivos

El objetivo principal ha sido desarrollar un programa robusto y versátil que permita el control y gestión de todos los elementos instrumentales necesarios para la realización de medidas en flujo continuo con detección óptica en el sistema microfluídico desarrollado.

#### Características

El programa ha sido realizado en lenguaje Visual-BASIC por las ventajas de interfase con el usuario que aporta este entorno de programación. Este lenguaje permite definir un entorno gráfico idóneo para controlar de un modo preciso y operativo todos los elementos del sistema. La aplicación desarrollada se basa en la definición de distintas subrutinas para cada función concreta y, simultáneamente, el establecimiento de conexiones simbólicas con los elementos gráficos en la pantalla de la aplicación. Esto permite establecer tanto botones para iniciar acciones, como ventanas para mostrar resultados o estados de los elementos del sistema microfluídico. En la figura 7.17 se muestra el diagrama de bloques con todos los módulos que constituyen el programa. A través de este es posible la gestión y control de todos los elementos que constituyen el sistema de gestión de fluidos (figura 7.7) lo que incluye la actuación simultánea de todas válvulas de 3 vías, de la microbureta y de la adquisición de datos.

Cada uno de los módulos tiene su utilidad y características concretas que se detallan a continuación. Todas las posibles actuaciones sobre el sistema se pueden ejecutar a través de un entorno gráfico. Esto incluye tanto la acción sobre un elemento concreto, como un ciclo completo de análisis. El entorno gráfico se ha dividido en tres pantallas, que dividen

la información/operación en sistema, monitorización y configuración. Estas interaccionan simultáneamente y permiten la gestión del sistema a cualquier persona sin conocimientos previos del programa.

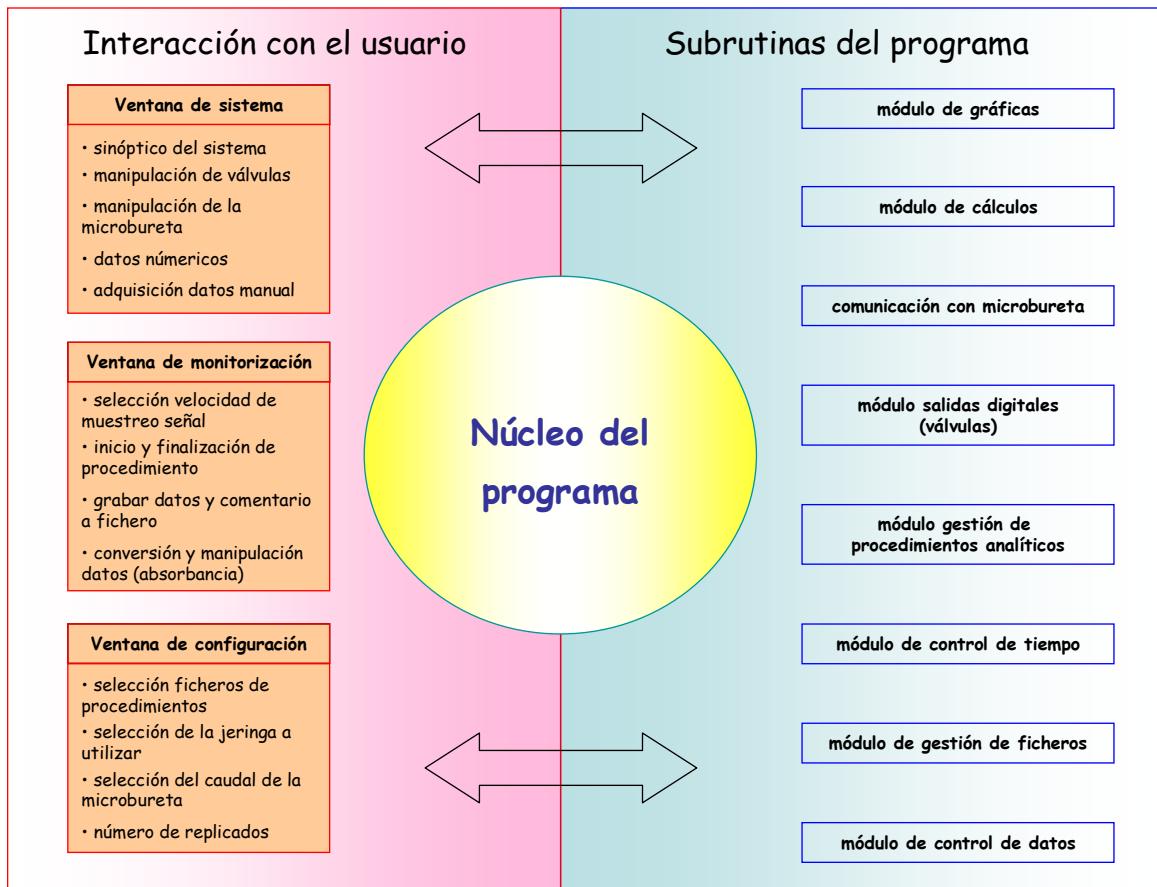


Figura 7.17 Módulos que componen el programa de gestión desarrollado.

Para simplificar la explicación se han englobado las acciones del programa en bloques y se han relacionado con las distintas pantallas gráficas del programa.

**Peticiones por pantalla.** Las peticiones por pantalla permiten la interacción del usuario con todos los elementos del sistema y la definición de las acciones individuales que se pueden realizar desde la base de datos definida previamente.

Se puede actuar sobre todos los elementos del sistema: válvulas, microbureta, sistema de detección, definición de caudal, etc. En la figura 7.18 se muestra un ejemplo de la pantalla *sistema* desde donde se ejecutan las acciones directas sobre las válvulas y la microbureta. Esta pantalla nos indica el estatus de los distintos elementos y, cuando el sistema está en modo automático, monitoriza en tiempo real el estado de las válvulas, la microbureta y el ciclo de análisis.

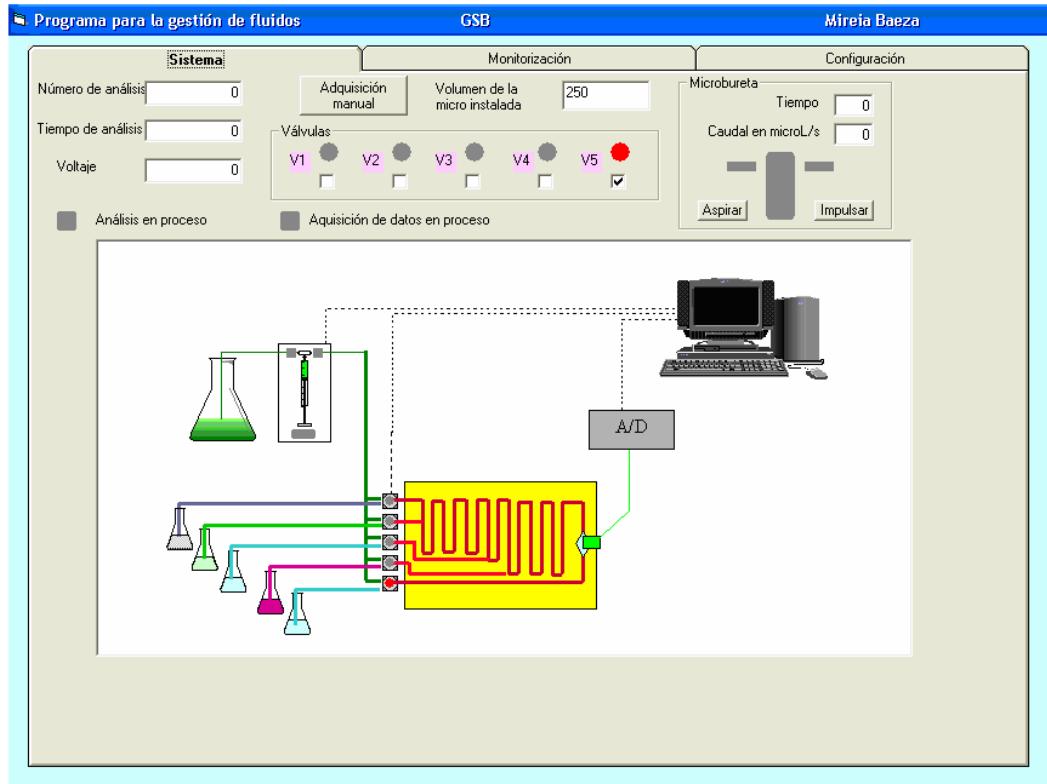
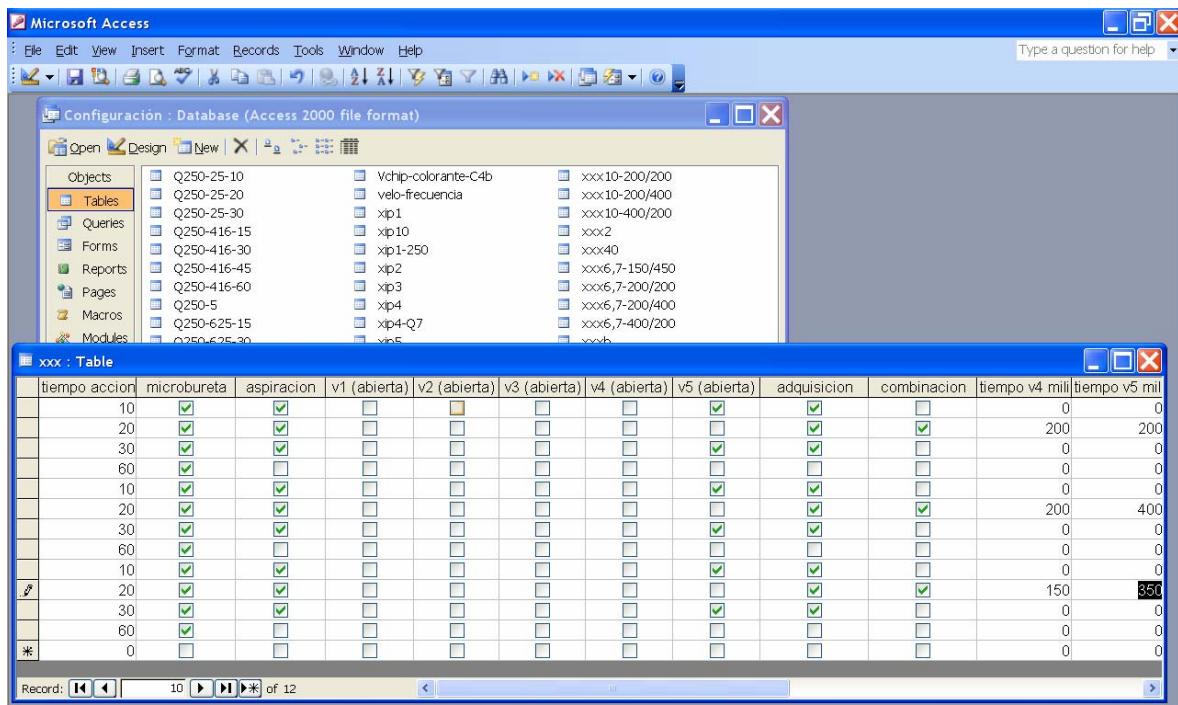


Figura 7.18 Pantalla de peticiones por teclado y estatus del sistema.

**Lectura condiciones de análisis.** Las distintas secuencias de operación se definen previamente en una base de datos de *Microsoft Office Access*. En esta base de datos se almacenan los distintos programas de gestión (figura 7.19). En éstos se define la apertura/cierre de las válvulas, el sentido de flujo de la microbureta (aspiración/impulsión), la frecuencia de apertura/cierre de las válvulas, el tiempo de apertura y la adquisición de datos. En la pantalla de *configuración* (figura 7.20) se realiza la selección de la secuencia de análisis y se definen el tamaño de la microbureta y el caudal de operación.

Por limitaciones de la propia microbureta utilizada ha sido imposible la definición del caudal de trabajo directamente en una base de datos. Éste ha de ser definido previamente a cada ciclo de operación desde el programa base por pantalla. Esto representa una limitación importante ya que es imposible trabajar con combinación de caudales dentro de un determinado ciclo de operación, lo que por ejemplo, hace muy difícil la selección de volúmenes idénticos a diferentes caudales. El problema deriva de la discontinuidad de movimiento del motor de la microbureta. Las diferencias entre distintas velocidades no son constantes en todo el intervalo de movimiento y sólo unas determinadas velocidades son operativas realmente. Para solventar esta limitación ha sido necesario definir el tiempo de operación como real para poder medir volúmenes menores e iguales a distintos caudales. También ha sido incorporada la posibilidad de actuación de dos válvulas simultáneamente

en modo de conmutación a tiempos del orden de milisegundos, esta opción permite mejorar el grado de mezcla del reactivo y muestra aspirados.

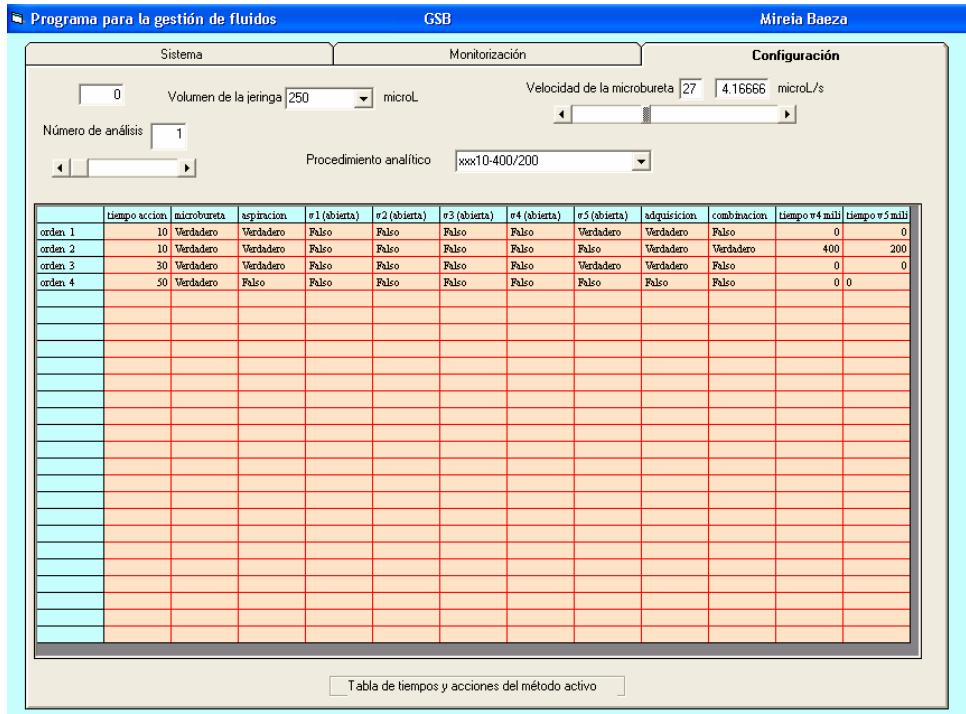


**Figura 7.19** Pantalla de MS Access con diferentes procedimientos almacenados y un ejemplo de procedimiento.

**Definición de nuevas secuencias.** Las diferentes configuraciones definidas se almacenan en la base de datos (figura 7.19) y antes de comenzar el ciclo de análisis son seleccionadas y mostradas previamente por pantalla (figura 7.20).

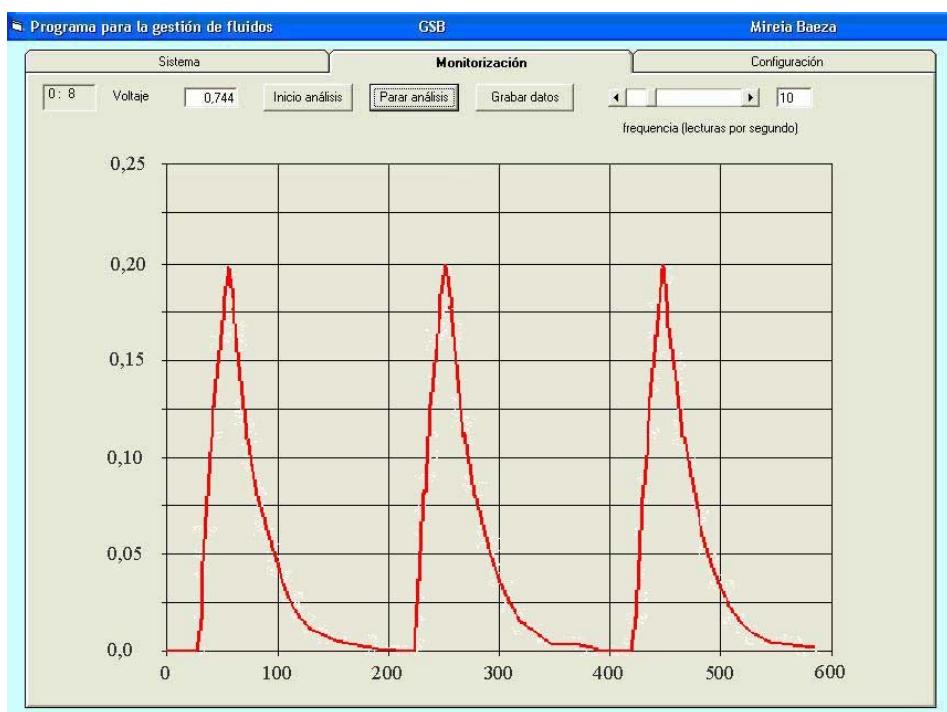
**Monitorización gráfica.** Simultáneamente a la realización de un ciclo de análisis por pantalla se muestra el registro de la variación de potencial (V) en función de la absorbancia de la muestra. Se realizan 10 lecturas por segundo (existe la posibilidad de variar la frecuencia de muestreo en la pantalla de monitorización), siendo innecesario el filtrado de los datos adquiridos. Al final del ciclo de análisis se realiza un cambio de voltaje a absorbancia y después los datos se graban en un fichero. En la figura 7.21 se muestra la pantalla de monitorización gráfica. Es en ella donde se ejecuta la orden de análisis, una vez definidas las condiciones de trabajo en la pantalla de configuración (figura 7.20).

**Almacenamiento de información.** Los registros se almacenan en una base de datos también de *Microsoft Office Access* desde la que se pueden importar después. La información grabada es el número de datos, el tiempo, voltaje y absorbancia. La codificación del nombre del fichero de datos se realiza de modo automático en función del día y la hora y permite la introducción, en el fichero, de comentarios sobre la experiencia que serán almacenados conjuntamente a los datos.



**Figura 7.20** Pantalla de configuración. En esta y a través de una ventana desplegable, se selecciona un procedimiento analítico entre los almacenados en la base de datos y se definen el caudal, el volumen de la jeringa y el número de repeticiones a realizar.

**Comunicaciones.** Las comunicaciones entre los distintos elementos permiten controlar la apertura/cierre de válvulas, el sentido de operación de la microbureta y la adquisición de datos. Se ha aplicado un criterio de control para verificar que, entre acciones, la microbureta realiza las tareas asignadas y no existe pérdida de órdenes.



**Figura 7.21** Pantalla de monitorización gráfica, desde donde se inicia el análisis y se realiza la adquisición de datos.

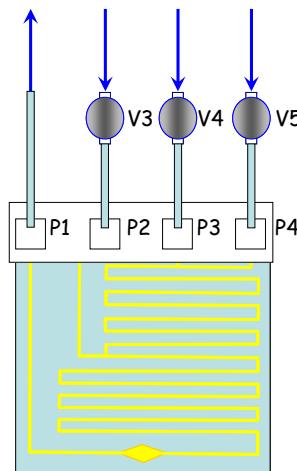
El accionamiento de las válvulas se realiza a través de una placa PCL-812PG que permite 16 salidas digitales, 6 de las salidas digitales se han reservado para la actuación sobre un dispositivo (*Cool Drive*) que se encarga de mantener abiertas las diferentes válvulas en función de las entradas digitales, asegurando el correcto funcionamiento de las mismas.

El caudal de la microbureta se calcula automáticamente en la ventana de configuración teniendo en cuenta la jeringa instalada y la velocidad seleccionada de la microbureta. La adquisición de datos se realiza a través de un conversor de 12 bits de la placa de adquisición de datos. El programa utiliza un calibrado realizado previamente que permite conocer el voltaje de salida del fotodiodo.

#### 7.4 Caracterización del sistema sin reacción química

En este apartado se resumen los estudios previos de caracterización del sistema de detección y gestión implementado. A continuación se detalla un segundo estudio más ampliado donde se evalúa la variación de la señal sin reacción química en función del volumen de muestra, caudal y concentración.

De los cuatro microcircuitos de fluídica construidos, se ha utilizado el que tiene 4 entradas/salidas y una ventana de detección, tanto para los estudios sin reacción química como para los estudios con reacción química. La conexión al soporte se realiza a través de la cara posterior donde se encuentran los orificios de entrada/salida. El modo de operación utilizado en todos los casos ha sido similar. Se ha operado siempre en modo aspiración desde el canal conectado directamente a la celda de detección E/S 4, dejando las E/S: 1, 2 y 3 (comenzando de derecha a izquierda) como entradas. Cada una de estas entradas está conectada a una válvula de tres vías (V5, V4, V3). Esto permite la aspiración de distintos fluidos (patrones, agua o reactivo) según la aplicación llevada a cabo.



**Figura 7.22** Esquema del microchip utilizado con 4 E/S y una celda de detección. Se indica la función concreta de cada E/S mediante el sentido del flujo que circula.

En la figura 7.22 se muestra un esquema del microchip utilizado a lo largo de esta caracterización con las funciones E/S para cada canal. Las conexiones de entrada al microchip se denominan puertos (P1-P4), y los recorridos desde los puertos a la celda de detección son los canales (C1-C4).

### 7.4.1 Sistema de detección

#### 7.4.1.1 Calibrado comparativo en escala micro/macro

Como se ha explicado en el capítulo 1 los métodos colorimétricos han sido ampliamente aplicados en el análisis químico de rutina. En la actualidad y gracias a la integración de componentes ópticos y sistemas miniaturizados de flujo es posible construir versiones portátiles de analizadores de laboratorio basados en detección colorimétrica. La combinación de estos métodos colorimétricos con equipos portátiles que consumen volúmenes mínimos de reactivo y producen volúmenes muy pequeños de residuo son una combinación interesante y resultan muy atractivos frente a la demanda actual de sistemas automáticos de control para aplicaciones diversas. Sin embargo, en los sistemas miniaturizados con detección óptica existe un problema intrínseco de difícil solución [Denninger et al., 2000]. La ley de Beer-Lambert predice una reducción de la señal proporcional a la reducción del camino óptico (ecuación 7.5).

$$Abs = \varepsilon \cdot C \cdot L \quad \text{ecuación 7.5}$$

donde  $A$  es la absorbancia,  $\varepsilon$  es el coeficiente de absorbtividad molar ( $1/\text{mol}\cdot\text{cm}$ ),  $C$  es la concentración ( $\text{mol/l}$ ) y  $L$  es el camino óptico ( $\text{cm}$ ).

Teniendo en cuenta este problema, se han implementado distintas estrategias en la construcción de celdas de medida en dispositivos de microfluídica. Normalmente estas celdas están basadas en una ventana realizada en la oblea, pero existen otros diseños en los que la luz atraviesa todo el canal de flujo de modo horizontal en lugar de transversal. Los estudios realizados en esta tesis, utilizando la primera configuración citada, demuestran que un camino óptico de  $200 \mu\text{m}$  es suficiente para obtener resultados satisfactorios.

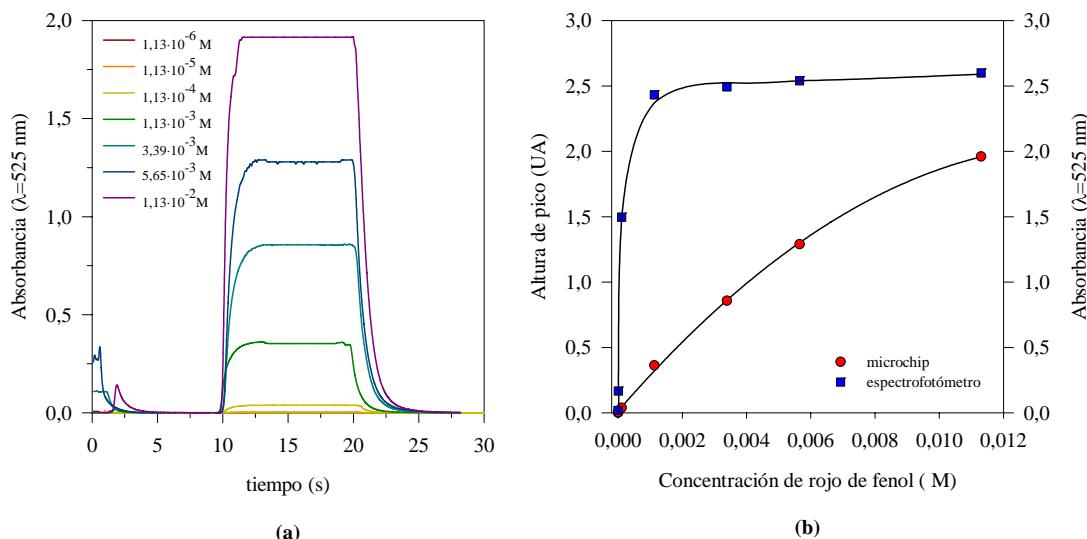
En primer lugar se han realizado dos calibrados comparativos a macroescala ( $L=1\text{cm}$ ) y a microescala ( $L=200\mu\text{m}$ ), las determinaciones se han realizado respectivamente en discontinuo y en el sistema de flujo desarrollado. En el primer caso se ha utilizado un espectrofotómetro Novaspec II. El objeto de estudio es establecer y definir la diferencia de respuesta en función del camino óptico, considerando que, en el momento de la medida en el sistema de flujo no existe dispersión. En esta situación,  $H=H_0$  (§1.3.2). Los calibrados se han efectuado con soluciones básicas de rojo de fenol de distinta concentración, preparadas a partir de una solución patrón concentrada de  $0,0112 \text{ M}$  en  $\text{NaOH}$   $0,1\text{M}$  (§ 3.2.1).

Las condiciones de estos estudios previos han sido: jeringa de 2500  $\mu\text{l}$  y caudal de 25  $\mu\text{l/s}$ . El procedimiento de análisis llevado a cabo en el microchip se detalla resumido en la tabla 7.1. La primera etapa se realiza para estabilizar la línea de base.

**Tabla 7.1** Procedimiento analítico realizado en el microchip para el primer calibrado efectuado.

| Tiempo (s) | Solución (A/I)            | Canal microchip | Adquisición |
|------------|---------------------------|-----------------|-------------|
| 10         | Aspiración agua           | Canal 4         | Sí          |
| 10         | Aspiración patrón         | Canal 3         | Sí          |
| 10         | Aspiración agua           | Canal 4         | Sí          |
| 30         | Impulsión vaciado jeringa | Canal 1         | No          |

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.23 (a). Se puede observar que el volumen aspirado, 250  $\mu\text{l}$ , es lo suficientemente grande como para que en la parte central del pico no exista dispersión. Por lo tanto el valor de absorbancia medido es equivalente a la medida que se realizaría si sólo se hubiese aspirado colorante.



**Figura 7.23** Resultados obtenidos en el calibrado con rojo de fenol. (a) Señales obtenidas en el microchip en condiciones dinámicas, (b) comparación de la respuesta obtenida para medidas efectuadas en flujo y en discontinuo.

En la figura 7.23 (b) se muestra la comparación de calibrados para el microsistema de flujo y las medidas en discontinuo con espectrofotómetro. En ambos casos se produce desvío de la linealidad a concentraciones altas, pero en el caso de las medidas efectuadas con camino óptico menor (200  $\mu\text{m}$ ) el desvío comienza a concentraciones mayores.

En la tabla 7.2 se muestra la comparación de resultados obtenidos. Se puede comprobar que tanto el intervalo de respuesta lineal como la sensibilidad difieren. La sensibilidad está directamente relacionada con el camino óptico, la concentración y el coeficiente de absorbtividad molar. En este estudio las dos últimas variables son constantes por lo tanto la señal obtenida sólo es función del camino óptico.

**Tabla 7.2** Resultados comparativos de los dos sistemas de medida.

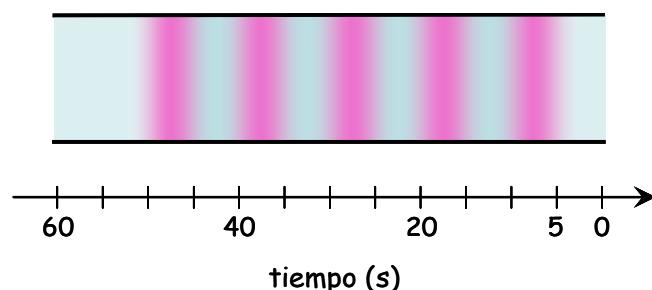
| Tipo de medida                      | Intervalo lineal                              | Regresión lineal   |
|-------------------------------------|---|--|
| Microchip (L=200 $\mu$ m)           | $1,13 \cdot 10^{-6}$ - $1,13 \cdot 10^{-3}$ M | $H(UA) = 0,001(\pm 0,004) + 319(\pm 7) \cdot [RF](M)$      |
| Espectrofotómetro (L=10000 $\mu$ m) | $1,13 \cdot 10^{-6}$ - $1,13 \cdot 10^{-4}$ M | $H(UA) = 0,01 \pm (0,08) + 13161(\pm 1355) \cdot [RF] (M)$ |

Se ha observado una disminución de la sensibilidad proporcional al camino óptico. En este caso, existe en términos de sensibilidad una diferencia de dos órdenes de magnitud, que es idéntica a la relación que existe entre los caminos ópticos. Por otro lado la disminución de sensibilidad en el microchip se traduce en un incremento de una década del intervalo lineal de respuesta.

#### 7.4.1.2 Secuencias preliminares

Finalmente, antes del estudio hidrodinámico sin reacción química, se ha realizado un estudio preliminar para verificar el funcionamiento correcto de las válvulas y evaluar la respuesta en flujo para volúmenes menores de patrón aspirado. El estudio se ha basado en determinar la respuesta del sistema para un tiempo de aspiración de 5s para segmentos de agua y colorante, a dos caudales distintos. La concentración de rojo de fenol utilizada ha sido  $1,13 \cdot 10^{-3}$  M, y los caudales ensayados 25 y 12,5  $\mu$ l/s.

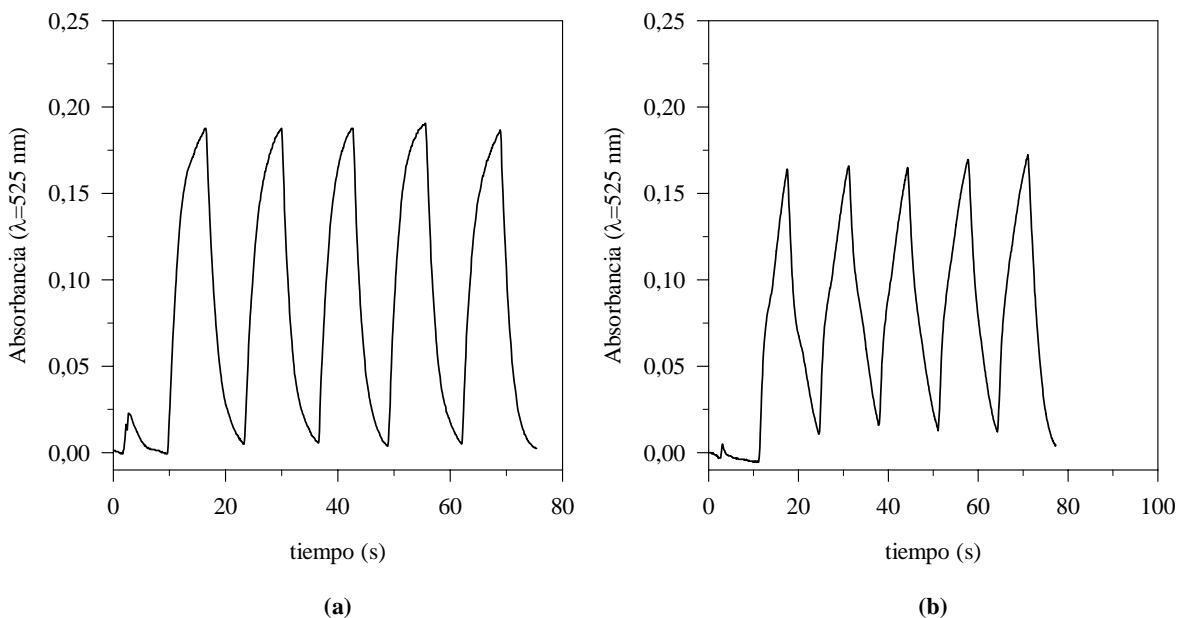
El procedimiento de operación ha sido similar al mostrado en la tabla 7.1. La aspiración de patrón y agua se ha realizado por las mismas entradas, la única diferencia está en la secuencia de volúmenes aspirados. Esta ha consistido en la aspiración de agua/colorante cinco veces durante un tiempo de 5 s.



**Figura 7.24** Esquema de la secuencia de segmentos aspirados de solución patrón de rojo de fenol y de agua. La flecha indica la dirección del flujo. La última aspiración de agua se realiza durante 190 segundos para lavar el microchip.

En la figura 7.24 se muestra un detalle de la secuencia de segmentos aspirada. Como el tiempo es constante, puede observarse que, a menor caudal (figura 7.25 (b)), el volumen aspirado es menor lo que provoca una disminución de señal y de la eficacia de lavado. Al

reducirse el volumen de agua aspirado no llega a recuperarse totalmente el valor de la línea de base.



**Figura 7.25** Estudio preliminar de la respuesta para la misma secuencia de operación y dos caudales distintos. (a)  $Q=25 \mu\text{l/s}$  y (b)  $Q=12,5 \mu\text{l/s}$ .

#### 7.4.2 Caracterización hidrodinámica del sistema

Una vez caracterizado el sistema de detección y verificado el funcionamiento de los elementos encargados de la gestión de fluidos, se ha realizado un estudio preliminar de la influencia del caudal, el volumen aspirado y la concentración en la señal sin reacción química. Con este objetivo se han realizado calibrados de soluciones patrón de rojo de fenol en distintas condiciones experimentales.

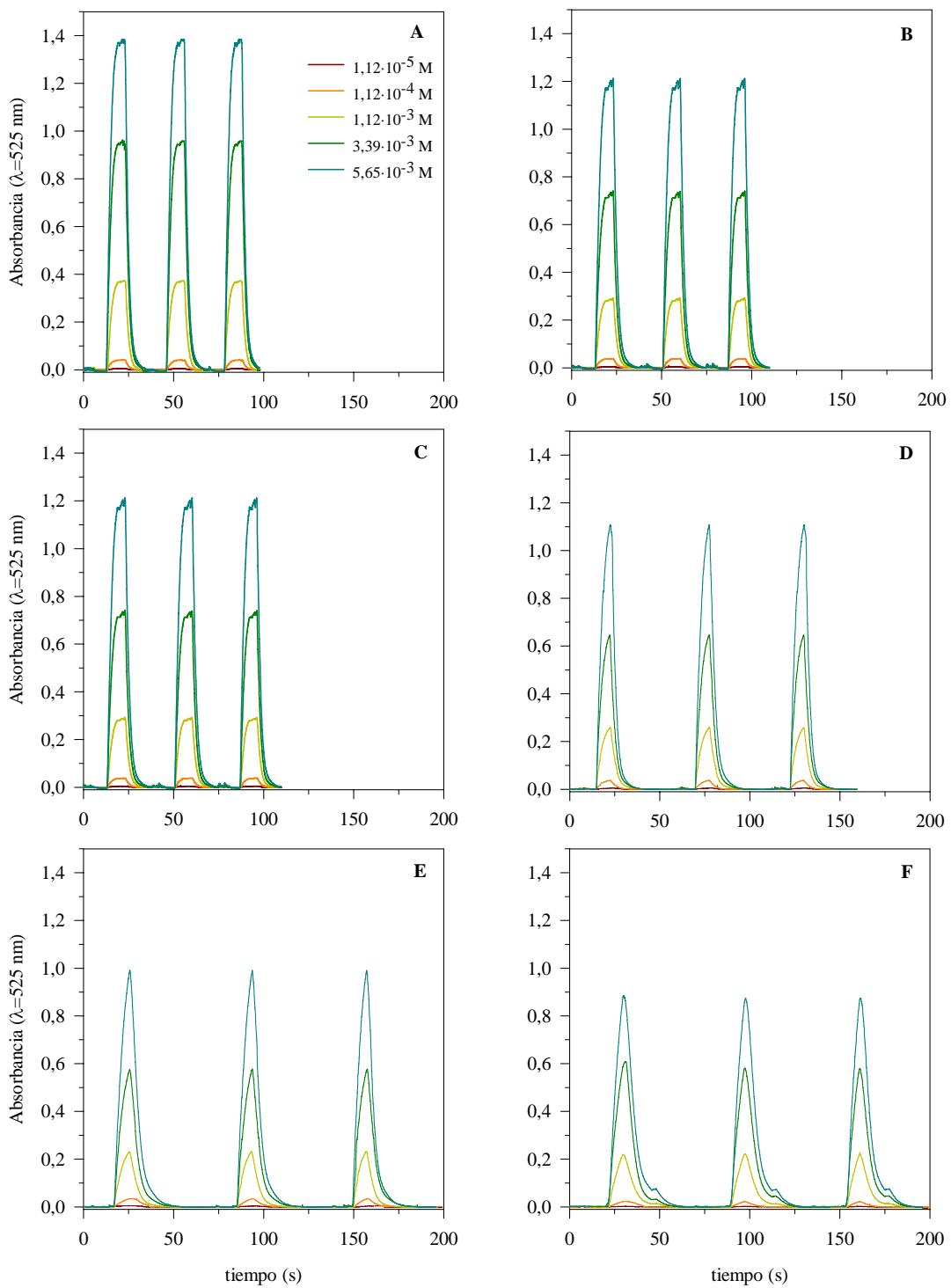
Este estudio se ha dividido en tres partes, en la primera se ha estudiado la influencia simultánea del caudal, volumen y concentración en la señal. En la segunda se ha estudiado la influencia del caudal y la concentración manteniendo constante el volumen. En el tercer estudio se ha determinado la influencia del volumen aspirado manteniendo constante el caudal, para dos caudales distintos 2,5 y 25  $\mu\text{l/s}$ .

A continuación se comentan los resultados obtenidos en cada uno de estos estudios. En todos los casos se ha realizado la representación gráfica de las señales obtenidas y se han comparado estas, mediante ajustes lineales y polinómicos, frente a la concentración, para observar y explicar tendencias de comportamiento. De esta manera se ha definido de un modo cualitativo el comportamiento del sistema frente a las variables físicas evaluadas.

En todos los casos, las concentraciones estudiadas de rojo de fenol han estado comprendidas dentro del intervalo de  $1,12 \cdot 10^{-5}$ - $5,65 \cdot 10^{-3}$ M. Los caudales estudiados han estado comprendidos entre 25-2,08  $\mu$ l/s y los volúmenes entre 75-20  $\mu$ l. El procedimiento analítico ha sido similar al mostrado en la tabla 7.1, salvo la variación de tiempos de aspiración de colorante en la segunda etapa y de aspiración de agua en la tercera. El tiempo de aspiración de colorante ha tenido que modificarse en función del caudal de operación y el volumen buscado. El tiempo de aspiración de agua ha tenido que ajustarse al caudal de trabajo. Para caudales menores, el tiempo de aspiración ha tenido que ser necesariamente superior para poder extraer todo el colorante aspirado en el sistema. Esto se refleja en el aumento de tiempo de análisis observado al disminuir el caudal utilizado en todos los casos estudiados. Se ha trabajado con dos jeringas distintas, para los caudales altos se ha utilizado la de 2500  $\mu$ l y para caudales bajos la de 250  $\mu$ l.

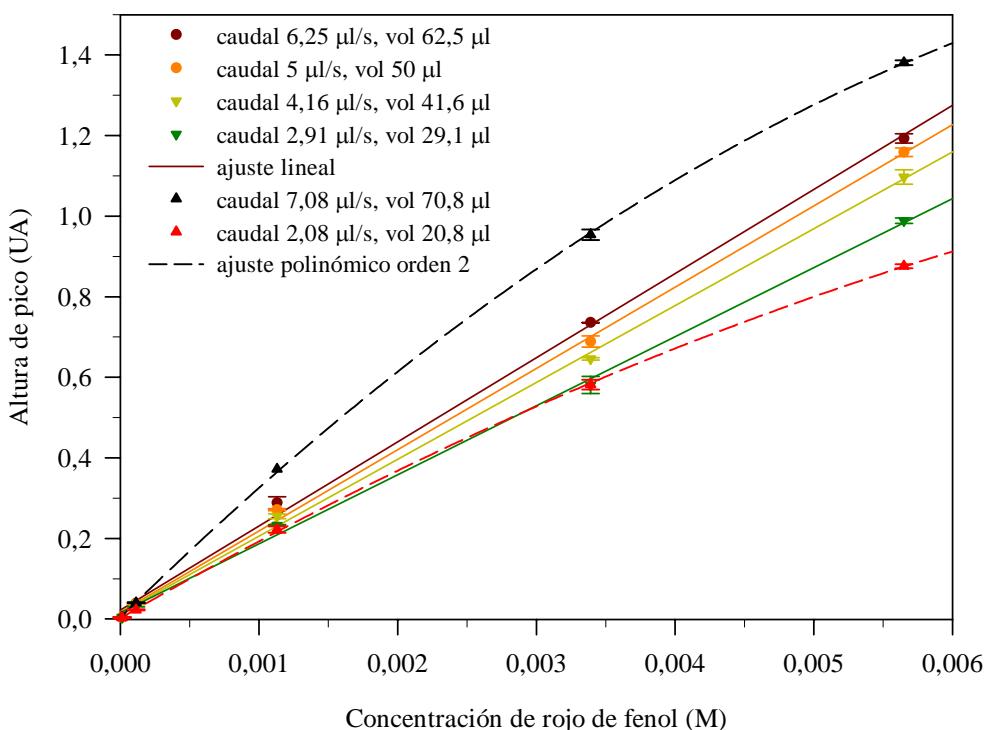
En la primera parte se ha estudiado la variación de la señal para distintas concentraciones, variando simultáneamente el caudal y el volumen aspirado. Los resultados obtenidos de muestran en la figura 7.26.

Las gráficas mostradas en la figura 7.26 están ordenadas de mayor a menor caudal y volumen. El tiempo de aspiración de patrón de rojo de fenol ha sido el mismo en todos los estudios: 10 segundos. Como ya se ha comentado anteriormente (§ 7.3.2), debido a limitaciones instrumentales, no es posible definir un caudal para cada una de las etapas. Eso implica que al mantener constante, en este caso, el tiempo de aspiración se han aspirado distintos volúmenes en función del caudal.



**Figura 7.26.** Estudio de la influencia de caudal y volumen aspirado de colorante en la señal analítica. Los caudales estudiados son (A) 7,083  $\mu\text{l/s}$ , (B) 6,25  $\mu\text{l/s}$ , (C) 5  $\mu\text{l/s}$ , (D) 4,166  $\mu\text{l/s}$ , (E) 2,91  $\mu\text{l/s}$  y (F) 2,083  $\mu\text{l/s}$ . Los volúmenes correspondientes corresponden a una aspiración de 10 segundos de colorante por lo tanto son 70,83- 20, 83  $\mu\text{l}$ .

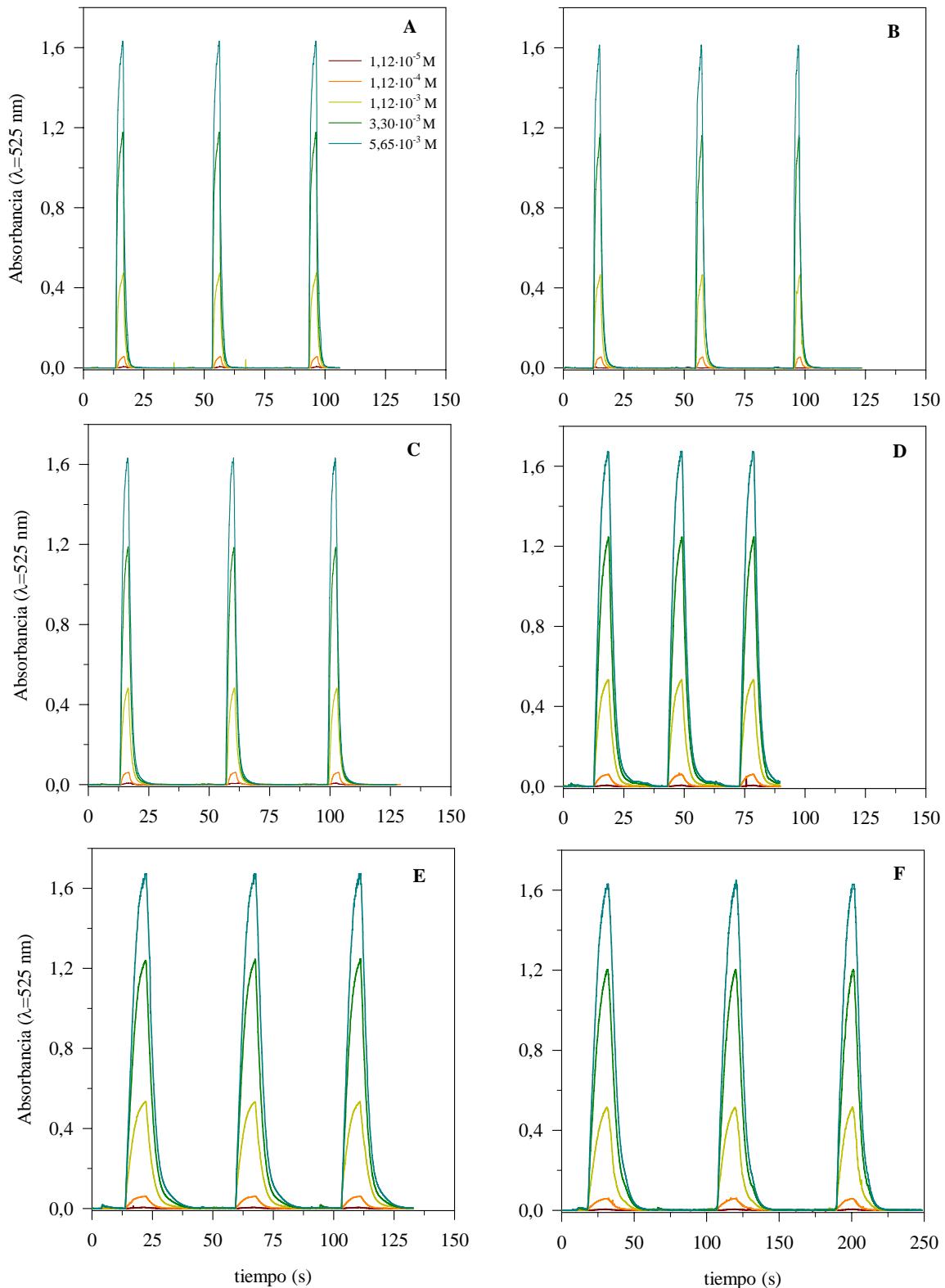
Se ha verificado que el sistema microfluídico se comporta igual que un sistema macroscópico. Si se observa la figura 7.26, se puede comprobar que, en todas las condiciones estudiadas, la señal varía proporcionalmente en función de la concentración. Si se consideran las condiciones hidrodinámicas (caudal y volumen) del sistema se observa la misma tendencia. A mayor caudal y volumen, mayor es la respuesta obtenida. La variación más importante se observa cuando se comparan las anchuras de los picos, se puede observar que, a menor caudal, la forma de los picos es mucho más ancha debido al aumento de dispersión.



**Figura 7.27** Ajuste lineal y polinómico de las señales obtenidas en función de la concentración, para caudales y volúmenes variables.

En la figura 7.27 se puede comprobar que existe una proporcionalidad entre concentración y señal para todas las condiciones estudiadas menos para dos, las extremas. El caudal superior  $7,083\mu\text{l/s}$  y el inferior  $2,083\mu\text{l/s}$ . En el primero, el desvío puede asociarse con un mayor volumen de aspiración y en el segundo con un aumento de la dispersión efectiva. Por otro lado, es difícil plantear conclusiones porque las dos variables (volumen y caudal) han sido estudiadas conjuntamente.

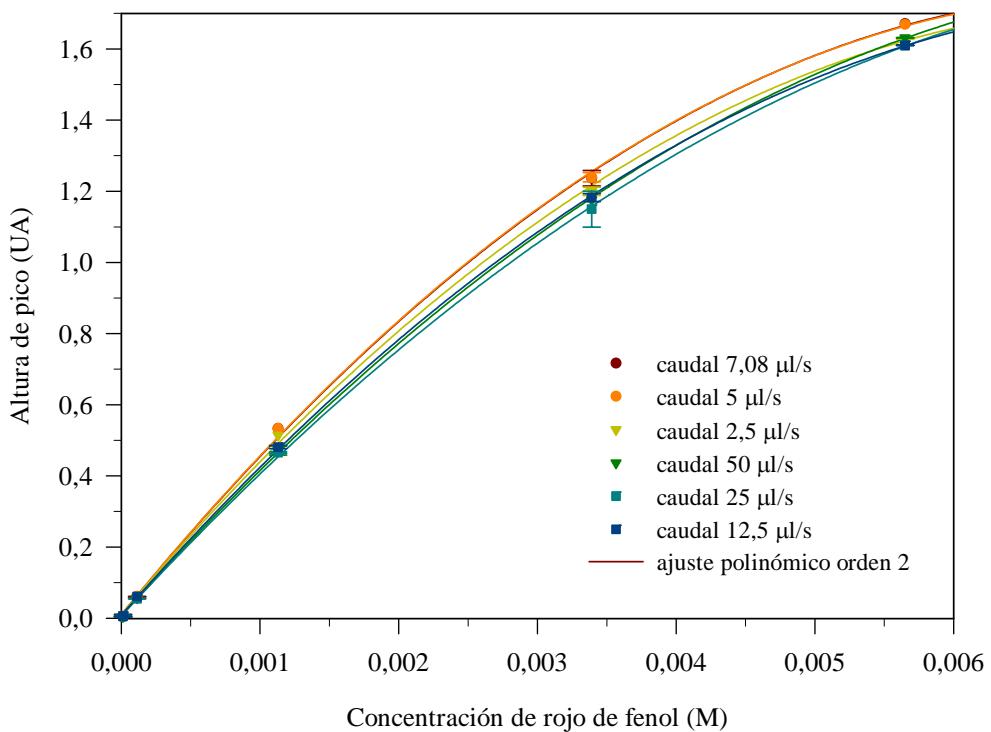
En la figura 7.28 se muestran los resultados obtenidos en la segunda parte de esta caracterización. En este caso, se ha variado el caudal y se ha mantenido, en todos los casos, constante el volumen de aspiración.



**Figura 7.28** Estudio de la influencia del caudal en la señal para un volumen constante de aspiración de 50  $\mu$ l. Los caudales estudiados son (A) 50  $\mu$ l/s, (B) 25  $\mu$ l/s, (C) 12,5  $\mu$ l/s, (D) 7,083  $\mu$ l/s, (E) 5  $\mu$ l/s y (F) 2,5  $\mu$ l/s.

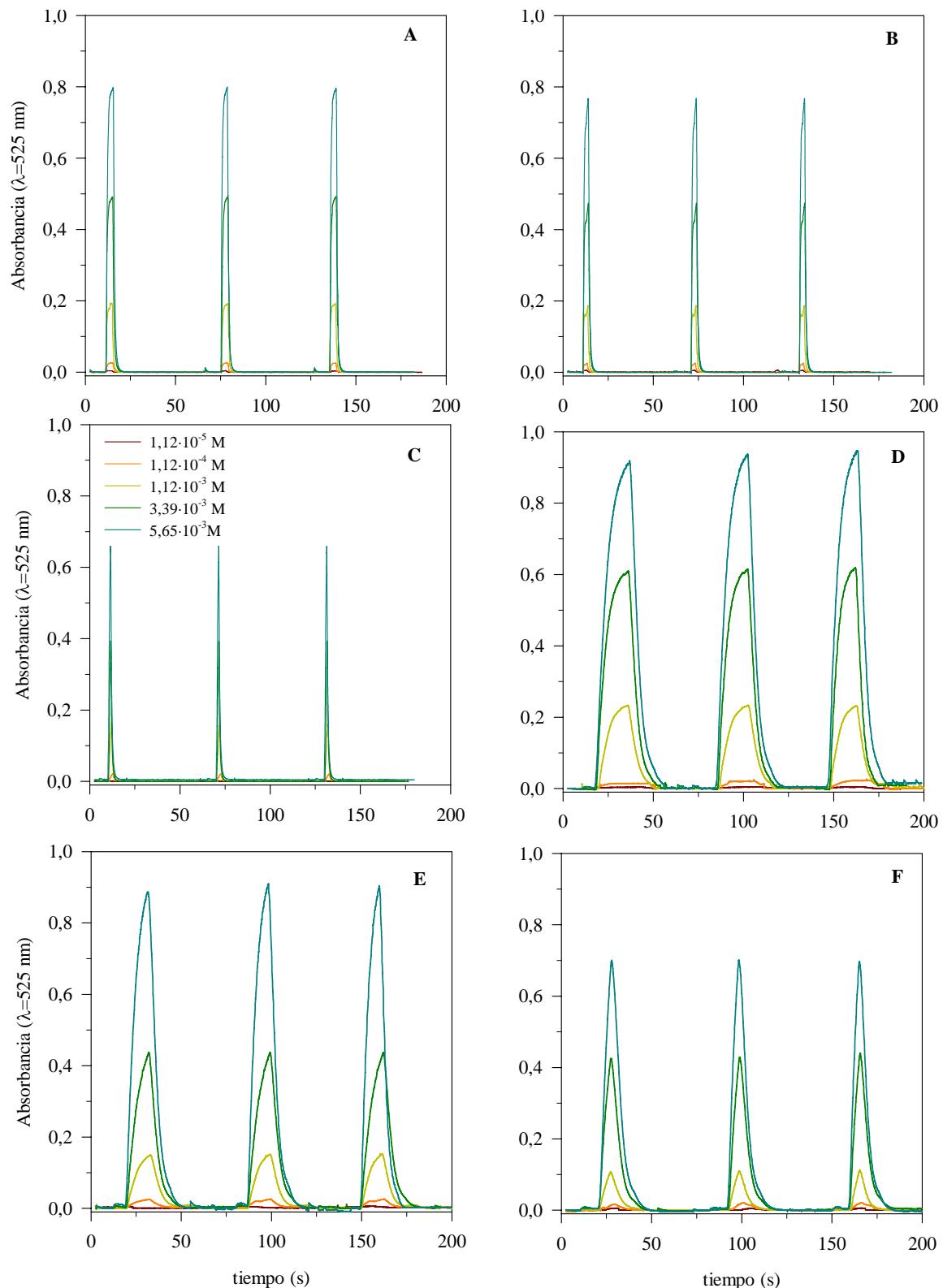
Los caudales estudiados abarcan un intervalo muy amplio, desde 50 a 2,5  $\mu\text{l/s}$ . El volumen es, en todos los casos, de 50  $\mu\text{l}$  y las concentraciones de los patrones de rojo de fenol son las mismas que en el caso anterior. El procedimiento analítico ha tenido que ser modificado también para ajustar tiempos de aspiración y caudales con el objeto de mantener constante el volumen aspirado. En este caso también se ha ajustado el tiempo de aspiración de agua final.

Como se puede apreciar en las gráficas mostradas en la figura 7.26, a mayor caudal la frecuencia de análisis es mayor y la dispersión efectiva menor. Los picos obtenidos son más estrechos. Por el contrario, a caudales bajos se observa una mayor dispersión ya que, aunque se conserva la altura de pico y la forma de estos, se verifica un aumento de la anchura en la base. Por tanto a menor caudal, si se mantiene constante el volumen y la concentración, se obtiene comparativamente una mayor dispersión en el sistema.



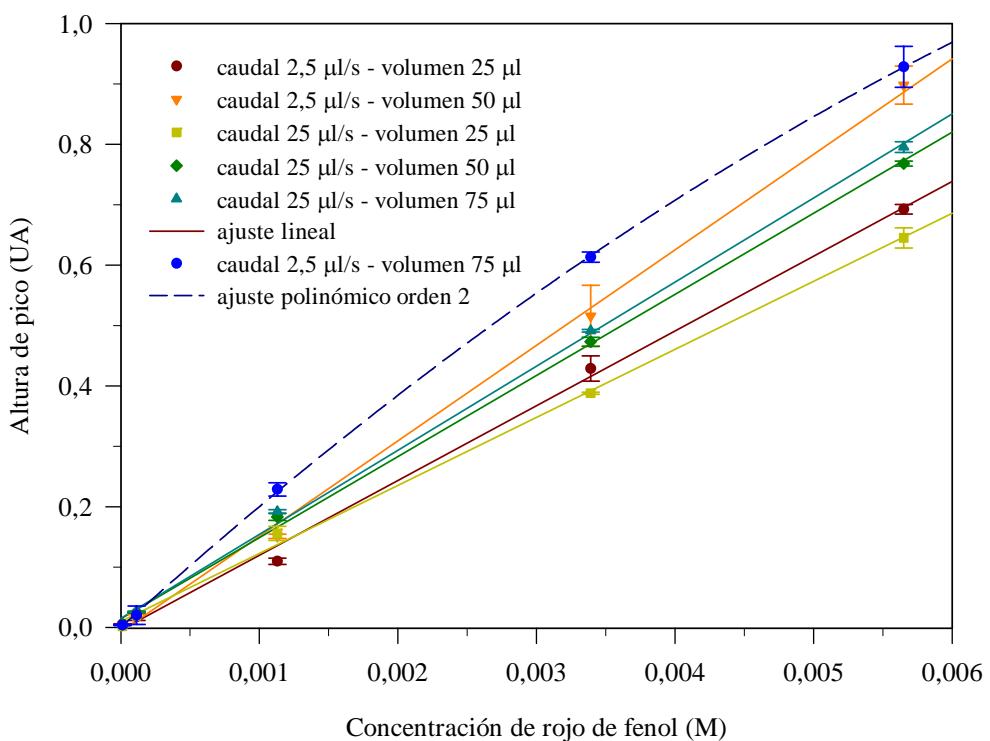
**Figura 7.29** Ajuste polinómico de orden 2 para las respuestas obtenidas a caudal variable y un volumen aspirado de 50  $\mu\text{l}$  de solución patrón de rojo de fenol.

En la figura 7.29 se muestra el ajuste polinómico realizado con las señales obtenidas en función de la concentración. Se puede observar que la respuesta a todos los caudales sigue la misma tendencia respecto de la concentración y no se observa una gran diferencia en las alturas de pico respecto del caudal. Por tanto, en las condiciones estudiadas resulta más evidente el efecto de la dispersión cuando se comparan directamente las señales obtenidas (figura 7.28).



**Figura 7.30** Influencia en la señal del volumen de aspiración a dos caudales. Las condiciones utilizadas de caudal y volumen son las siguientes, (A)  $25 \mu\text{l/s}$ ,  $75 \mu\text{l}$ ; (B)  $25 \mu\text{l/s}$ ,  $50 \mu\text{l}$ ; (C)  $25 \mu\text{l/s}$ ,  $25 \mu\text{l}$ ; (D)  $2,5 \mu\text{l/s}$ ,  $75 \mu\text{l}$ ; (E)  $2,5 \mu\text{l/s}$ ,  $50 \mu\text{l}$  y (F)  $2,5 \mu\text{l/s}$ ,  $25 \mu\text{l}$ .

En la figura 7.30 se muestran los resultados obtenidos para el último estudio realizado a dos caudales y tres volúmenes de aspiración. Los volúmenes utilizados son 25, 50 y 75  $\mu\text{l}$ , y los caudales 25 y 2,5  $\mu\text{l/s}$ . Los calibrados han sido efectuados en dos días consecutivos. Por esta razón, las alturas de pico obtenidas en los dos caudales son diferentes debido a que se produce degradación de las soluciones no siendo atribuibles las diferencias a un efecto de la dispersión. Si se comparan las parejas de gráficas correspondientes al mismo volumen pero distinto caudal (A con D; B con E y C con F), se observa un aumento de la dispersión efectiva evidente por la anchura del pico. También se observa en todos los casos que a menor volumen mayor es la dispersión ya que tanto las alturas de pico como las anchuras disminuyen proporcionalmente.



**Figura 7.31** Ajuste lineal para todos las condiciones estudiadas excepto el caudal de 2,5  $\mu\text{l/s}$  con el volumen mayor (75  $\mu\text{l}$ ).

Se puede observar que la tendencia general de respuesta es lineal respecto a la concentración en todas las condiciones estudiadas salvo para el volumen mayor y el menor caudal (figura 7.31). En este caso, se obtiene un desvío de la linealidad debido al mayor volumen aspirado que provoca una disminución de la dispersión efectiva para todas las concentraciones.

### 7.4.3 Determinación del volumen útil

Con el objetivo de determinar el volumen útil del microchip utilizado, se realizó una experiencia que ha consistido en estimar el tiempo que tardaba una solución de colorante en llegar desde cada uno de los canales de entrada hasta el detector óptico. La solución colorante utilizada es una disolución de rojo de fenol  $5,65 \cdot 10^{-3} \text{M}$  en medio básico. La determinación se realizó por triplicado a tres caudales distintos:  $1,25 \mu\text{l/s}$ ,  $1,66 \mu\text{l/s}$  y  $2,083 \mu\text{l/s}$ , para cada uno de los tres canales del microchip (figura 7.22). De este modo se pudo verificar que no existían diferencias significativas en el cálculo del volumen en función del caudal pero sí lógicamente en función de la distancia, es decir del canal de aspiración.

Los programas utilizados en la operativa del sistema para la determinación del volumen fueron diferentes en función del caudal y del canal ensayado. En la figura 7.32 se muestra un esquema del microchip donde se señala con detalle cada uno de los segmentos (canales) del tubo para los que se ha determinado el volumen.

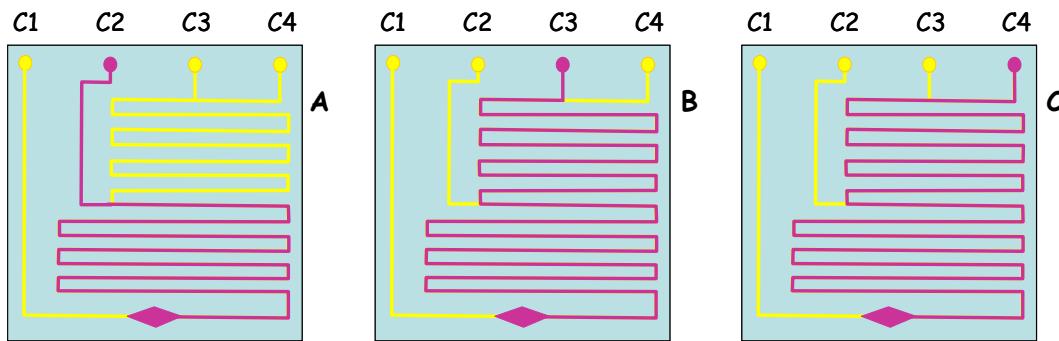


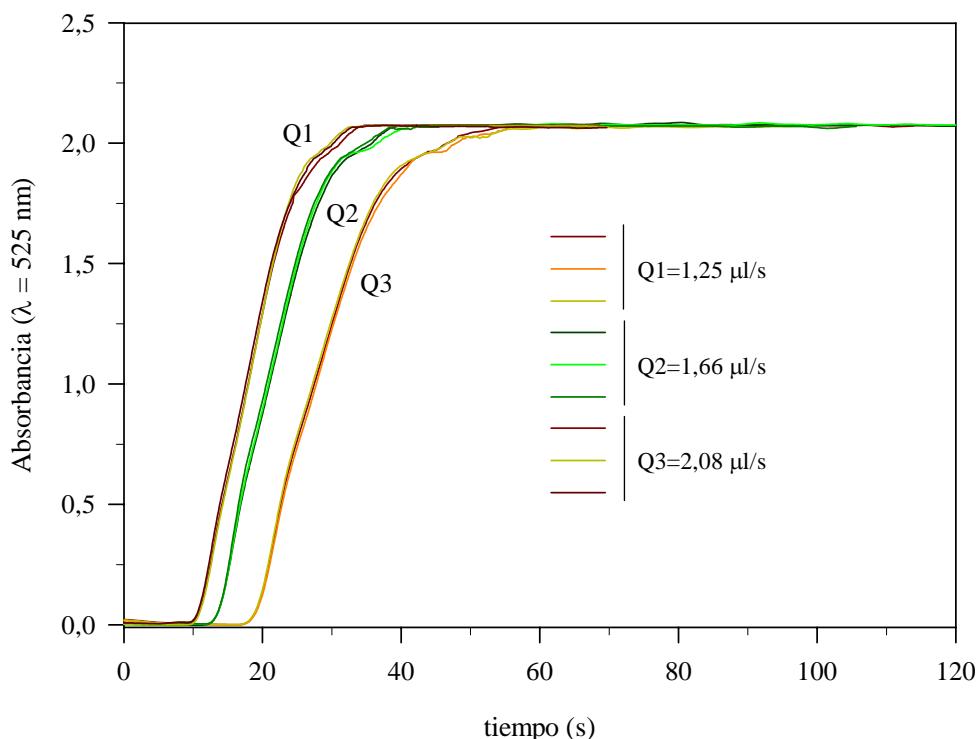
Figura 7.32 Canales del microchip utilizados: (a) canal 2, (b) canal 3 y (c) canal 4.

En la tabla 7.3 se resumen los procedimientos analíticos base utilizados, uno para caudales menores ( $1,25$  y  $1,66 \mu\text{l/s}$ ), y otro para el caudal superior. Las únicas diferencias estriban en el puerto desde el que se ha procedido a realizar la aspiración de colorante y el tiempo de aspiración, superior a caudales bajos. Los estudios se han realizado con la jeringa de menor volumen ya que permite trabajar con caudales más pequeños.

Tabla 7.3 Procedimientos analíticos utilizados en función del caudal y el canal de aspiración.

| Caudal ( $\mu\text{l/s}$ ) | Volumen canal 2 (C2) | Volumen canal 3 (C3) | Volumen canal 4 (C4) | Objetivo          |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| 1,25; 1,66                 | 30 s asp agua C4     | 30 s asp agua C4     | 30 s asp agua C3     | establecer LB     |
|                            | 120 s asp col C2     | 120 s asp col C3     | 120 s asp col C4     | escalón respuesta |
|                            | 150 s impulsión      | 150 s impulsión      | 150 s impulsión      | vaciado jeringa   |
| 2,083                      | 30 s asp agua C4     | 30 s asp agua C4     | 30 s asp agua C3     | establecer LB     |
|                            | 70 s asp col C2      | 70 s asp col C3      | 70 s asp col C4      | escalón respuesta |
|                            | 100 s impulsión      | 100 s impulsión      | 100 s impulsión      | vaciado jeringa   |

A título de ejemplo en la figura 7.33 se muestra un registro de los escalones obtenidos para el cálculo del volumen útil del microchip. La determinación del volumen entre el puerto 3 y el detector (canal 3) es el más importante, ya que este segmento de tubo se utilizará como reactor tanto en los estudios sin reacción química (estableciendo el modelo de respuesta) como en los que existe reacción. El procedimiento experimental consistido en establecer el tiempo que tarda en llegar hasta el detector el primer segmento aspirado de colorante. En la figura 7.33 se han representado todas las experiencias realizadas. Se puede observar que la repetitividad del sistema es buena porque se obtiene siempre la misma respuesta al repetir la experiencia para un caudal determinado.



**Figura 7.33** Estimación del volumen útil entre el puerto 3 y el detector (canal 3). Escalones obtenidos mediante la aspiración de colorante a los tres caudales.

En la tabla 7.4 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los canales en función del caudal. Se puede comprobar que los volúmenes estimados desde el puerto 4 (canal 4) y desde el puerto 3 (canal 3) son muy parecidos. Esto es debido a la diferencia de longitud tan pequeña que existe entre los dos canales (7,75 mm) y al modo en como se ha realizado la experiencia. En la primera secuencia del programa siempre se llena todo el microchip de agua y en la segunda se aspira, durante un tiempo suficiente, el colorante hasta que todo el canal está lleno de éste y llega al detector dando la señal. Cuando se determina el volumen del canal 4, se llena previamente de agua el microchip desde el canal 3, entonces la distancia desde el puerto 4 hasta el puerto 3 está llena de colorante antes de comenzar a aspirar y realizar la medida (ver figura 7.32). Como resultado los tiempos obtenidos son casi iguales. Esto no supone un problema ya que el volumen que es

necesario conocer es el volumen del canal 3. Como se ha comentado antes éste será el volumen de reactor utilizado y modelizado posteriormente.

El volumen útil para cada canal ha sido calculado como el valor medio de 9 determinaciones, tres a cada caudal. Se ha aplicado el criterio Q, para verificar la no existencia de valores anómalos [Miller & Miller, 1993], no encontrándose diferencias significativas entre los tiempos obtenidos para un mismo caudal. El error en la determinación ha sido calculado como  $I_{n-1}^{95\%}$ .

**Tabla 7.4** Determinación del volumen útil del reactor utilizado para cada uno de los canales.

| <b>Caudal (μl/s)</b>     | <b>Canal 2 (μl)</b> | <b>Canal 3 (μl)</b> | <b>Canal 4 (μl)</b> |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 2,083                    | 14,0603             | 23,9545             | 18,4866             |
|                          | 13,8853             | 21,7465             | 18,7470             |
|                          | 14,4508             | 22,2173             | 19,2678             |
| 1,66                     | 14,0603             | 24,7141             | 18,8825             |
|                          | 13,8853             | 23,6085             | 20,8413             |
|                          | 14,4508             | 21,7875             | 18,8825             |
| 1,25                     | 14,3856             | 23,3325             | 19,6875             |
|                          | 14,3856             | 24,3750             | 19,4438             |
|                          | 14,7541             | 23,7500             | 20,3125             |
| <b>Volumen útil (μl)</b> |                     | <b>14,3±0,2</b>     | <b>23,3±0,8</b>     |
|                          |                     |                     | <b>19,4±0,6</b>     |

## 7.5 Modelización del sistema microfluídico

Existen en la literatura [DeLon et al., 1992; Kolev, 1995; van Akker et al., 1998; Bühler et al., 2001] numerosos ejemplos de modelización de sistemas de análisis en flujo sin o con reacción química [Montesinos et al., 1991]. No obstante, sus resultados no son directamente aplicables a los sistemas miniaturizados diseñados en esta tesis. Las características hidrodinámicas de las conducciones en un microchip, rectangulares, difieren sensiblemente de las que existen en los tubos cilíndricos utilizados habitualmente en los sistemas de análisis en flujo convencionales [Culbertson et al., 2002]. Además se han de considerar dos factores adicionales, primero el hecho de que el volumen tanto de muestra como de reactivo, es decenas de microlitros y, segundo, que las conducciones son tortuosas, con ángulos de 90° o 180° lo que modifica sensiblemente el grado de mezcla y las características del flujo.

En un sistema de flujo basado en la técnica FIA, la muestra es transportada a través del sistema desde el punto de inserción hasta el detector. Durante el transporte, la muestra se mezcla físicamente con el portador y también puede existir interacción química dependiendo de la composición de la disolución portadora [Horvai y Pungor, 1986].

El intervalo de caudales utilizado habitualmente en los sistemas FIA aseguran la existencia de un régimen laminar. La diferencia básica entre el flujo laminar y turbulento está en el grado de mezcla final. En el caso del flujo turbulento, el bolo de muestra insertado es transportado sin prácticamente mezcla con su portador. Por el contrario, cuando el flujo es laminar, la muestra y el portador interpenetran mutuamente por efecto del gradiente de concentraciones y, consecuentemente, se da el fenómeno de la dispersión.

Inicialmente se ha intentado la modelización del sistema de flujo en las condiciones más sencillas posibles, es decir, flujo no segmentado sin reacción química. Para la caracterización inicial del sistema se han utilizado los datos obtenidos del sistema microfluídico utilizando como portador agua desionizada y, como muestra, el colorante azóico formado en la reacción del ion nitrito con sulfanilamida y diclorohidrato de NED. Ésta es la reacción que se pretende utilizar en la aplicación final del microchip.

Si se considera el sistema de flujo más simple, es decir una conducción recta en la que se inserta un bolo de muestra (figura 7.34), y se consideran los dos tipos de régimen posible, se tendrá que en el caso de un flujo turbulento, la muestra se desplazará sometida a un perfil de velocidades plano. En estas condiciones se producirá un ensanchamiento de la zona de tubo ocupada por la muestra debido a la difusión axial (en la dirección radial la concentración se puede considerar constante). En el caso de un sistema con flujo laminar (figura 7.34) el bolo será deformado por efecto del perfil de velocidades y, aparecerá la difusión molecular debida al gradiente de concentraciones radial que se forma.

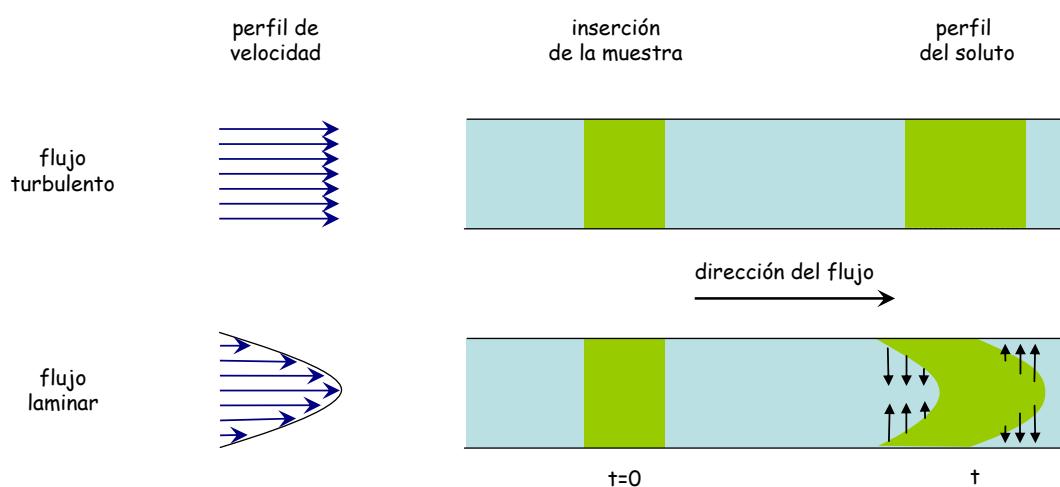


Figura 7.34 Perfil de velocidad y evolución de una inserción de muestra para un flujo turbulento y laminar.

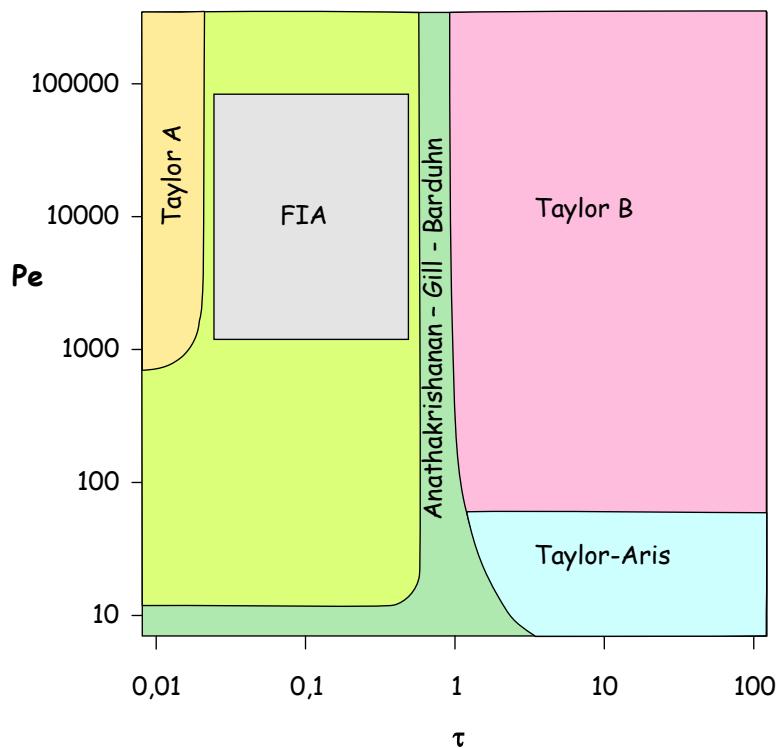
En el caso de sistemas de flujo en microchip, los perfiles de velocidad son siempre laminares con Reynolds muy bajos. Los valores de  $Re$ , calculados con la ecuación 7.1, a partir de los datos de los experimentos realizados para la modelización están comprendidos entre 2 y 4, habría que exceptuar las pruebas a mayor caudal en que el Reynolds ha sido de

9.5. Con estos valores de  $Re$ , el perfil de velocidades del sistema utilizado tendrá la forma de la figura 7.1.

Para un reactor tubular lineal con flujo laminar, si se considera, como fenómenos de transporte, difusión y convección, la ecuación que describe el proceso es:

$$\frac{dC}{dt} + (u/L) \frac{dC}{dx'} = \left( D_m / L^2 \right) \frac{d^2C}{dx'^2} \quad \text{ecuación 7.6}$$

donde,  $C$  es la concentración de muestra ( $M$ ),  $t$  es el tiempo (s),  $u$  es la velocidad lineal en la dirección del flujo ( $cm/s$ ),  $L$  es la longitud total de la conducción ( $cm$ ),  $x'$  es la distancia axial dividida por la longitud total (adimensional) y  $D_m$  es el coeficiente de difusión molecular ( $cm^2/s$ ).



**Figura 7.35** Regiones de validez de las diferentes soluciones a la ecuación difusión-convección propuestas por diferentes autores para sistemas de inyección en flujo, representadas en función del número de Peclet (Pe) y del tiempo adimensional  $\tau$  [Hull et al., 1992].

Varios autores han propuesto diferentes soluciones para la ecuación 7.6. Taylor [1953] propuso soluciones a situaciones correspondientes a los dos extremos del gráfico (figura 7.35) en función del Peclet, número adimensional que indica la relación entre el transporte convectivo y la difusión, y del tiempo adimensional  $\tau = D_m t / a^2$ . En un extremo se asume que el tiempo de transporte es mínimo. Consecuentemente, la contribución de la difusión molecular a la dispersión de la muestra es despreciable y la convección es el efecto

dominante. En el otro extremo, donde la difusión molecular es el efecto dominante, Aris [1956] propuso una modificación de la aproximación de Taylor considerando un incremento sustancial de la mezcla radial por difusión. Gill y Ananthakrishnan [1968] y Bate et al. [1973] aproximan la solución en una zona comprendida entre flujo laminar y difusión molecular. De cualquier forma, como se puede observar en la figura 7.35, la zona normal de trabajo de los sistemas por inyección en flujo está fuera de las zonas en las que se dispone de una solución matemática concreta.

Para el caso B propuesto por Taylor (tiempo adimensional elevado) y siendo la difusión el fenómeno de transporte dominante, la solución matemática a un escalón creciente es:

$$C_m = \frac{c_0}{2} \left\{ 1 + \operatorname{erf} \left[ \left( \frac{uL}{4D_L} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{(t - t_R)}{(t \cdot t_R)^{\frac{1}{2}}} \right] \right\} \quad \text{ecuación 7.7}$$

Para estimar la respuesta a un pulso se consideran dos escalones, uno positivo y uno negativo, obteniéndose:

$$C_m = \frac{c_0}{2} \left\{ \operatorname{erf} \left[ \left( \frac{uL_1}{4D_{L_1}} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{(t - t_R)}{(t \cdot t_R)^{\frac{1}{2}}} \right] - \operatorname{erf} \left[ \left( \frac{uL_2}{4D_{L_2}} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{(t - t_R')}{(t \cdot t_R')^{\frac{1}{2}}} \right] \right\} \quad \text{ecuación 7.8}$$

donde,  $u$  es la velocidad media en la conducción ( $Q_L/A$ );  $L$  la longitud de la conducción;  $t_F$  es el tiempo de inyección ( $Q_L/V_{\text{inj}}$ );  $t_R$  el tiempo de residencia ( $L/u$ );  $t_R'$  es el tiempo para el segundo frente ( $t_R + t_F$ ); se consideran dos difusiones axiales diferentes (por delante y por detrás)  $D_{L_1}$  y  $D_{L_2}$ ;  $L_1$  y  $L_2$  son las longitudes hasta cada uno de los frentes ( $L_2 = L_1 - u t_F$ ).

Para los casos en que la difusión sea despreciable y en el sistema tenga lugar una combinación de los procesos de mezcla, la forma de resolverlo es considerar la conducción del microchip como una combinación de reactores ideales. En concreto, como si fuera uno o varios reactores continuos de tanque agitado (RCTA) y un reactor de flujo pistón (RFP) sin dispersión. Para el modelo de un RCTA se realiza el balance de materia y una vez integrado para este caso se obtiene:

$$C = C_o \left( 1 - e^{-\frac{Q}{V} t} \right) \quad 0 < t < \frac{V_s}{Q} \quad \text{ecuación 7.9}$$

$$C = C_o \left( e^{\frac{V_s}{V} t} - 1 \right) e^{-\frac{Q}{V} t} \quad t > \frac{V_s}{Q} \quad \text{ecuación 7.10}$$

donde,  $C(t)$  es la concentración en el detector para un tiempo  $t$ ,  $C_0$  es la concentración de la muestra insertada,  $Q$  es el caudal del sistema,  $V$  es el volumen del reactor,  $V_s$  es el volumen de la muestra insertada.

Para el caso de un RFP sin dispersión el sistema se comporta como un retraso perfecto de la señal, es decir:

$$C(t + \tau) = C_0(t) \quad t > 0 \quad \text{ecuación 7.11}$$

### 7.5.1 Estudio experimental

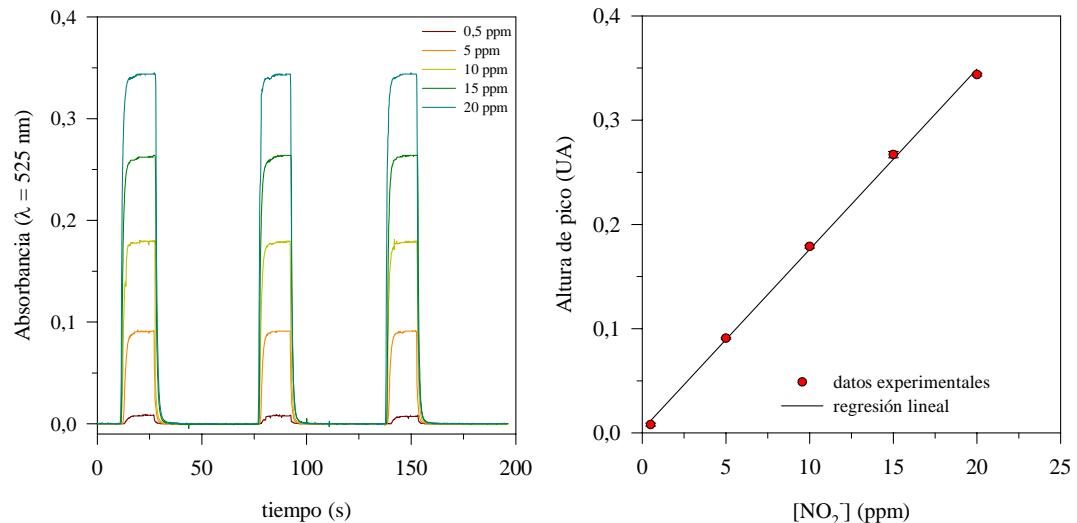
#### 7.5.1.1 Preparación del colorante azoico

Como se ha comentado anteriormente, en las experiencias realizadas se ha utilizado una solución del colorante azoico obtenido mediante la reacción de ion nitrito con sulfanilamida y diclorhidrato de NED. Se ha utilizado esta solución para que no existan diferencias atribuibles al uso de otro colorante cuando se realicen posteriormente los estudios con reacción química.

Se ha realizado un estudio previo para establecer la composición de esta solución. El estudio ha consistido en obtener el colorante azoico mediante reacción en discontinuo de 20 ml de solución patrón de ion nitrito de 100 ppm a la que se ha añadido distintos volúmenes de reactivo y después se ha enrasado hasta 100 ml, con agua desionizada. El intervalo de volúmenes de reactivo estudiado ha estado comprendido entre 1-50 ml. Se ha obtenido saturación de la respuesta, por tanto exceso de reactivo, a partir de 10 ml. Finalmente, se ha establecido como idónea una solución patrón madre de colorante azoico obtenida con 20 ml de solución patrón de 100 ppm y 10 ml de reactivo. Esta solución madre corresponde al producto obtenido para una concentración de ion nitrito de 20 ppm. En todo el estudio se han utilizado soluciones patrón obtenidas por dilución sucesiva a partir de una solución madre de esta concentración.

Inicialmente, con el objeto de definir si la respuesta del sistema es lineal para concentraciones comprendidas entre 0-20 ppm se ha realizado un calibrado utilizando patrones preparados por dilución a partir de la solución madre de colorante azoico descrita anteriormente.

El procedimiento analítico utilizado ha sido la aspiración por el canal 3 durante 20 s del patrón correspondiente y la aspiración posterior por el canal 4 durante 60 s de agua, a un caudal de 25  $\mu\text{l/s}$ . En la figura 7.36 se muestra los resultados obtenidos en función de la concentración por triplicado (a) y la correlación obtenida (b).



**Figura 7.36** Calibrado previo para soluciones patrón de ion nitrito (colorante azoico), con reacción en discontinuo. Las condiciones de operación han sido caudal 25  $\mu$ l/s y volumen aspirado 500  $\mu$ l. (a) Respuesta obtenida y (b) recta de regresión,  $H(UA)=0,003(\pm 0,012) + 0,017(\pm 0,001) [NO_2]$  (ppm).

Una vez verificada la linealidad de la respuesta en función de la concentración se ha decidido trabajar en el estudio de modelización con las soluciones de 20 y 10 ppm. La respuesta obtenida es lo suficientemente significativa como para que con volúmenes de aspiración pequeños se obtenga señal. A continuación se detallan los experimentos y resultados obtenidos para ajustar el modelo.

#### 7.5.1.2 Determinación de $C_0$

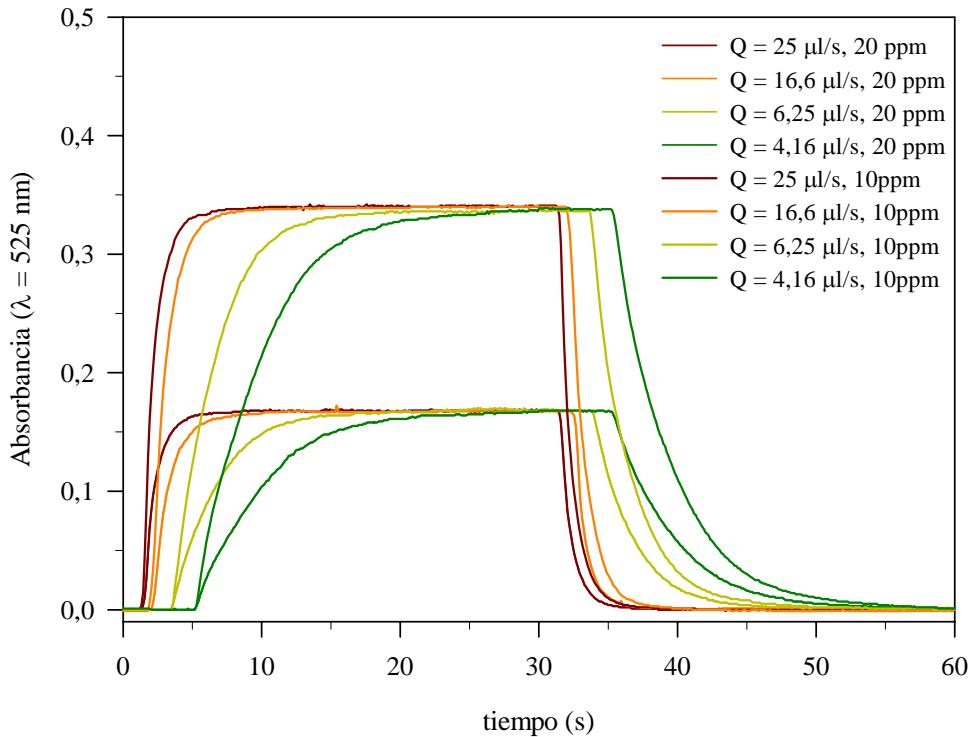
El procedimiento general utilizado en todos los estudios ha sido la aspiración de colorante azoico por el canal 3 y la aspiración posterior de agua desionizada por el canal 4. Los tiempos de aspiración son función del caudal y el volumen necesarios para cada caso. En la estimación del valor de  $C_0$ , para cada concentración se aspiró durante 30 segundos colorante. En la tabla 7.5 se recoge de un modo generalizado el procedimiento seguido. No obstante, cabe recordar que cada una de las condiciones estudiadas requiere un procedimiento específico.

El primer estudio realizado ha sido la determinación del valor  $C_0$  para poder calcular, en todos los casos, el valor de la absorbancia normalizada. El procedimiento ha consistido en realizar escalones crecientes y decrecientes para los cuatro caudales y las dos concentraciones analizadas. En la figura 7.37 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 7.5** Procedimientos generales definidos en el programa de gestión para el estudio de modelización.

| Estudio                                       | Procedimiento                                    | Objetivo          |
|---|--|-------------------|
| C <sub>0</sub> /DTR<br><i>4 caudales</i>      | 10 s aspiración agua C4                          | establecer LB     |
|   | 30 s aspiración patrón C3                        | escalón de subida |
|   | 30 s aspiración agua C4                          | escalón de bajada |
|   | 70 s impulsión                                   | vaciado jeringa   |
| Señales<br><i>4 caudales,<br/>4 volúmenes</i> | 10 s aspiración agua por C4                      | establecer LB     |
|   | t <sub>1</sub> variable aspiración patrón C3     | aspiración patrón |
|   | t <sub>2</sub> aspiración agua por C4            | bajada del pico   |
|   | 10 s + t <sub>1</sub> + t <sub>2</sub> impulsión | vaciado jeringa   |

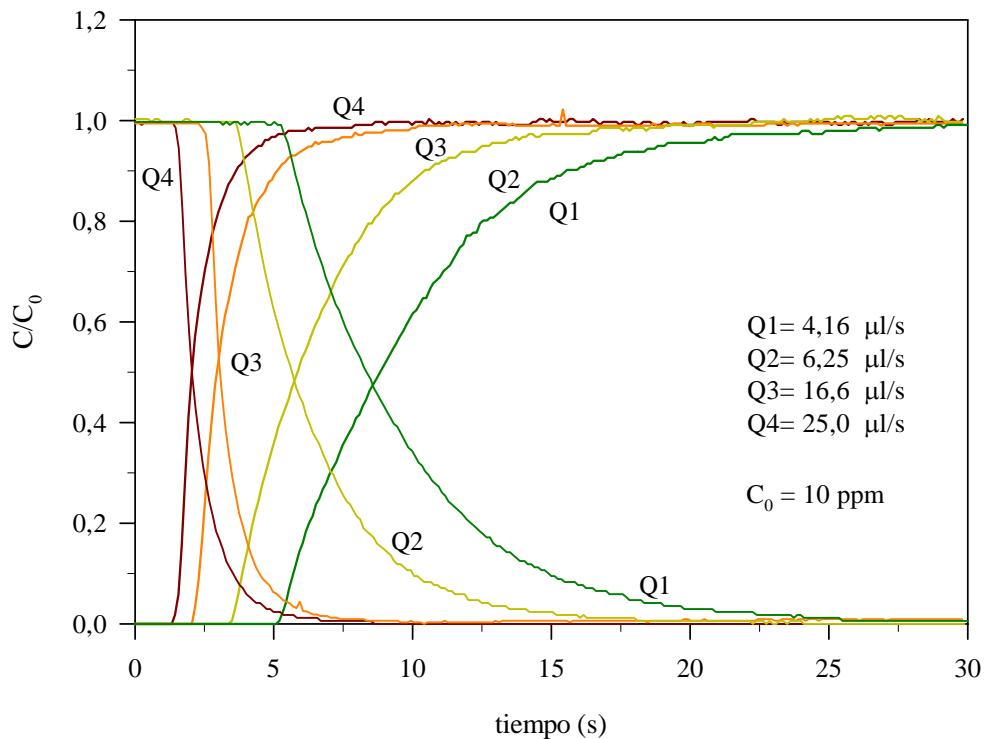
Puede observarse que el valor de absorbancia máxima para una concentración dada es independiente del caudal. La única variación significativa es el tiempo de subida y bajada que coincide, en función del caudal, para las dos concentraciones.

**Figura 7.37** Determinación experimental de C<sub>0</sub> para 10 ppm y 20 ppm a los cuatro caudales.

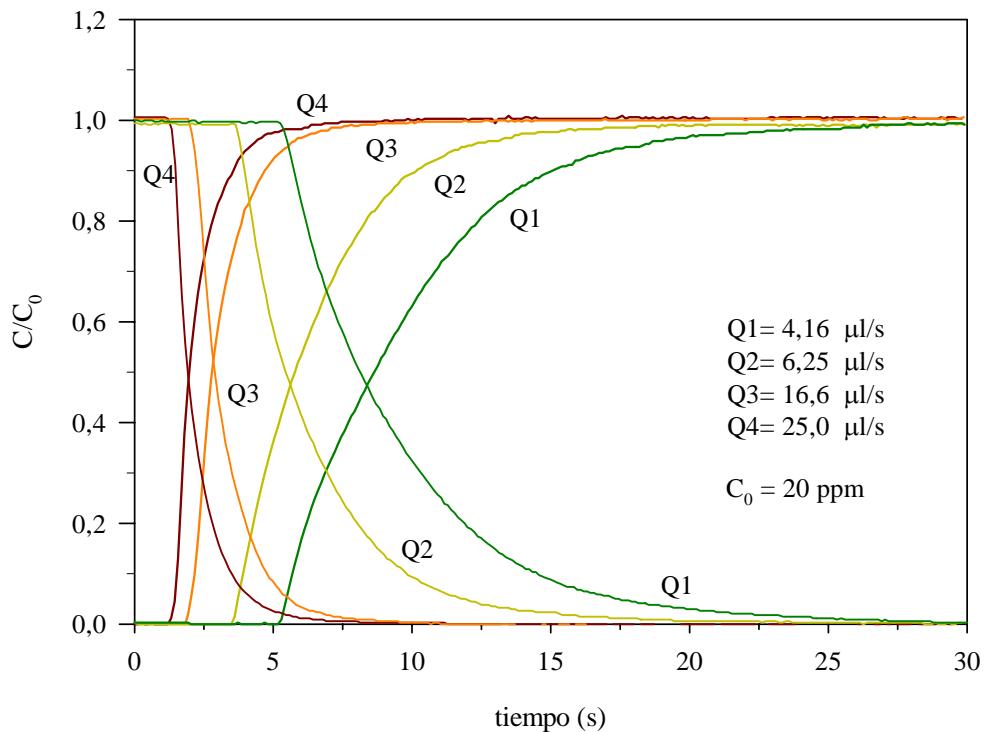
Los valores obtenidos de C<sub>0</sub> para cada concentración son los que se utilizarán en todas las normalizaciones posteriores. De este modo, la respuesta normalizada será independiente de la concentración. La normalización de los valores se realiza dividiendo la respuesta obtenida por el valor de C<sub>0</sub> correspondiente. Los valores obtenidos son, C<sub>0</sub> (10 ppm) = 0,1685±0,0009 y C<sub>0</sub> (20 ppm) = 0,339±0,003.

El siguiente paso para estudiar la respuesta del sistema, ha sido realizar un estudio de distribución de tiempo de residencia (DTR). Se han realizado escalones positivos y

negativos para los diferentes caudales (tabla 7.7), cuatro escalones agua/patrón y cuatro escalones patrón/agua para las dos concentraciones de colorante. Este mismo estudio servirá para la determinación de la difusión del sistema. En las figuras 7.38 y 7.39 se presenta el resultado normalizado ( $C/C_0$ ) para las dos concentraciones.



**Figura 7.38** Valores normalizados para las DTR en función del caudal para 10 ppm.



Superponiendo las dos figuras se puede observar que, en los dos casos estudiados, las respuestas normalizadas son similares lo que confirma que la señal normalizada es independiente de la concentración. Esto es evidente tanto para el escalón de subida como para el de bajada.

#### 7.5.1.3 Determinación de la difusividad

Si se considera que la dispersión de la muestra es debida a la difusión axial, la determinación de la difusión según Levenspiel [1979] ha de seguir el siguiente procedimiento: primero, integrar la respuesta obtenida para cada uno de los escalones normalizados según la ecuación 7.12, posteriormente calcular, con la ecuación 7.13, el número de Peclet y, por último, se calcula la difusividad con la ecuación 7.14. En este caso se ha calculado que el área de paso por el microcanal es  $0,14 \text{ mm}^2$  (anchura media  $700\mu\text{m}$  y profundidad  $200 \mu\text{m}$ ) y la longitud de canal de  $16,64 \text{ cm}$ , calculada como volumen total del reactor dividido por la sección de paso.

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^1 t^2 dC}{\left(\int_0^1 t dC\right)^2} - 1 \quad \text{ecuación 7.12}$$

$$Pe = \frac{1 + \sqrt{1 + 8\sigma^2}}{\sigma^2} \quad \text{ecuación 7.13}$$

$$D = \frac{uL}{Pe} \quad \text{ecuación 7.14}$$

A partir de los resultados mostrados en las figuras 7.38 y 7.39 y siguiendo el procedimiento descrito, se ha calculado el número de Peclet y la difusividad para los dos frentes que se presentan en la tabla 7.6 para todas las condiciones estudiadas.

**Tabla 7.6** Difusividades experimentales para las 16 condiciones estudiadas.

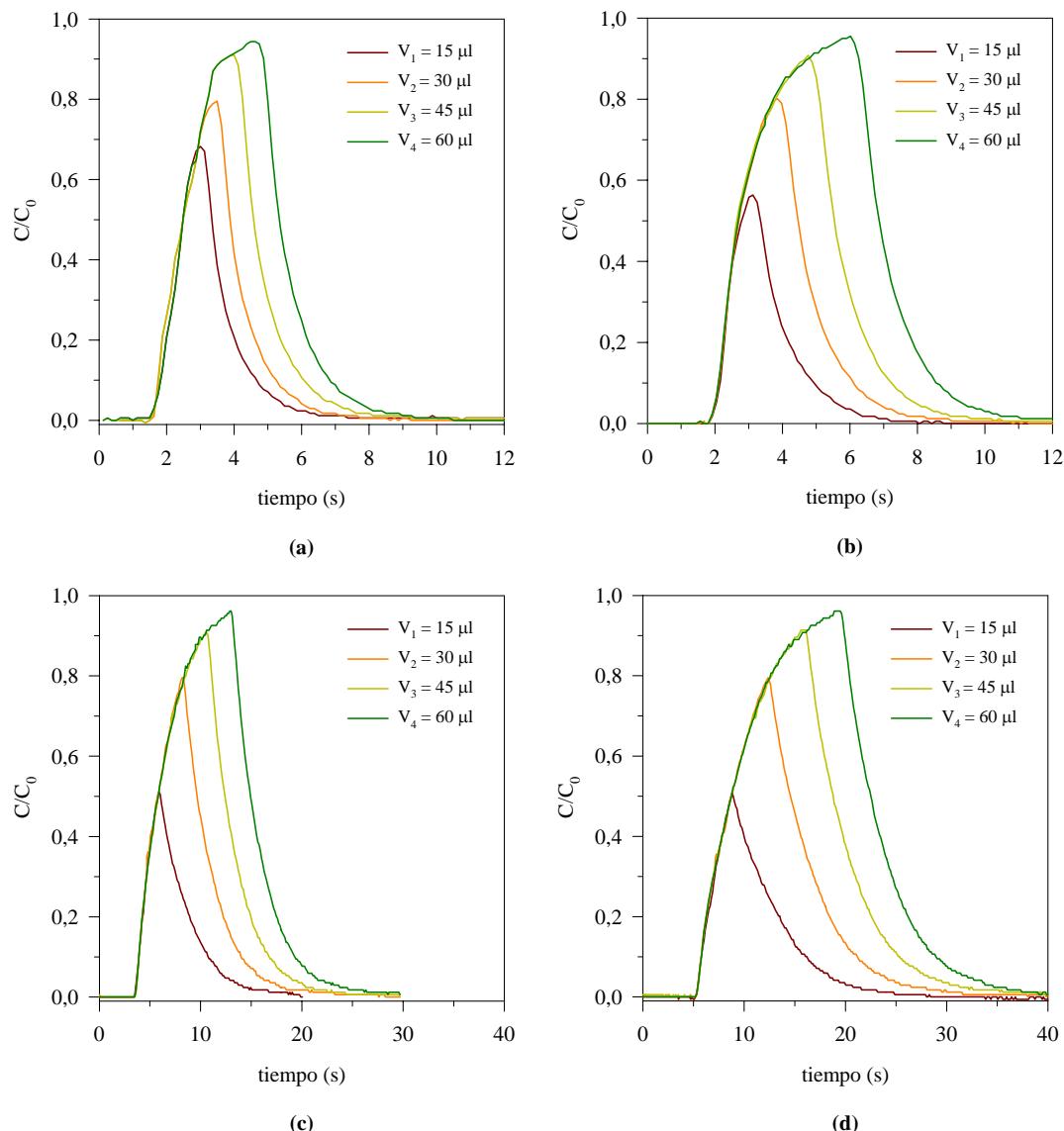
|               |                            | $C_0 = 10 \text{ ppm}$ |                                     | $C_0 = 20 \text{ ppm}$ |                                     | $C_0 = 10 \text{ ppm}$ |                                     | $C_0 = 20 \text{ ppm}$ |                                     |
|---------------|----------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| $u$<br>(cm/s) | $Q$<br>( $\mu\text{l/s}$ ) | $Pe_1$                 | $D_1$<br>( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) | $Pe_1$                 | $D_1$<br>( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) | $Pe_2$                 | $D_2$<br>( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) | $Pe_2$                 | $D_2$<br>( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) |
| 2,97          | 4,16                       | 0,3016                 | 164                                 | 0,3033                 | 163                                 | 0,4515                 | 110                                 | 0,4523                 | 109                                 |
| 4,46          | 6,25                       | 0,250                  | 297                                 | 0,249                  | 298                                 | 0,4831                 | 154                                 | 0,4872                 | 152                                 |
| 11,86         | 16,6                       | 0,182                  | 1089                                | 0,1681                 | 1174                                | 0,5185                 | 381                                 | 0,5182                 | 381                                 |
| 17,86         | 25,0                       | 0,1496                 | 1987                                | 0,1397                 | 2128                                | 0,5312                 | 560                                 | 0,5297                 | 561                                 |

Con el objetivo de realizar la modelización del sistema sin reacción química, se ha efectuado un diseño de experimentos, donde se han considerado como factores: el caudal, el volumen de patrón aspirado y la concentración introducida. En la tabla 7.7 se presentan los diferentes experimentos realizados (32 condiciones por triplicado).

**Tabla 7.7** Experimentos realizados por triplicado para estudiar la respuesta del microchip.

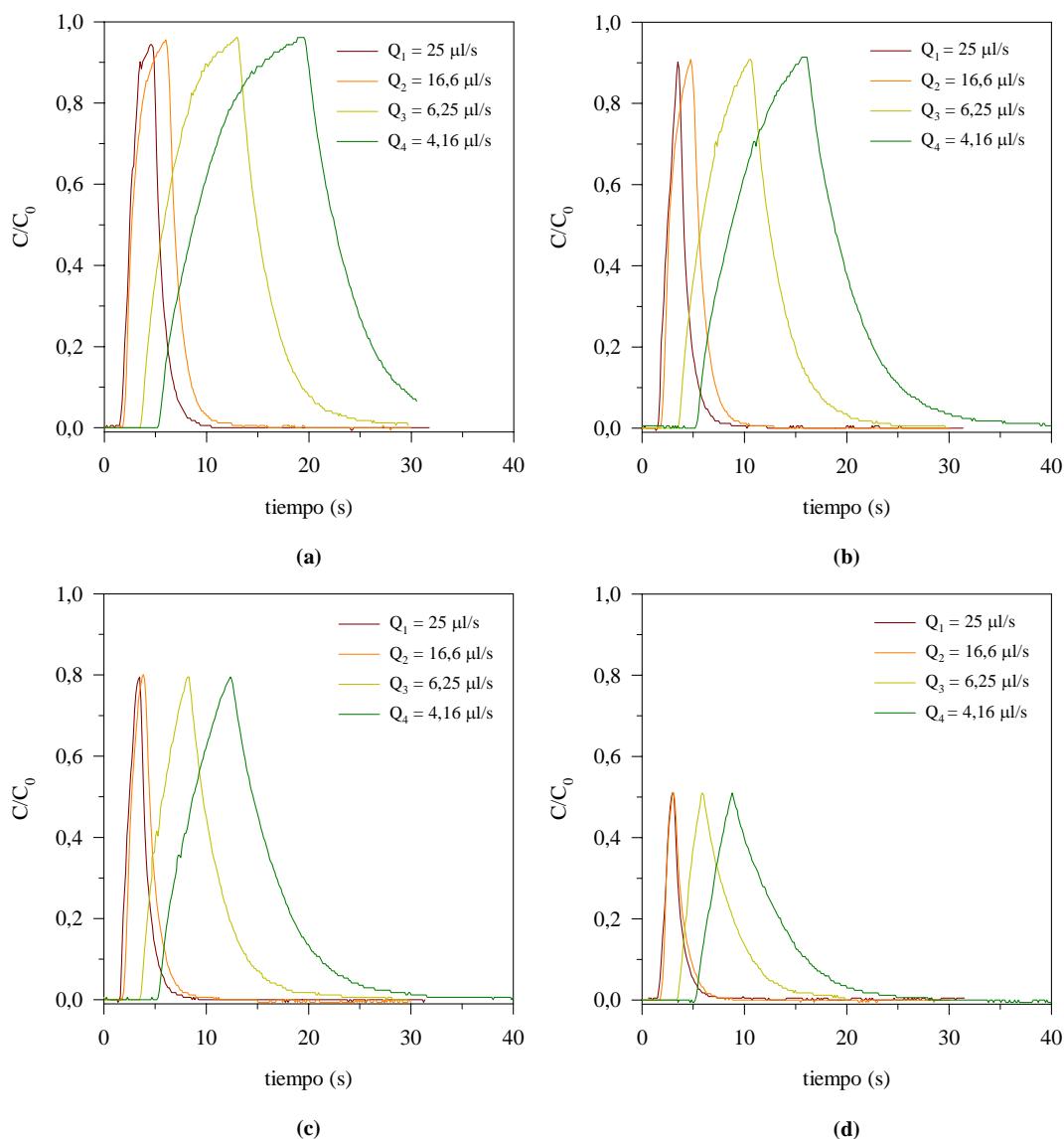
| Volumen ( $\mu\text{l}$ ) | Caudal ( $\mu\text{l/s}$ ) | Concentración (ppm) |
|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| 15,0                      | 4,166                      | 10                  |
| 30,0                      | 6,25                       | 20                  |
| 45,0                      | 16,6                       |                     |
| 60,0                      | 25,0                       |                     |

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la menor concentración analizada. Se han omitido las replicas para mostrar mejor el tipo de respuesta obtenida. Los resultados se han agrupado de dos modos distintos. En la figura 7.40, se muestran las respuestas en función del volumen, manteniendo constante el caudal y, en la figura 7.41 las respuestas en función del caudal manteniendo constante el volumen.



**Figura 7.40** Respuestas de absorbancia normalizadas  $[\text{NO}_2^-]$  de 10 ppm, obtenidas para caudal constante y volumen de aspiración variable. (a) Caudal 25  $\mu\text{l/s}$ , (b) caudal 16,6  $\mu\text{l/s}$ , (c) caudal 6,25  $\mu\text{l/s}$  y (d) caudal 4,16  $\mu\text{l/s}$ .

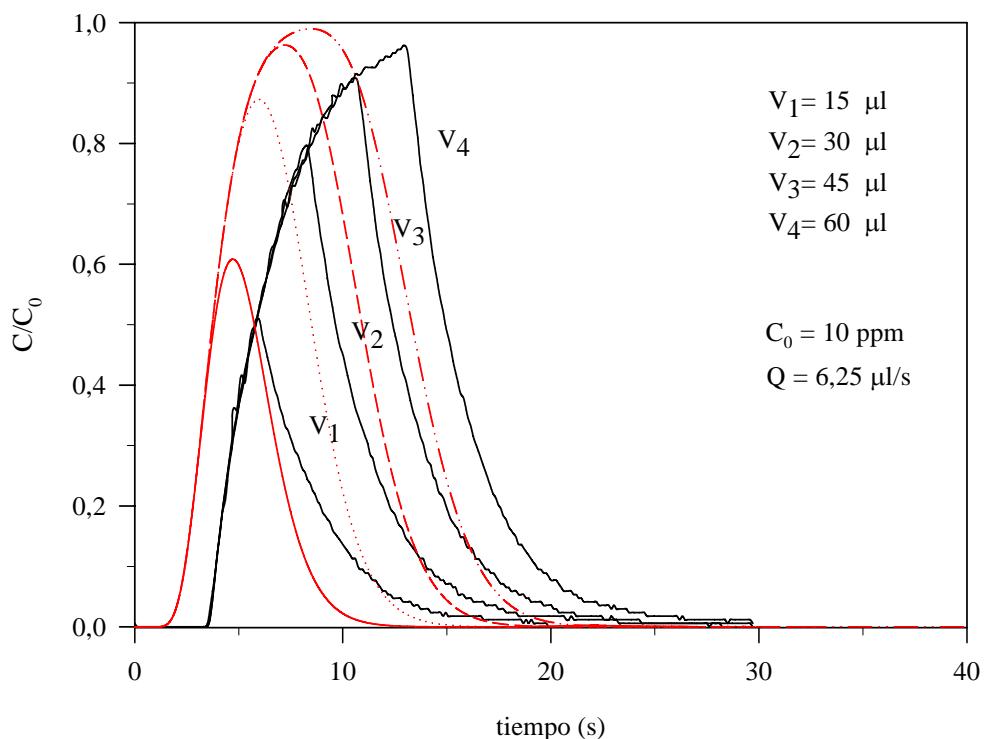
En la figura 7.40 se muestra la influencia del volumen aspirado en la respuesta del sistema a distintos caudales. Los volúmenes aspirados para los diferentes caudales son los mismos. Las figuras (a) y (b) corresponden a los mayores caudales y las figuras (c) y (d) a menores. Si se comparan caudales grandes y pequeños por separado, se puede apreciar que la dispersión aumenta al disminuir el caudal. Además en todos los casos, los picos se ensanchan comparativamente respecto al caudal superior. Se observa también una ligera disminución de la altura de pico en función del caudal que es más evidente a caudales altos (a, b) y volúmenes bajos (15 y 45  $\mu\text{l}$ ).



**Figura 7.41** Respuestas de absorbancia normalizadas para  $[\text{NO}_2]$  de 10 ppm, obtenidas a volumen constante y caudal de aspiración variable. (a) Volumen 60  $\mu\text{l}$ , (b) volumen 45  $\mu\text{l}$ , (c) volumen 30  $\mu\text{l}$  y (d) volumen 15  $\mu\text{l}$ .

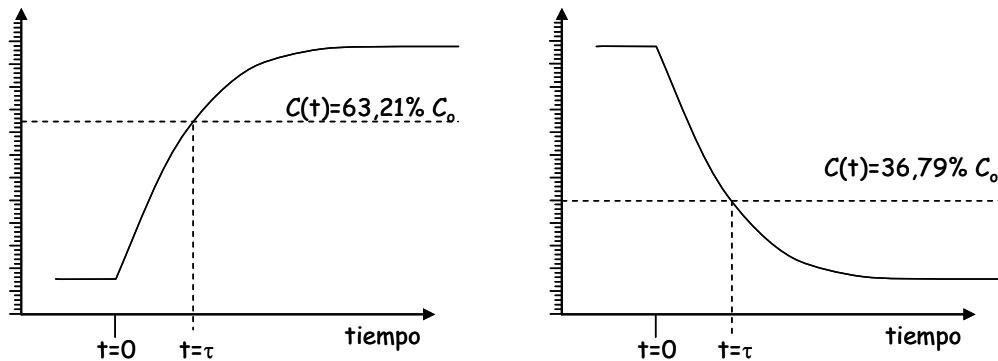
En la figura 7.41 se puede evaluar, de un modo cualitativo, la influencia en la señal del volumen aspirado a caudal constante. Cuanto mayor es el volumen aspirado mayor es la altura de pico y también su amplitud. Se observa también que el tiempo de salida del pico está relacionado directamente con el caudal y coincide para todos los volúmenes en función de éste.

Con los datos obtenidos y utilizando la función de error de la ecuación 7.6 se puede realizar la predicción de la respuesta frente al tiempo (figura 7.42). Se observa, no obstante, que la respuesta del modelo no describe el comportamiento de los picos reales, los picos modelados predicen un comportamiento “gaussiano” que no se asemeja al comportamiento real.



**Figura 7.42** Ajuste con funciones de error calculado con las difusividades estimadas a partir de los resultados experimentales obtenidos en cada una de las condiciones estudiadas.

Observando el tipo de respuesta experimental, un retraso al inicio del pico y un pico puntiagudo se puede pensar que el comportamiento sería una cámara de mezcla (RCTA) con un retraso (RFP). Para poder realizar este tipo de ajuste es necesario estimar el grado de contribución de cada reactor, el tiempo de residencia y de retraso en la salida de la respuesta. Para modelizar el sistema se considerará que el volumen del sistema está repartido en dos reactores un RCTA o cámara de mezcla completa y un RFP ideal que equivale a un retraso en la salida. La introducción de una muestra es considerada como un pulso de volumen conocido.



**Figura 7.43** Respuesta a un escalón positivo (a) y negativo (b) en la entrada de un RCTA.

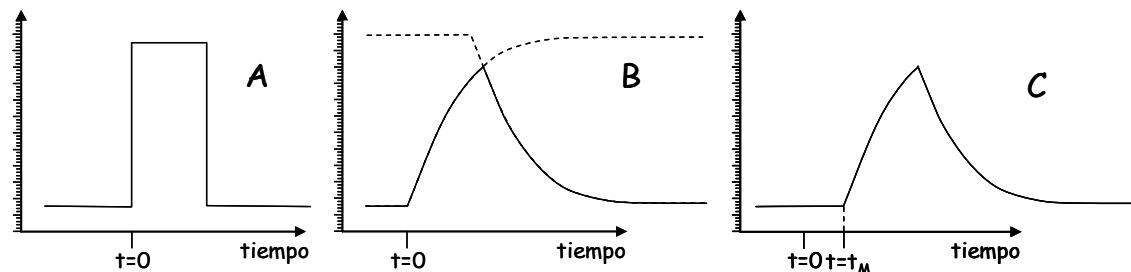
La respuesta de un RCTA a un escalón positivo (figura 7.43a) es:

$$\frac{C(t)}{C_o} = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \tau = \frac{V}{Q} \quad \text{ecuación 7.15}$$

La respuesta de un RCTA a un escalón negativo (figura 7.43b) es:

$$\frac{C(t)}{C_o} = e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \tau = \frac{V}{Q} \quad \text{ecuación 7.16}$$

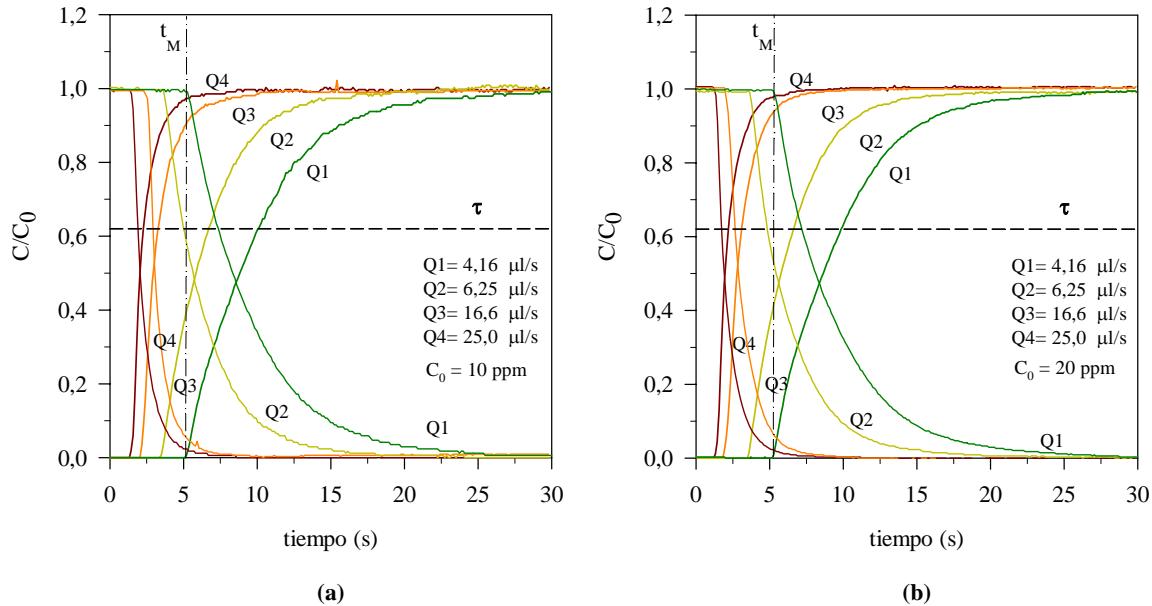
La respuesta a un pulso (figura 7.44 A) es la combinación de un escalón positivo y otro negativo (figura 7.44 B), la solución matemática está descrita en las ecuaciones 7.9 y 7.10. Finalmente, en la figura 7.44 C se observa la respuesta considerando un retraso atribuido al reactor de flujo pistón (ecuación 7.11).



**Figura 7.44** Pulso (A), respuesta de un RCTA (B) y respuesta de una combinación de RCTA y RFP “retraso  $t_M$ ” combinados.

El tiempo de residencia  $\tau$  se puede calcular tanto para el escalón de subida como para el de bajada. Cuando se considera la subida,  $\tau$  corresponde a una variación en la señal inicial del 63,21%. Por tanto, gráficamente puede calcularse como el tiempo en que la respuesta llega a este valor. Como se está trabajando con absorbancias normalizadas, el valor de  $\tau$  se obtendrá para cada caudal como el tiempo en que el escalón asume un valor de 0,6321. El tiempo muerto ( $t_M$ ) se calcula también gráficamente como el tiempo que transcurre desde que comienza el pulso ( $t_0$ ) hasta que  $C/C_0$  es mayor que cero. Se han estimado los valores

$\tau$  y  $t_M$  para ambas concentraciones obteniéndose los mismos valores. A título de ejemplo en la figura 7.45 se muestra señalizada la línea de corte donde el valor de  $C/C_0 = 0,63$  y el valor del  $t_M$  para el caudal mayor. Se han incluido las figuras para las dos concentraciones.



**Figura 7.45** Estimación de  $t$  para las dos concentraciones en todas las condiciones estudiadas. (a) 10 ppm y (b) 20 ppm.

En la tabla 7.8 se detallan los resultados obtenidos en la estimación de  $\tau$  y  $t_M$  para el escalón de subida para las dos concentraciones y todos los caudales. Con el valor de  $\tau$  y  $t_M$  puede calcularse el volumen de cada uno de los reactores y, a partir de estos, calcular la contribución de cada uno de ellos.

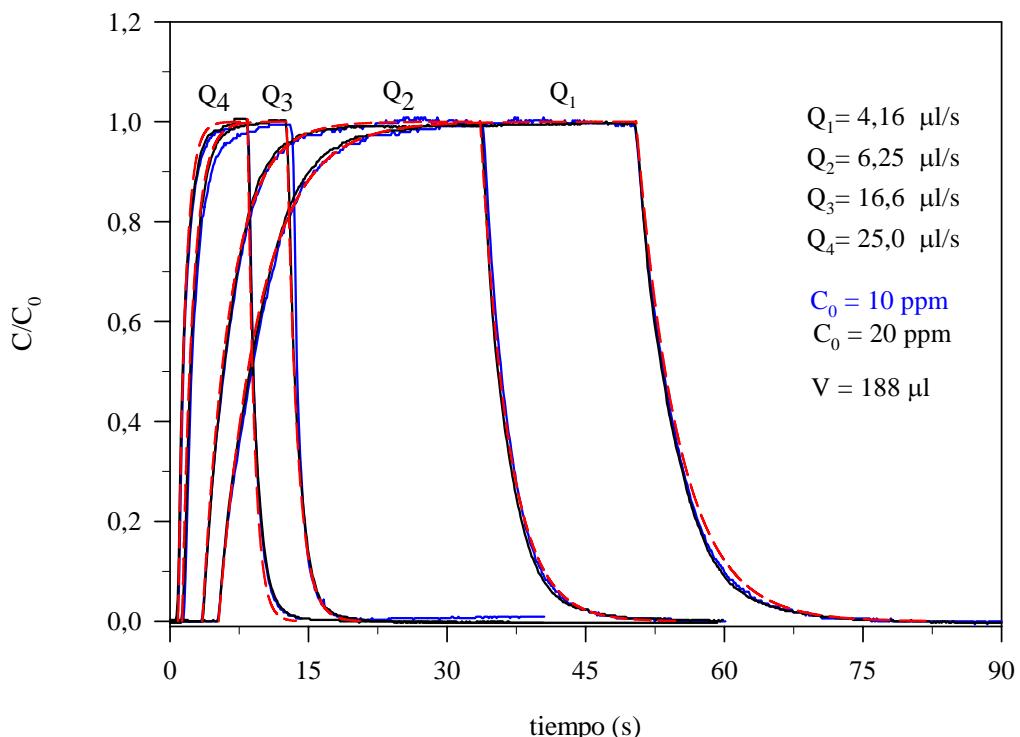
**Tabla 7.8** Resultados de  $t_M$  y  $\tau$ , para la estimación del modelo.

| <b>Q (μl/s)</b> | <b><math>C_0 = 10 \text{ ppm}</math></b> |                            | <b><math>C_0 = 20 \text{ ppm}</math></b> |                            | <b><math>C_0 = 10 \text{ ppm}</math></b> |                              | <b><math>C_0 = 20 \text{ ppm}</math></b> |                              |
|-----------------|--|----------------------------|--|----------------------------|--|------------------------------|--|------------------------------|
|                 | <b><math>t_M \text{ (s)}</math></b>      | <b><math>V_{FP}</math></b> | <b><math>t_M \text{ (s)}</math></b>      | <b><math>V_{FP}</math></b> | <b><math>\tau \text{ (s)}</math></b>     | <b><math>V_{RCTA}</math></b> | <b><math>\tau \text{ (s)}</math></b>     | <b><math>V_{RCTA}</math></b> |
| Q1 4,16         | 5,12                                     | 21,3                       | 5,12                                     | 21,3                       | 4,98                                     | 20,7                         | 4,98                                     | 20,7                         |
| Q2 6,25         | 3,6                                      | 22,5                       | 3,6                                      | 22,5                       | 3,18                                     | 19,9                         | 3,02                                     | 18,9                         |
| Q3 16,6         | 2,05                                     | 34,0                       | 1,85                                     | 30,7                       | 1,32                                     | 21,9                         | 1,28                                     | 21,2                         |
| Q4 25,0         | 1,07                                     | 26,8                       | 1,07                                     | 26,8                       | 1,07                                     | 26,8                         | 0,95                                     | 23,8                         |
| media           |  | 26,15                      |  | 25,32                      |  | 22,35                        |  | 21,15                        |
| media Q1 Q2     |  | 21,9                       |  | 21,9                       |  | 20,3                         |  | 19,8                         |

Considerando que, en el caso de los caudales altos, el error por la imprecisión en la lectura de la gráfica es elevado, se han utilizado los datos de la media de las dos concentraciones para los dos caudales bajos. Por tanto, el volumen medio obtenido para el RCTA es de 20,15  $\mu\text{l}$  y el de FP 21,9  $\mu\text{l}$ . El volumen total del microsistema calculado por el modelo es de 42,05  $\mu\text{l}$  considerando el microchip y el efecto de las conexiones.

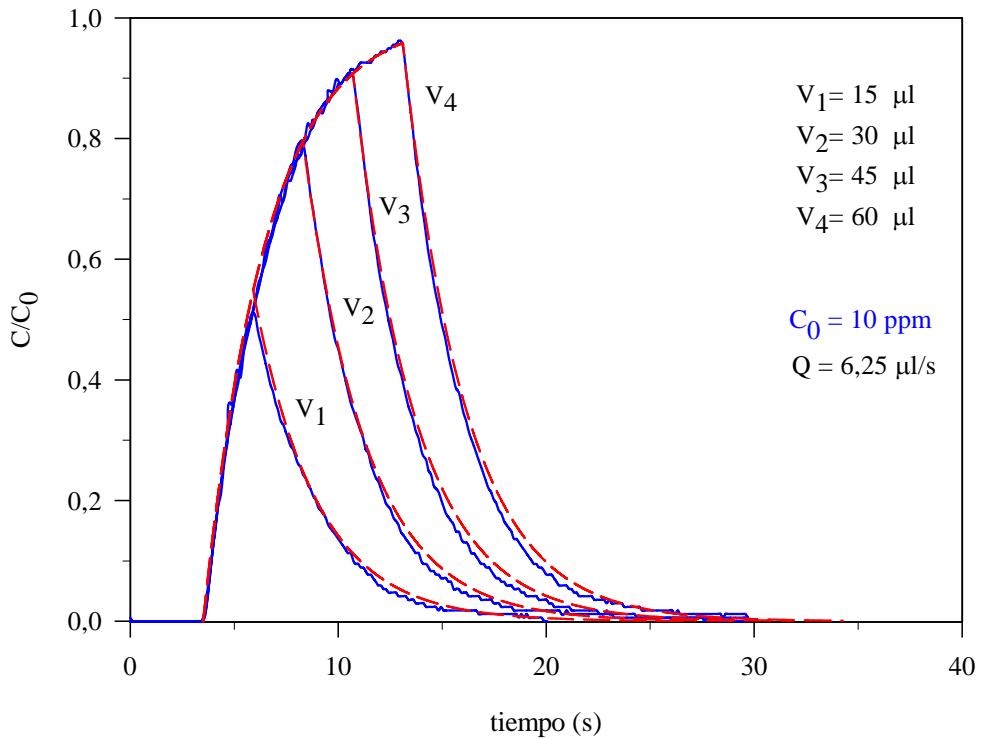
Finalmente, el modelo propuesto de una combinación de RCTA y un RFP, ecuaciones 7.9 7.10 y 7.11, se ha utilizado para describir la respuesta del sistema en las diferentes condiciones estudiadas. A continuación y para verificar las predicciones del modelo, se detallan, de un modo resumido, los resultados obtenidos con el ajuste realizado.

En la figura 7.46 se muestran los resultados normalizados obtenidos para un volumen grande, un pulso de 188  $\mu\text{l}$  de 10 y 20 ppm de ion nitrito. Los valores de absorbancia están normalizados para ambas concentraciones y por lo tanto coinciden. La línea discontinua en rojo corresponde al modelo propuesto. Se puede comprobar que el modelo se ajusta perfectamente en las 8 determinaciones.

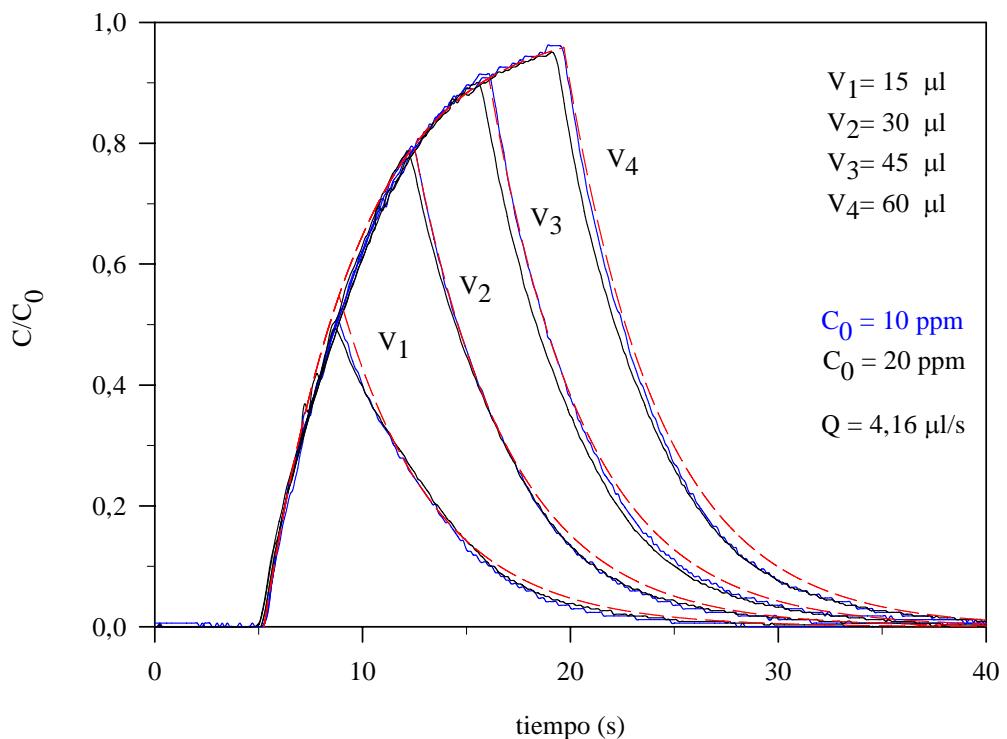


**Figura 7.46** Ajuste del modelo para una DTR de las dos concentraciones a todos los caudales estudiados para un volumen de 188  $\mu\text{l}$ .

En la figura 7.47 se muestra el efecto del volumen de inyección para una concentración de 10 ppm a un caudal de 6,25  $\mu\text{l/s}$ . Se puede observar que el modelo predice exactamente el comportamiento del microsistema en función del volumen. La predicción de la subida del pico es perfecta y sólo se produce ligero desajuste en la cola del pico aunque no es significativo.



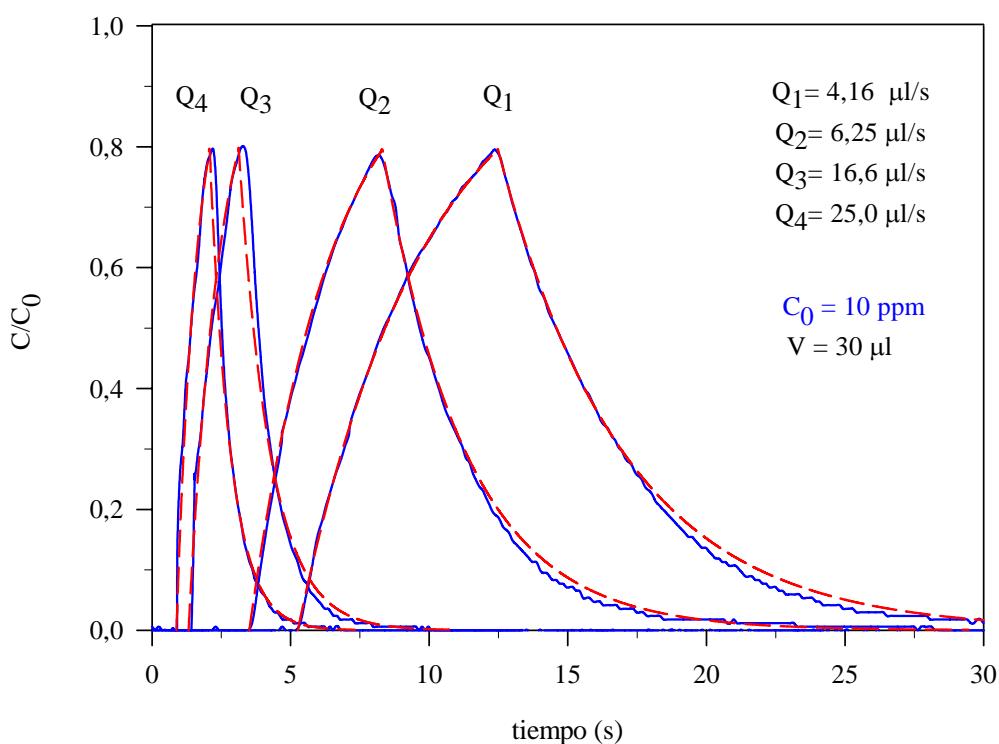
**Figura 7.47** Efecto del volumen para la concentración de 10 ppm a caudal constante de 6,25  $\mu\text{l/s}$ .



**Figura 7.48** Efecto de la concentración a volumen variable y caudal constante de 4,16  $\mu\text{l/s}$ .

En la figura 7.48 se muestra la influencia de la concentración en la respuesta. En este caso, el caudal es el menor de todos los estudiados. Se puede observar que la respuesta obtenida es independiente de la concentración ya que los valores obtenidos de  $C/C_0$  coinciden en ambas concentraciones. Consecuentemente, el fenómeno de transporte de materia principal en el microsistema es la dispersión, pudiéndose considerar despreciable la difusión.

En la figura 7.49 se ha válido el modelo propuesto para describir la influencia del caudal en la respuesta. Se ha considerado únicamente uno de los volúmenes estudiados, 30  $\mu\text{l}$ , y se ha estudiado la respuesta obtenida en función del caudal. Se puede observar que, en este caso, el modelo se ajusta bien salvo la forma de la cola del pico.



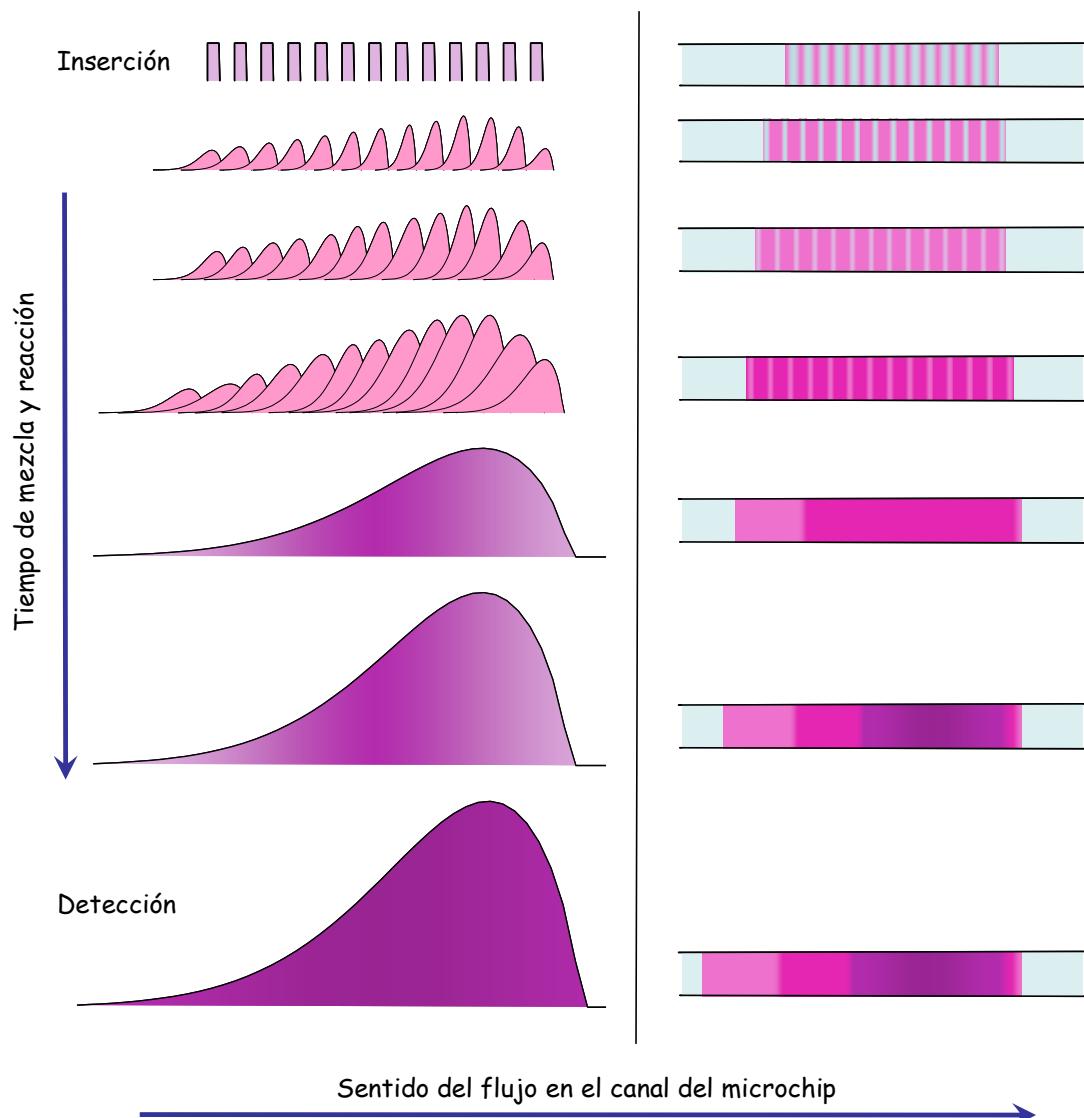
**Figura 7.49** Efecto del caudal para un volumen constante de 30  $\mu\text{l}$  y una concentración de 10 ppm.

Se puede concluir que el modelo descrito permite ajustar y predecir perfectamente la respuesta obtenida en las distintas condiciones experimentales estudiadas. En estudios posteriores, que ya no son objeto de esta tesis, se modelizará la respuesta obtenida cuando la reacción química se realiza en modo continuo en el microchip.

## 7.6 Estudio de la reacción en línea en el microchip

El objetivo principal de esta parte de la tesis es el estudio de la respuesta del sistema cuando existe reacción química utilizando la reacción modelo de ion nitrito. Se ha estudiado la influencia del caudal, el volumen aspirado y la relación de muestra/reactivo en la señal aprovechando la posibilidad de conmutación de las válvulas.

Como se ha descrito en el apartado anterior, el modelo ajustado se corresponde con el comportamiento de un RCTA con retraso, por tanto se comporta como un reactor ideal y se puede predecir que el comportamiento en los estudios con reacción química será el mismo y se conseguirá el grado de mezcla necesario. Con el objeto de favorecer el grado de reacción se ha optado por aprovechar la posibilidad de oscilación de las válvulas a una frecuencia alta. En la figura 7.50 se muestra un esquema del efecto de la conmutación en la secuencia aspirada de patrón y reactivo. Si la aspiración se hace conmutada se consigue una interpenetración mayor de todos los segmentos en que se divide un mismo volumen y por tanto se mejorará el nivel de respuesta. Se ha detallado la evolución de los frentes de reacción desde el momento de la aspiración conmutada hasta el momento de la detección. La reacción está favorecida por el gradiente de concentración y la propia difusión debida al desplazamiento de la secuencia.



**Figura 7.50** Resultado de la conmutación de las válvulas de entrada de reactivo y muestra a el microchip.

La optimización se ha dividido en dos partes, la primera ha consistido en la definición de las variables susceptibles de optimización y la segunda en el estudio concreto de estas variables. El microchip utilizado en este apartado es idéntico al utilizado en el estudio anterior e incorpora cuatro canales y una celda de detección. El modo de operación ha sido similar pero en este caso se ha utilizado como portador el mismo reactivo aspirado a través del canal 4 mediante la apertura de la válvula 5. El patrón ha sido aspirado por el canal 3 mediante la apertura de la válvula 4. Se ha optado por esta configuración más sencilla para utilizar el mismo microchip que en los estudios previos.

Inicialmente se ha determinado la frecuencia de oscilación mínima de las válvulas. Este estudio se ha realizado mediante aspiración de durante 20 s de una solución de colorante azoico correspondiente a una solución de 10 ppm de ion nitrito a un caudal de 4,166  $\mu$ l/s. Las relaciones de muestra/reactivo estudiadas han sido: 500/500, 200/200, 150/150 y 100/100 ms. Se ha verificado que tiempos de oscilación menores de 150 ms no son repetitivos y, por tanto, será éste el tiempo mínimo de oscilación estudiado.

Una vez definido el tiempo mínimo de oscilación de las válvulas, las variables a optimizar éstas son el tiempo de aspiración, el tiempo de conmutación y el caudal. El volumen útil del microreactor está fijado por el microchip seleccionado y es un variable que se ha mantenido constante en esta aplicación.

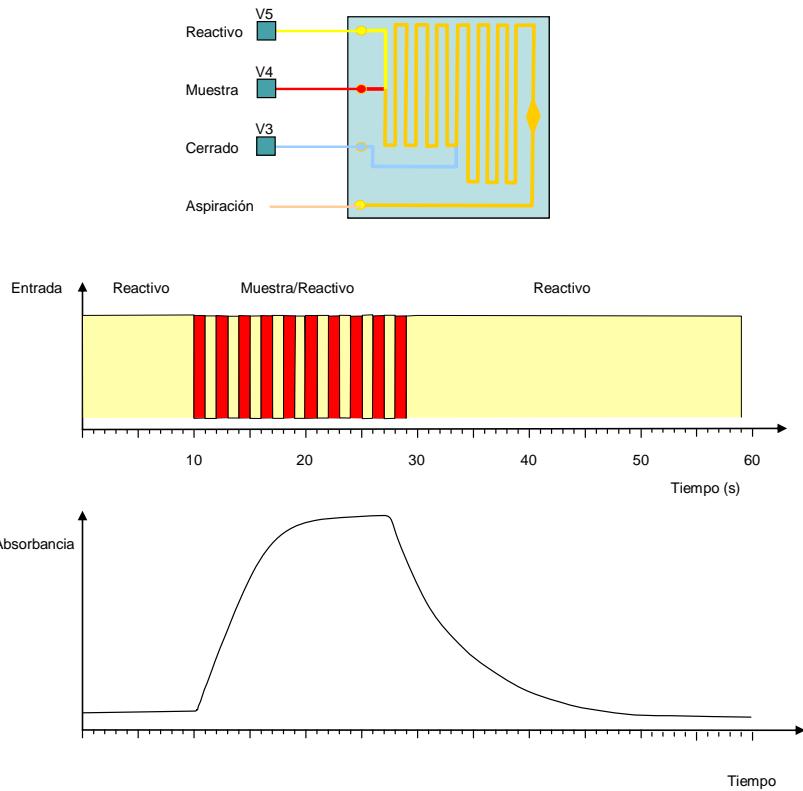
### 7.6.1 Estudio de variables

En primer lugar se realizó un calibrado en línea orientativo para verificar que el grado de conmutación de las válvulas es idóneo para obtener un buen grado de mezcla y reacción y, determinar el tipo de respuesta obtenido. Las condiciones de operación se muestran resumidas en la tabla 7.9, donde también se detalla el objetivo de cada una de las secuencias parciales. El caudal de operación ha sido de 4,16  $\mu$ l/s. Siempre se ha trabajado en modo aspiración desde el puerto 1 del microchip.

**Tabla 7.9** Condiciones utilizadas para el primer calibrado en línea.

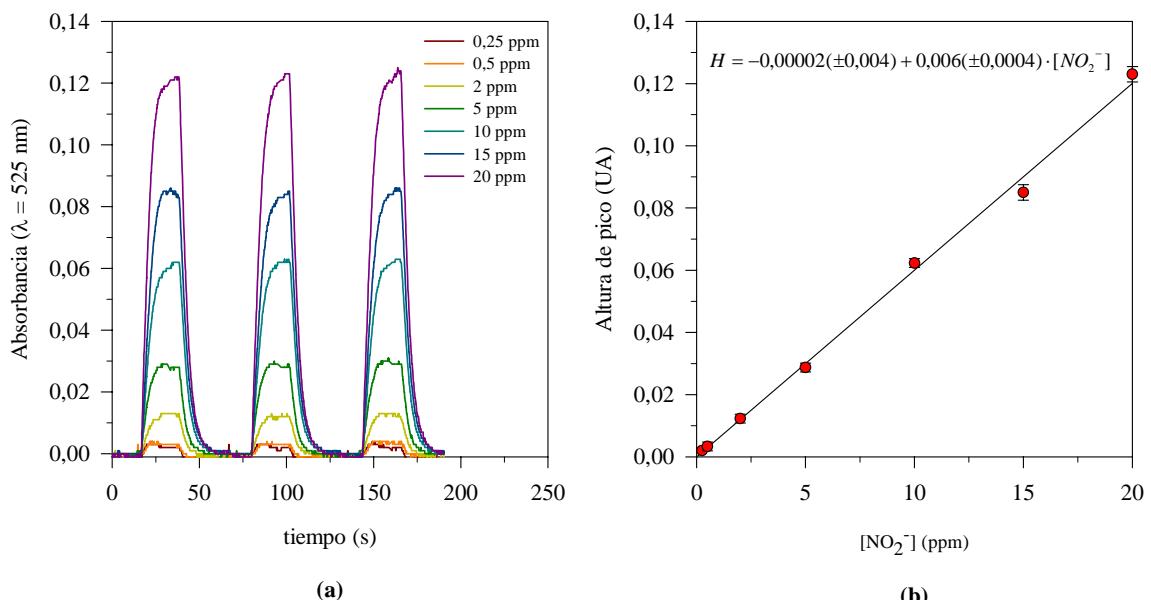
| Secuencia del procedimiento   | Objetivo  |
|---|---|
| <b>1<sup>a</sup> secuencia:</b> 10s aspiración de reactivo por el C4 con V5 abierta   | estabilización línea base   |
| <b>2<sup>a</sup> secuencia:</b> 20s aspiración de muestra y reactivo, oscilación de apertura V4(C3-patrón) y V5(C4-reactivo) de 200/200ms | generación de la señal analítica por reacción de la muestra con el reactivo |
| <b>3<sup>a</sup> secuencia:</b> 30s aspiración de reactivo por el C4 con V5 abierta   | salida por el detector de todo el producto retenido en el microchip         |
| <b>4<sup>a</sup> secuencia:</b> 60s de impulsión, V5 y V4 cerradas  | vaciado de la jeringa para un nuevo análisis                                |

En la figura 7.51 se muestra un esquema del procedimiento seguido en este calibrado y el tipo de respuesta obtenida.



**Figura 7.51** Esquema del microchip utilizado, donde se han señalado los canales de entrada de reactivo y muestra. A continuación el segmento de patrón y reactivo obtenido durante 20s de aspiración, con una frecuencia de conmutación de las válvulas de 200/ 200ms. Finalmente, la respuesta obtenida.

En la figura 7.52 se muestra el resultado obtenido en este primer calibrado efectuado, realizado en las condiciones resumidas en la tabla 7.9.

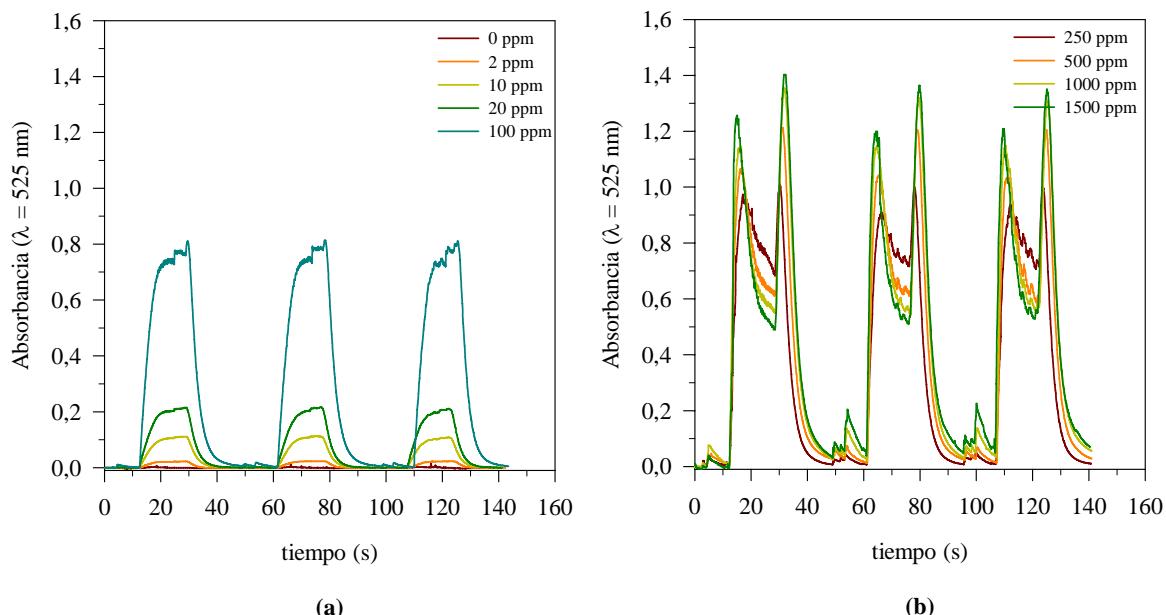


**Figura 7.52** Primer calibrado en línea efectuado en el microchip. El volumen total aspirado de muestra/reactivo es de 80,32  $\mu$ l y el caudal de operación 4,16  $\mu$ l/s.

El resultado obtenido permite comprobar que el grado de mezcla conseguido en el microsistema en las condiciones estudiadas es adecuado, ya que se han obtenido picos no distorsionados. En todo el intervalo de concentraciones estudiado, la respuesta del sistema es lineal. Así mismo, la forma de los picos es igual a la obtenida en los estudios sin reacción química.

Para comprobar la influencia de la proporción muestra-reactivo sobre la reacción se modificó ésta cambiando la frecuencia de oscilación de las válvulas. Las relaciones de patrón/reactivo estudiadas han sido 200/200 ms, 400/200 ms y 200/400 ms. Estas experiencias, se realizaron a dos caudales (2,08 y 4,16  $\mu\text{l/s}$ ) manteniendo constante el tiempo de aspiración. En todos los casos, se utilizó un patrón de 10 ppm de ion nitrito. En los dos caudales las mayores respuestas se han obtenido para la relación 400/200 ms. Comparando los resultados a diferentes caudales se observan señales mayores para el caudal de 4,16  $\mu\text{l/s}$ . Esto es debido al incremento de la dispersión del producto a caudales bajos.

La aplicación final del sistema propuesto es el análisis de muestras reales procedentes de un EDAR con concentraciones de ion nitrito entre 0-1500 ppm. Con el objetivo de definir el intervalo de respuesta lineal se ha realizado un calibrado que abarca todo este intervalo. En este estudio se fijó un caudal de 4,16  $\mu\text{l/s}$  con un tiempo de aspiración de 20 s. En la figura 7.53 se muestran los resultados obtenidos. La respuesta es lineal hasta 100 ppm a partir de esta concentración se obtienen picos dobles y distorsionados. Esta respuesta está asociada con un defecto de reactivo en la parte central debido a la alta concentración de ion nitrito en el patrón.



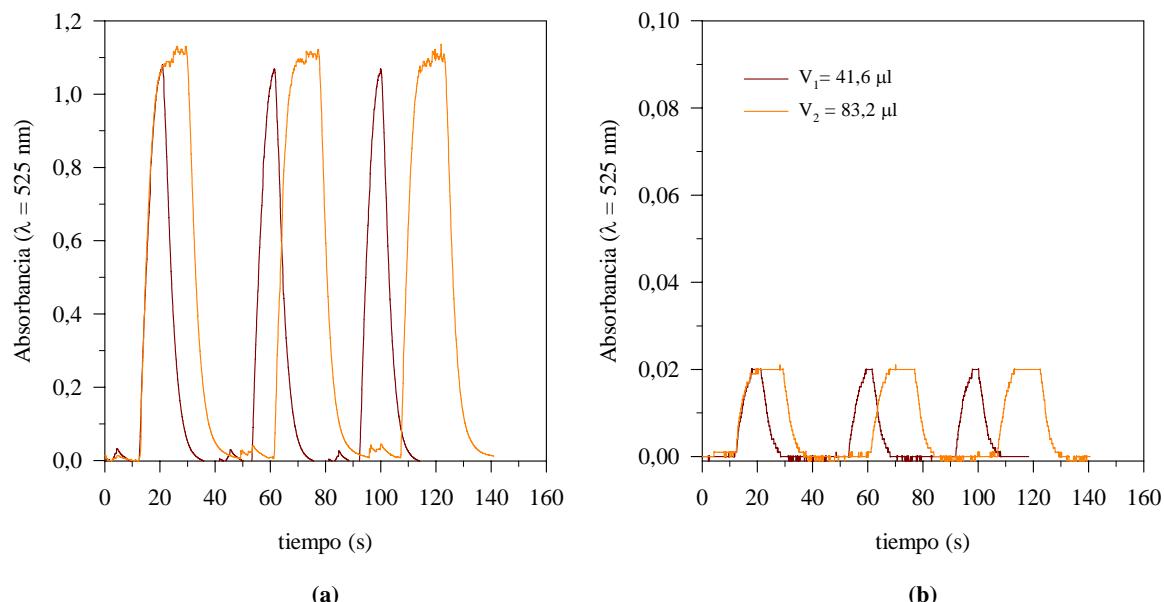
**Figura 7.53** Estudio de la respuesta en función de la concentración de ion nitrito. (a) Concentraciones de ion nitrito entre 0-100 ppm, (b) concentraciones superiores a 250 ppm.

En estas condiciones sólo se ha obtenido respuesta lineal hasta 100 ppm. La sensibilidad obtenida para las concentraciones entre 0-100 ppm es de  $0,0078(\pm 0,0009)$  UA·ppm<sup>-1</sup>, superior a la obtenida en el calibrado para 20 s de aspiración y una secuencia de 200/200ms. De estas experiencias se deduce que las variables críticas a optimizar serán el caudal y el intervalo de oscilación de las válvulas, ya que son las que influyen más significativamente en la respuesta. Con el objeto de encontrar una relación óptima de conmutación para cada intervalo de concentración de ion nitrito se procedió a realizar un estudio más riguroso del efecto de ambas variables sobre la señal.

### 7.6.2 Optimización

Inicialmente se ha estudiado la influencia del volumen total de muestra/reactivo. Se ha de establecer un compromiso entre señal mínima, asociada a un volumen mínimo, y la aparición de dobles picos debidos a un defecto de reactivo en la zona central de la muestra.

Se ha estudiado, para diferentes concentraciones, el efecto del volumen aspirado en la respuesta. El caudal se ha mantenido constante e igual a 4,16  $\mu\text{l/s}$  y la secuencia de oscilación se ha fijado en 200/200 ms. El intervalo de volúmenes estudiado ha estado comprendido entre 41,6-166,4  $\mu\text{l}$ . Las concentraciones analizadas han sido 0, 0,2, 2 y 250 ppm. Para volúmenes mayores de 84  $\mu\text{l}$  se ha obtenido saturación de la respuesta. Este hecho resulta más evidente cuanto mayor es la concentración analizada. Se ha fijado por lo tanto un volumen óptimo de 41,6  $\mu\text{l}$  que en el caudal de operación fijado supone un tiempo de aspiración de 10 s. En la figura 7.54 se muestra la respuesta obtenida para las concentraciones de 250 ppm y 2 ppm.

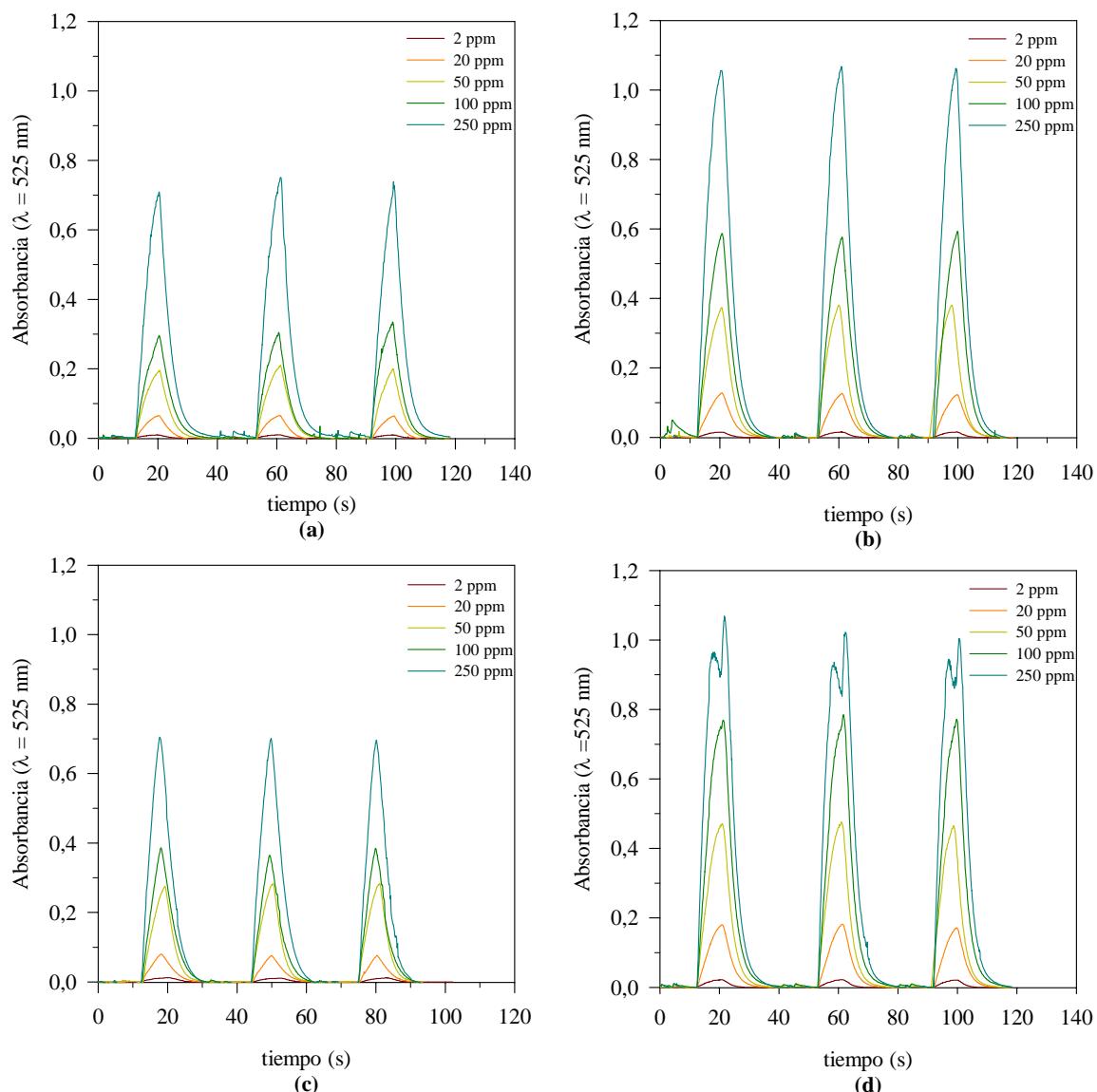


**Figura 7.54** Respuesta obtenida para 10 y 20 s de aspiración a un caudal de 4,16  $\mu\text{l/s}$  y dos concentraciones. (a) 250 ppm y (b) 2 ppm.

Una vez fijado el volumen óptimo se ha estudiado la influencia del caudal y la frecuencia de comutación de las válvulas. El intervalo de concentraciones evaluado está comprendido entre 0-500 ppm y las frecuencias de comutación son cuatro. En la tabla 7.10 se resumen las 48 condiciones estudiadas. Todas las experiencias se han realizado por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 7.55 y 7.56 agrupados en función del caudal.

**Tabla 7.10** Condiciones estudiadas en la optimización del sistema.

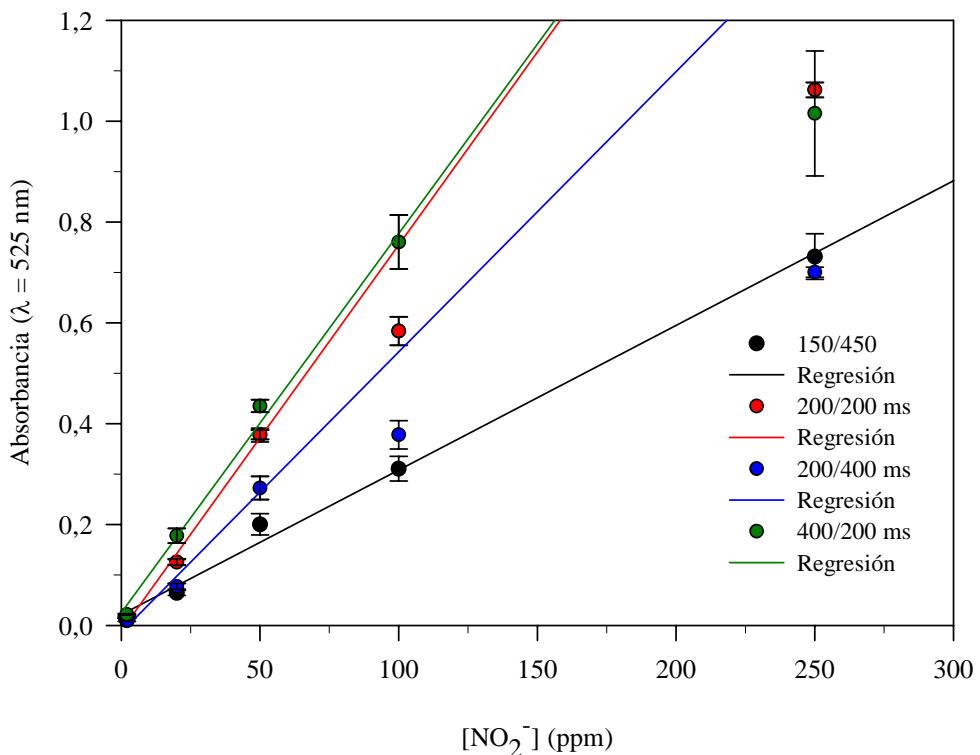
|                                |         |                   |
|--------------------------------|---------|-------------------|
| Caudal ( $\mu\text{l/s}$ )     | 4,16    | 6,25              |
| Secuencia muestra/reactivo(ms) | 150/450 | 200/200           |
| Concentración (ppm)            | 2       | 20 50 100 250 500 |



**Figura 7.55** Resultados obtenidos para un caudal de 4,16 ml/s a distintas frecuencias de conmutación. (a) 150/450 ms, (b) 200/200 ms, (c) 200/400 ms y (d) 400/200 ms.

En la figura 7.55 se puede observar que para un mismo volumen total aspirado la respuesta varía en función de la relación de volúmenes de patrón/reactivo. Se puede comprobar que, para volúmenes menores de patrón en relación con los de reactivo, las alturas de pico son menores (a, c) debido a un defecto de muestra. Cuando el volumen de muestra es superior al de reactivo (d) se observa un pico distorsionado que indica que en la parte central de los segmentos de patrón y reactivo existe defecto de este último. Para la relación de 200/200ms (b) se obtiene una respuesta mayor que para ninguna otra relación hasta 250 ppm. En todas las condiciones ensayadas, la concentración de 500 ppm ha dado picos dobles y distorsionados. Por tanto, se ha omitido su representación.

En la figura 7.56 se muestra la correlación respecto a la concentración obtenida en para cada relación estudiada a un caudal de 4,16  $\mu\text{l/s}$ .

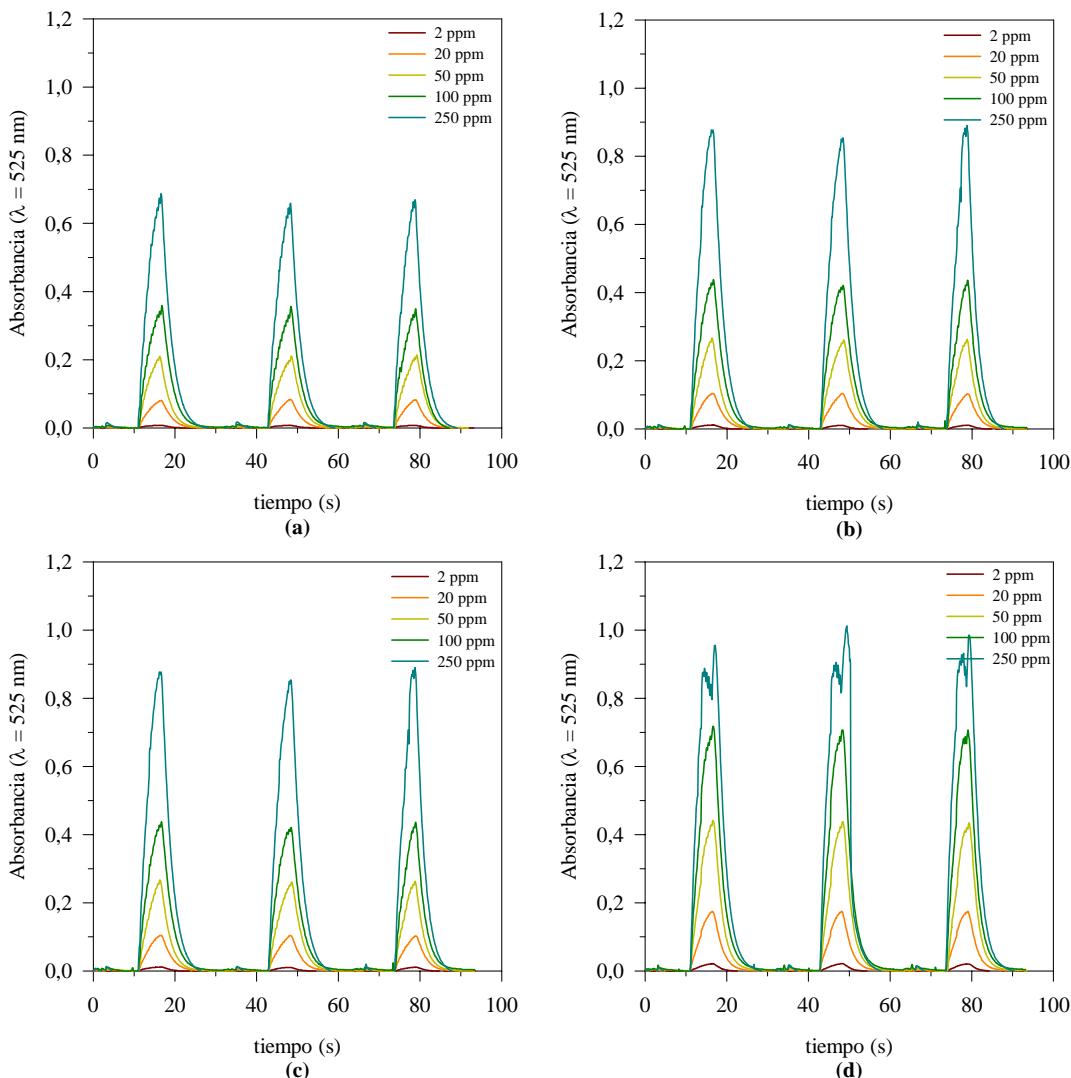


**Figura 7.56** Rectas de calibración correspondientes a cada una de los tiempos de comutación estudiados para un caudal de 4,16  $\mu\text{l/s}$ .

El mayor intervalo de linealidad se ha obtenido para las relaciones de tiempo de oscilación de 150/450 ms y 400/200 ms. Las otras dos relaciones solo son lineales hasta 50 ppm. La sensibilidad obtenida es diferente para cada relación, por tanto cada una de estas condiciones es idónea para analizar ion nitrito en distintos intervalos de concentración.

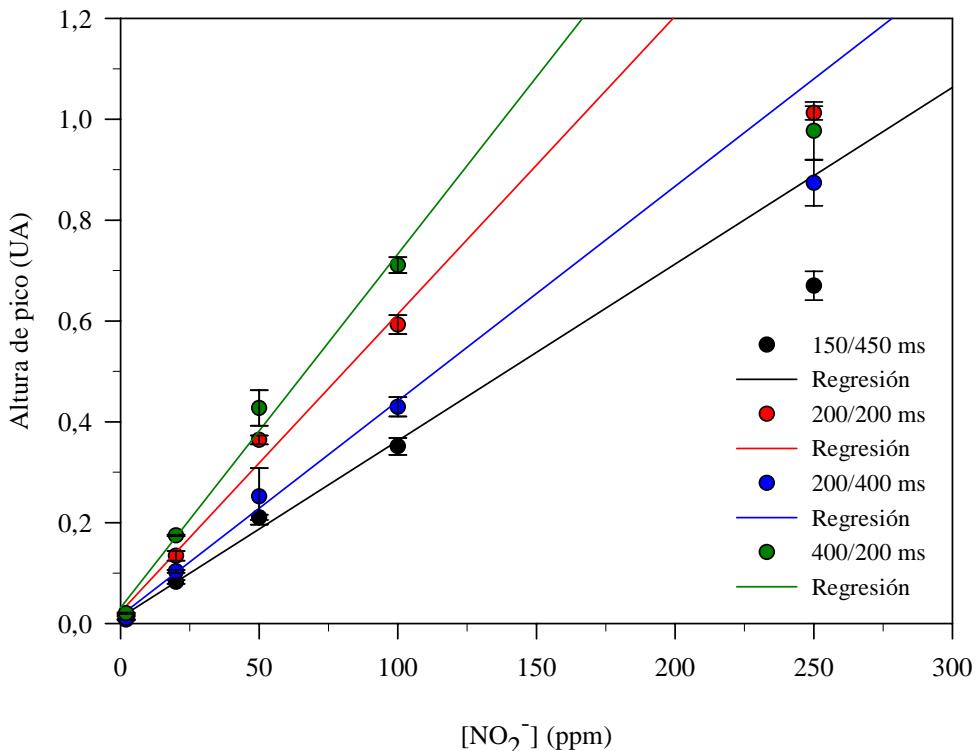
En la figura 7.57 se muestran los resultados obtenidos para los mismos tiempos de comutación a un caudal de 6,26  $\mu\text{l/s}$ . Se ha obtenido el mismo tipo de respuesta en función de la frecuencia de comutación, pero comparativamente una menor altura de pico.

Esto es debido a un menor tiempo de reacción (a, b, d). Sólo para una relación de 200/400ms se ha obtenido mayor respuesta (c) a este caudal, respecto al de 4,16  $\mu$ l/s. Esto es debido al incremento de la dispersión provocado por un mayor tiempo de residencia.



**Figura 7.57** Resultados obtenidos para un caudal de 6,25  $\mu$ l/s a distintas frecuencias de comutación. (a) 150/450 ms, (b) 200/200 ms, (c) 200/400 ms y (d) 400/200 ms.

En la figura 7.58 se muestran las rectas de regresión obtenidas para los calibrados efectuados a un caudal de 6,25  $\mu$ l/s. En todos los casos se obtiene respuesta lineal hasta 100 ppm. Para las relaciones de 150/450 ms y 200/400 ms se ha obtenido menor sensibilidad debido al defecto de patrón respecto al reactivo. En la relación 200/200 ms y 400/200 ms se ha obtenido una mayor sensibilidad pero una peor correlación.



**Figura 7.58** Rectas de calibración correspondientes a cada una de los tiempos de conmutación estudiadas para un caudal de 6,25  $\mu\text{l/s}$ .

Finalmente, se concluye que el caudal de 4,16  $\mu\text{l/s}$  es el adecuado porque al aumentar el tiempo de reacción se han obtenido mayores alturas de pico. Las relaciones escogidas como óptimas son 150/450 ms y 400/200 ms. La primera relación permite analizar un intervalo lineal más amplio de concentraciones y la segunda permite obtener un menor límite de detección.

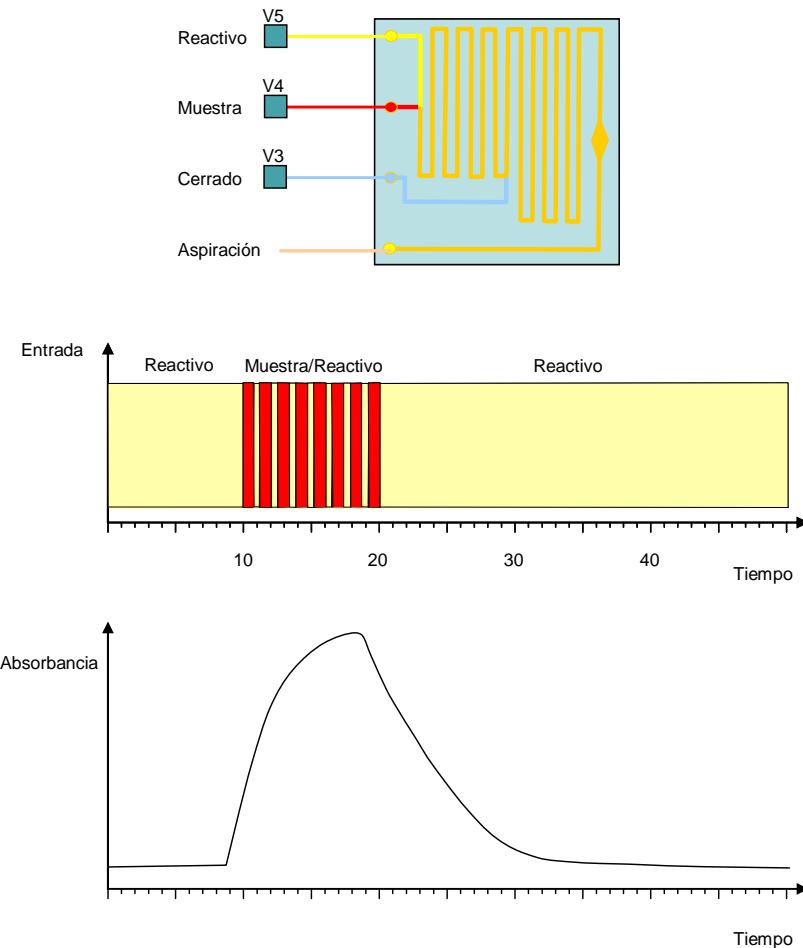
## 7.7 Análisis de muestras reales

Las muestras reales presentan una amplio intervalo de concentración de ion nitrito, están comprendidas entre 0-1500 ppm. Son muestras procedentes de un estudio cinético de inhibición llevado a cabo en una EDAR piloto. Éstas han sido tomadas directamente de la planta piloto y después filtradas con un filtro de 0,45 micras.

### 7.7.1 Condiciones

El amplio intervalo de concentración en que se encuentran las muestras ha hecho necesaria la dilución de éstas para adaptar la concentración al intervalo de respuesta lineal de los calibrados. La relación 400/200 ms responde linealmente hasta una concentración de 50 ppm de  $\text{NO}_2^-$  y la relación 150/450 ms hasta 250 ppm de  $\text{NO}_2^-$ . Todas las muestras se han analizado por triplicado en las dos condiciones previamente seleccionadas (§ 7.6.2). En ambas se ha mantenido constante el caudal, a 4,166  $\mu\text{l/s}$ , y el tiempo de aspiración total de

la secuencia muestra/reactivo. La única diferencia ha sido la relación de tiempos en que se aspira muestra o reactivo. El tiempo de aspiración de reactivo antes del análisis y después del análisis también ha sido igual para las dos relaciones. El procedimiento utilizado es igual al mostrado en la tabla 7.9, adaptándose la secuencia 2 para cada una de las relaciones de conmutación estudiadas.

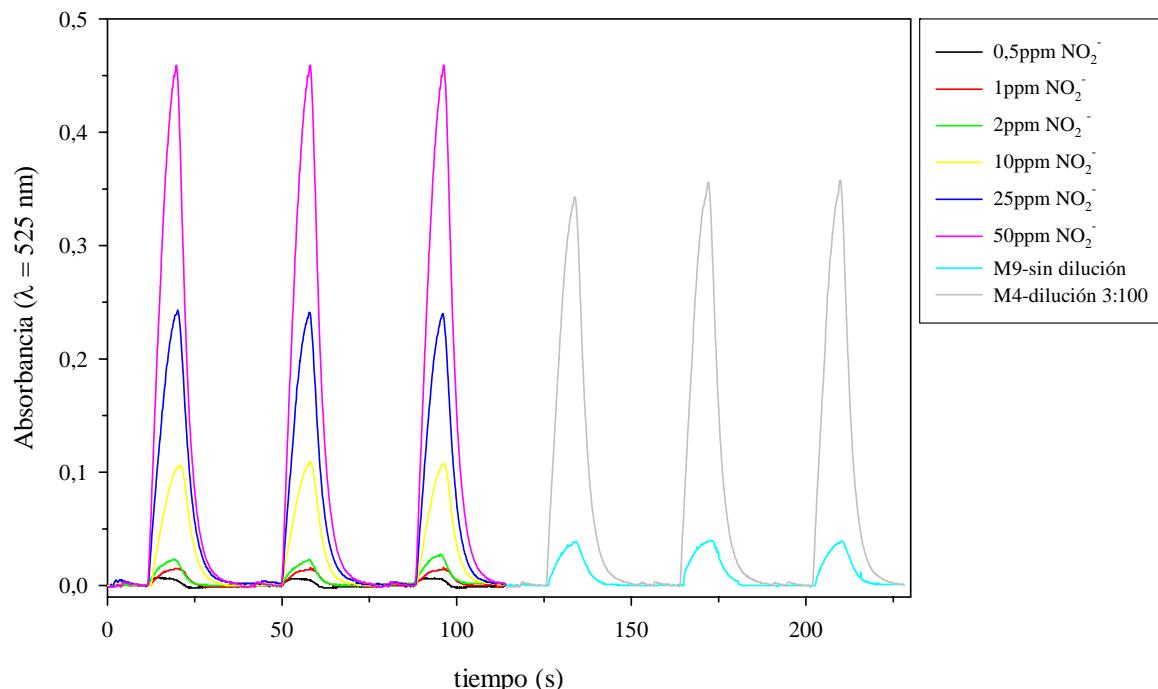


**Figura 7.59** Esquema del microchip utilizado, donde se han señalado los canales de entrada de reactivo y muestra. A continuación el segmento de patrón y reactivo obtenido durante 10s de aspiración, con una frecuencia de conmutación de las válvulas de 400/200ms. Finalmente, la respuesta obtenida.

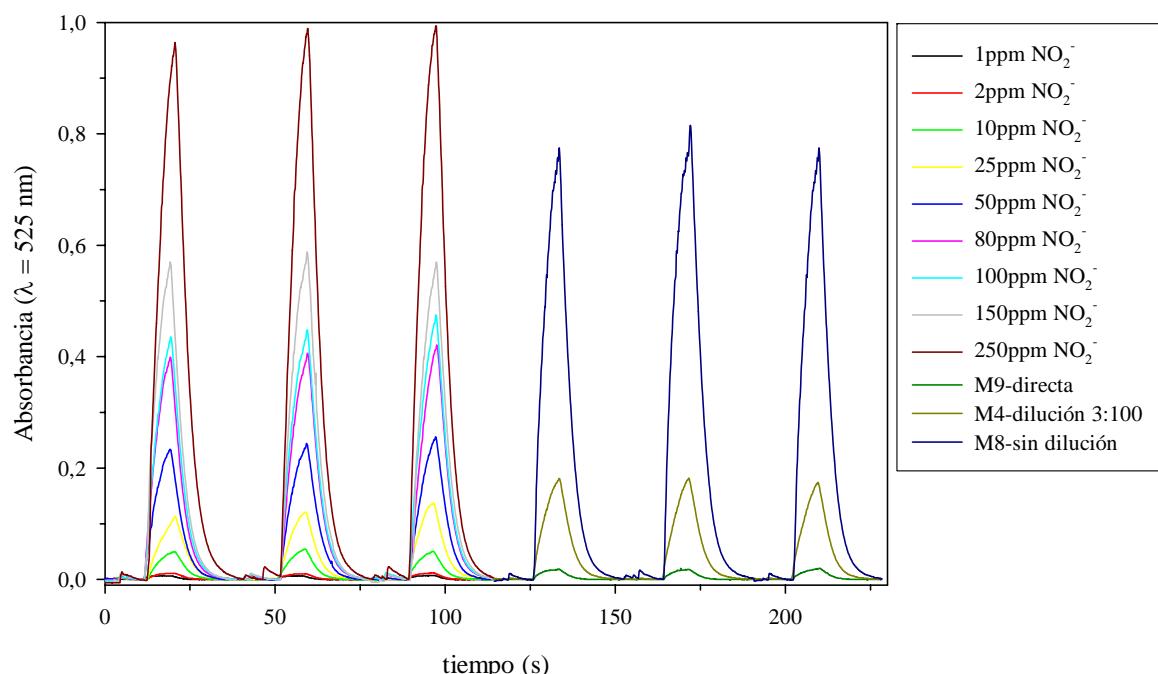
En la figura 7.59 se muestra un ejemplo gráfico que ilustra todas las etapas del análisis y la respuesta obtenida en función del tiempo. La única diferencia entre las dos condiciones se da en la 2<sup>a</sup> secuencia, cuando se aspira secuencialmente en fracciones de tiempo mínimo y reproducible, muestra y reactivo por las válvulas 4 y 5. Las frecuencias de oscilación son 400ms muestra y 200ms reactivo; 150ms muestra y 450ms reactivo. Todos los otros tiempos son constantes. El segmento de muestra/reactivo mostrado en la figura 7.59 corresponde a la frecuencia de oscilación 400/200 ms. Puede observarse que en este caso la forma del pico es distinta a la obtenida para la relación 200/200 ms (figura 7.51), debido a la reducción de tiempo de aspiración.

### 7.7.2 Resultados

En la figura 7.60 se muestra el calibrado efectuado para la 1<sup>a</sup> relación muestra/reactivo: 400/200 ms. Para esta relación la respuesta es lineal hasta 50ppm. En la figura 7.61 aparece el resultado obtenido para la 2<sup>a</sup> relación muestra/reactivo: 150/450 ms. En estas condiciones la respuesta es lineal hasta 250 ppm.



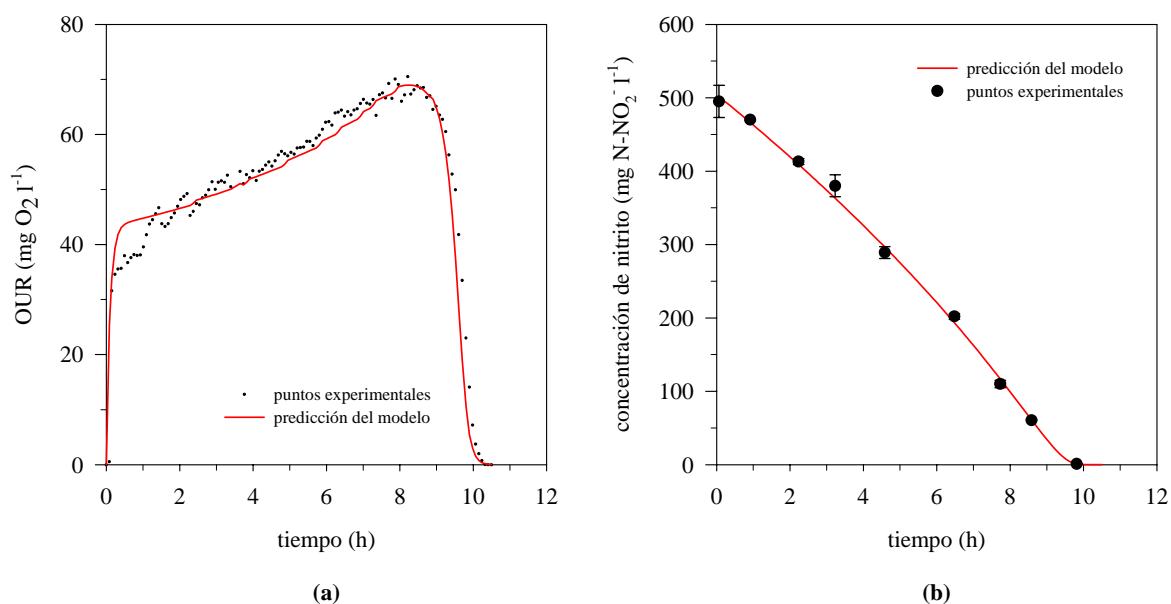
**Figura 7.60** Registro del calibrado y las señales correspondientes a las muestras M9 y M4 obtenidas para la frecuencia de oscilación 400/200 ms.



**Figura 7.61** Registro del calibrado y las señales correspondientes a las muestras M9, M4 y M8 obtenidos para la frecuencia de oscilación 150/450 ms.

Todas las muestras se han analizado en las dos condiciones operacionales del sistema. A título de ejemplo en las figuras 7.60 y 7.61 se muestran los registros correspondientes a las muestras 9, 4(dilución 3:100) y, 9, 4(dilución 3:100) y 8. Todas las muestras provenientes de la EDAR han sido analizadas en las dos condiciones operacionales del sistema.

Como se ha comentado antes, las muestras proceden de una planta piloto de tratamiento de aguas residuales (EDAR), donde se ha estudiado la cinética de degradación inhibitoria de ion nitrito después de realizar un pulso de 500 ppm de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (1643 ppm NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). En este estudio se ha monitorizado la variación de [O<sub>2</sub>] para estimar la velocidad de consumo (OUR), así como la degradación de ion nitrito en función del tiempo. Con la información obtenida se ha desarrollado un modelo de inhibición respecto a ion nitrito [Carrera, 2004]. En la figura 7.62 se muestran los resultados experimentales obtenidos y el modelo estimado.



**Figura 7.62** Resultados obtenidos durante la monitorización de OUR e ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, en el experimento de inhibición enzimática y modelo propuesto. (a) Velocidad de consumo de O<sub>2</sub>, (b) análisis de ion nitrito.

En la tabla 7.11 se recogen los resultados obtenidos para las muestras analizadas en las dos condiciones operacionales ensayadas. Se puede observar que entre ellos existen diferencias en términos de precisión. Los resultados obtenidos para la frecuencia 400/200 ms son más precisos que los de la frecuencia 150/450 ms. Esta diferencia puede explicarse debido a la menor repetitividad obtenida para tiempos de apertura de las válvulas menores de 200 ms de operación (§ 7.6.1).

**Tabla 7. 11** Resultados obtenidos en ambas condiciones de calibración y análisis. El error asociado ha sido estimado como el intervalo de confianza con un nivel del 95%. Donde  $I_{n-1}^{95\%} = s_{n-1} \cdot t_{n-1} / n^{1/2}$  y  $n=3$ .

| Muestra | $[NO_2^-]$ (ppm) $\pm I_{n-1}^{95\%}$ | $[NO_2^-]$ (ppm) $\pm I_{n-1}^{95\%}$ |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|         | <i>frecuencia 400/200 ms</i>          | <i>frecuencia 150/450 ms</i>          |
| M1      | 1626 $\pm$ 72                         | 1543 $\pm$ 43                         |
| M2      | 1545 $\pm$ 5                          | 1484 $\pm$ 37                         |
| M3      | 1357 $\pm$ 13                         | 1359 $\pm$ 87                         |
| M4      | 1249 $\pm$ 51                         | 1273 $\pm$ 18                         |
| M5      | 1058 $\pm$ 13                         | 950 $\pm$ 27                          |
| M6      | 664 $\pm$ 14                          | 677 $\pm$ 40                          |
| M7      | 363 $\pm$ 15                          | 313 $\pm$ 65                          |
| M8      | 199 $\pm$ 3                           | 195 $\pm$ 7                           |
| M9      | 3,54 $\pm$ 0,16                       | 2,8 $\pm$ 0,4                         |

### 7.7.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en ambas condiciones se han comparado mediante dos criterios estadísticos: la prueba **t** por parejas y la comparación de métodos por regresión lineal [Miller y Miller, 1993].

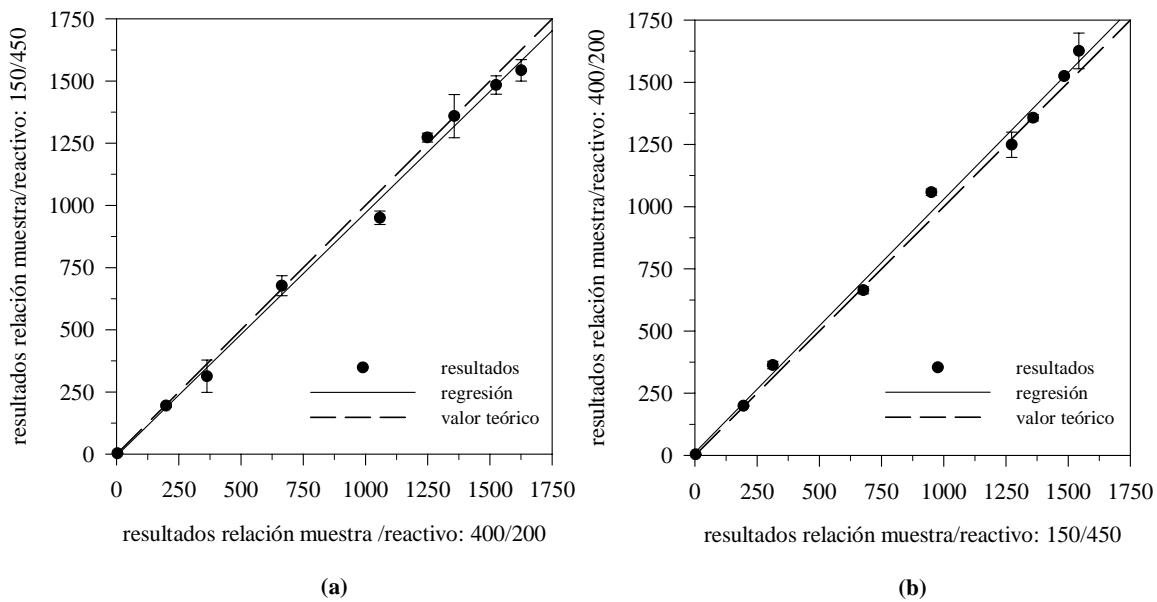
Se ha aplicado la prueba **t** por parejas a las diferencias de las concentraciones obtenidas en ambas relaciones. Siendo  $t = x_d (n)^{1/2} / s_d$ , se obtiene un valor de  $t_{cal}=1,89$ . El valor crítico de  $t_{tab}$  para  $n-1$  grados de libertad es 2,31 para un nivel de confianza del 95%. Como el valor calculado es menor que éste, se acepta la hipótesis de que los resultados obtenidos en ambas condiciones no son significativamente diferentes para las concentraciones medias de ion nitrito determinadas.

Cómo en este caso el intervalo de aplicación es muy amplio la suposición de que cualquier error aleatorio o sistemático es independiente de la concentración no tiene porque ser del todo cierta. Así el método más idóneo es la comparación mediante la regresión lineal. Se calcula la ordenada en el origen y la pendiente por regresión directa e inversa de los valores obtenidos frente a los de referencia así como, sus intervalos con el 95% de confianza. En la situación ideal, la ordenada es igual al valor teórico de 0,0 y la pendiente junto con el coeficiente de correlación al valor teórico de 1,0. Desviaciones de estos valores teóricos evidencian diferentes tipos de errores.

Es necesario recordar ciertas suposiciones implícitas en toda la regresión lineal como son: la independencia de los residuales y su distribución normal, la existencia de una relación lineal entre las variables, el error de la variable independiente (abscisa) es insignificante

frente al valor de la variable en ordenadas que es constante, es decir no varía con la concentración y que todos los datos provienen de una misma población.

Los resultados correspondientes a las 9 muestras analizadas (tabla 7.11) para las dos condiciones, se encuentran representados en la figura 7.63. Los valores de comparación obtenidos se resumen en la tabla 7.12.



**Figura 7.63** Comparación de las dos relaciones ensayadas. a) Regresión directa considerando los resultados sin error para 400/200 ms y b) regresión inversa considerando sin error los resultados para 150/450 ms.

De los resultados obtenidos se desprende que la pendiente y la ordenada en el origen no difieren en forma significativa de los valores teóricos de 1 y 0 respectivamente, y por lo tanto no existen diferencias significativas entre las dos series de resultados y por tanto son aceptables con un grado de significación del 95%.

**Tabla 7.12** Resultado de la comparación por regresión lineal de los resultados obtenidos para ambas relaciones de muestra/reactivo.

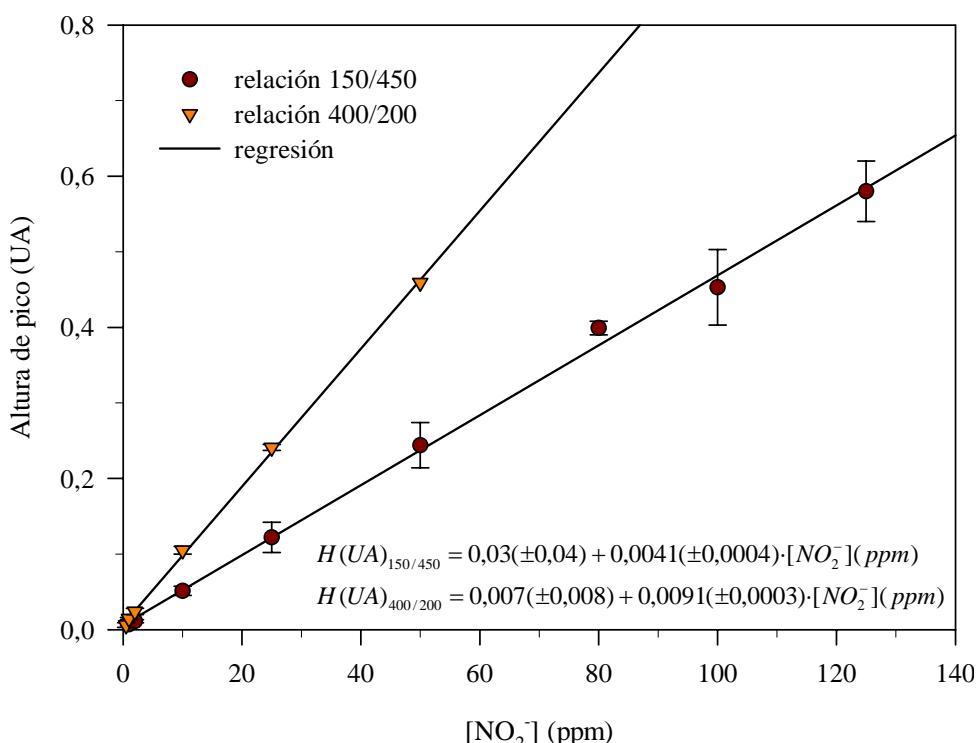
| Método estadístico                                | Valor de los parámetros<br>(95%)                      | ¿Diferencias significativas<br>con el 95% de confianza? |
|---|---|---|
| Regresión directa<br>150/450 ms frente 400/200 ms | $a=-5 \pm 68$<br>$b=0,98 \pm 0,06$<br>$r=0,997$ (n=9) | no  |
| Regresión inversa<br>400/200 ms frente 150/450 ms | $a=10 \pm 69$<br>$b=1,02 \pm 0,07$<br>$r=0,997$ (n=9) | no  |
| Prueba $t$ para muestras por<br>parejas           | $t_{cal}=1,89$ ; $t_{tab}=2,31$ ; $t_{cal} < t_{tab}$ | no  |

### 7.7.4 Caracterización del microsistema

La caracterización del microsistema desarrollado ha consistido en determinar el límite de detección para las dos frecuencias de oscilación 400/200 ms y 150/450 ms, y en evaluar la repetitividad.

#### Limite de detección

El límite de detección ha sido calculado como establece la IUPAC (§ 3.3.1.1). Se ha estimando la mínima señal detectable a partir de la media de una serie de blancos y su desviación estándar. Se han determinado en un calibrado tipo, las respuestas obtenidas para 10 blancos con agua desionizada. A continuación, se ha calculado la señal mínima detectable como  $Señal_{LD} = S_b + k \cdot s_b$  y, después sustituyendo este valor en la recta de calibración se ha determinado la concentración mínima detectable. Hay que destacar que en las dos condiciones estudiadas no ha sido evidente el problema del efecto Schlieren observado en los sistemas anteriores (r-FIA y SIA). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7.13. Puede comprobarse, que sorprendentemente, el límite de detección no aumenta mucho (sólo una década) respecto al sistema SIA con espectrofotómetro (§ 5.5.4). En éste el límite de detección es 0,40 ppm. En la figura 7.64 se muestran dos rectas de calibración obtenidas en cada una de las frecuencias de conmutación usadas.



**Figura 7.64** Rectas de calibración obtenidas para las dos frecuencias de oscilación M/R en el microsistema.

## **Repetitividad**

La repetitividad ha sido estimada mediante la desviación estándar relativa obtenida para la media de diez valores correspondientes a la muestra *M8*, analizada en las dos frecuencias de oscilación. Los resultados se recogen en la tabla 7.13. Se puede comprobar que la repetitividad del sistema es aceptable, ya que en ningún caso se han obtenido valores de RSD grandes. Aunque, la frecuencia de oscilación 400/200 ms es la más repetitiva. Esta diferencia está asociada con el error en la apertura y cierre de las válvulas.

En la tabla 7.13 se resumen otras características del sistema propuesto como la frecuencia de análisis, sensibilidad y, el consumo de muestra y reactivo para las dos frecuencias de oscilación estudiadas.

**Tabla 7.13** Principales características del microsistema desarrollado para las dos relaciones estudiadas.

| Parámetro                                  | Frecuencia 400/200 ms   | Frecuencia 150/450 ms   |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Sensibilidad (UA/ppm)                      | 0,0091 ( $\pm 0,0003$ ) | 0,0041 ( $\pm 0,0004$ ) |
| r / n                                      | 0,995 / 6               | 0,995 / 9               |
| Límite de detección (ppm)                  | 0,17                    | 0,34                    |
| Intervalo lineal (ppm)                     | 0-50                    | 0-250                   |
| Repetitividad (RSD(%); n=10)               | 0,44                    | 2,80                    |
| Consumo M/R ( $\mu$ l)                     | 13,8 / 27,7             | 10,4 / 31,2             |
| Frecuencia de análisis ( $\text{h}^{-1}$ ) | 35                      | 35                      |

En general se obtiene una sensibilidad baja (0,0091 UA/ppm), aproximadamente un orden de magnitud inferior que la obtenida en el sistema SIA con detección convencional (0,100 UA/ppm). Por otro lado, el límite de detección en el microsistema (0,17 ppm) es inferior pero del mismo orden de magnitud que el del sistema SIA (0,4 ppm). Finalmente, es destacable el incremento del intervalo lineal del microsistema (0-50 ppm) frente al sistema SIA desarrollado (0-20 ppm).

## **7.8 Conclusiones**

Con los resultados obtenidos hasta el momento, se puede demostrar que, sin necesidad de conseguir un grado de miniaturización total, es posible acceder ya a un conjunto importante de ventajas derivadas de la asociación simbiótica del concepto de miniaturización e integración. En este sentido se ha demostrado la viabilidad y la funcionalidad del sistema híbrido desarrollado.

Se ha implementado con éxito la infraestructura necesaria para realizar determinaciones espectrofotométricas en un sistema microfluídico. Obteniéndose resultados comparables a los microsistemas con detección óptica referenciados en la bibliografía (§ 1.5.2).

Se ha podido establecer un modelo satisfactorio del comportamiento del microchip en proceso de difusión sin reacción química. Este modelo describe la respuesta del microchip como un RCTA con retardo de un flujo pistón. La validez del modelo propuesto ha quedado demostrada ya que permite predecir con toda exactitud los resultados experimentales.

Los resultados obtenidos en los estudios con reacción química en línea han sido muy satisfactorios. La integración de la capacidad de conmutación de las válvulas junto con el comportamiento del microchip como reactor ha permitido obtener un grado de mezcla adecuado para el desarrollo de la reacción química y, por tanto, la obtención de la respuesta en un tiempo mínimo. Además se ha conseguido eliminar el efecto Schlieren (§ 1.3.1) que no ha sido evidente en ninguna de las condiciones estudiadas.

Se ha optimizado el sistema para trabajar en un amplio intervalo de concentraciones y la sensibilidad obtenida ha permitido el análisis de muestras reales con una alta concentración de ion nitrito. Sorprendentemente, la sensibilidad sólo disminuye en un orden de magnitud (11 veces) respecto al sistema SIA, mientras el camino óptico se reduce 50 veces. Por otro lado, el límite de detección es inferior que el del sistema SIA, siendo comparable al obtenido en otros microsistemas referenciados en la bibliografía [Rainelli et al., 2003].

Las muestras han sido analizadas para dos relaciones de conmutación diferentes obteniéndose resultados comparables y que no difieren significativamente. Por otro lado, los resultados obtenidos se ajustan perfectamente con el modelo de predicción planteado a partir de los consumos de oxígeno en la EDAR.

Se puede concluir que el sistema desarrollado ha quedado bien establecido, y puede utilizarse para cualquier otro tipo de aplicación con detección espectrofotométrica. Además los buenos resultados obtenidos en las muestras reales abren un amplio abanico de posibilidades para la utilización del sistema desarrollado, como equipos automatizados de análisis en medidas en línea.

## 7.9 Bibliografía

- Aref, H.** "Chaotic advection of fluid particles", *Philos. Trns. R. Soc. London A, Mathematical and Physical Sciences*, **333**, 273-288, (1990).
- Aref, H.** "The development of chaotic advection", *Physics of Fluids*, **14** (4), 1315-1325, (2002).
- Bate, H.; Rowlands, S.; Sirs, J.A.** "Influence of diffusion on dispersion of indicators in blood flor", *Journal of Applied Physiology*, **34**, 866-872, (1973).
- Baucells, J.; Montserrat, J.; Sáenz, C.; Errachid, A.; Baeza, M.; Alonso, J.** "Microflow systems for chemical analysis", 3<sup>a</sup> Conferencia de Dispositivos Electrónicos (CDE), Granada, 15-16/02/01, 113-116, (2001).
- Beebe, D. J.; Adrian, R. J.; Olsen, M. G.; Stremler, M. A.; Aref, H.; Jo, B-H.** "Passive mixing in microchannels: fabrication and flow experiments", *Journal of Mechanics and Industry*, **2**, 343-348, (2001).
- Bessoth, F. G.; deMello, A. J.; Manz, A.** "Microstructure for efficient continuous flow mixing", *Analytical Communications*, **36**, 213-215, (1999).
- Böhm, S.; Greiner, K.; Schlautmann, S.; de Vries, S.; van den Berg, A.** "A rapid vortex micromixer for studying highspeed chemical reactions". In: J.M. Ramsey, A. van den Berg (eds.); *Micro Total Analysis Systems 2001, Proceedings of the µTAS 2001 Symposium*, Monterey, CA, USA, October 21-25, 2001. Uitgave: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 25-27.
- Bühler, B.; Fröhlich, D.; Haake, H.M.; Brecht, A.; Gauglitz, G.**, "Structure and characterization of a micro flow system for the study of modulated concentrations", *Trends in Analytical Chemistry*, **20**, 4, 186-194, (2001).
- Carrera, J. ; Gabriel, D. ; Vicent, T. ; Lafuente, J.**, "Modeling the nitrification process considering the inhibition by Free Ammonia and Free Nitrous Acid", *Water Research* (in press, 2004).
- Culbertson, C.T.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M.**, "Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices", *Talanta*, **56**, 365-373, (2002).
- DeLon Hull, R.; Malick, R.E.; Dorsey, J.G.**, "Dispersion phenomena in flow-injection systems", *Analytica Chimica Acta*, **267**, 1-24, (1992).
- Denninger, M.; Mogensen, K.B.; Geschke, O.; Friis, P.; Telleman, P.; Kutter, J.P.** "Absorbance Detection in Microsystems: Microcuvette and Waveguide Approach"; *Poster presentation*, Eurosensors XIV, Copenhagen, Denmark, August 27-30, (2000).
- Ehrfeld, W.; Golbig, K.; Hessel, V.; Löwe, H.; Richter, T.** "Characterization of mixing in micromixers by a test reaction: single mixing units and mixer arrays", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **38**, 1075-1082, (1999).
- Ehrfeld, W.; Hessel, V.; Löwe, H.** "Microreactors - New technology for modern chemistry". Ed. Willey – VCH, (2000).
- Erickson, D.; Li, D.** "Integrated microfluidic devices", *Analytica Chimica Acta*, **507** (1), 11-26, (2004).
- Evans, J.; Liepmann, D.; Pisano, A. P.** "Planar laminar mixer", *Proceedings IEEE MEMS Workshop*, Nagoya, Japan, 96-101, (1997).
- Fountain, G. O; Khakhar, D. V.; Ottino, J.M.** "Visualization of Three-Dimensional Chaos", *Science*, **281**, 683-686, (1998).

- Gawron, Andrew J.; Martin, R. Scott; Lunte, Susan M.** "Microchip electrophoretic separation systems for biomedical and pharmaceutical analysis", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **14** (1), 1-12 (2001).
- Gill, W.N.; Ananthakrishnan, V.; Nunge, R.J.** "Dispersion in developing velocity fields", *AICHE J.*, **14**, 939-946, (1968).
- Gravesen, P.; Branebjerg, J.; Jensen, O. S.** "Microfluidics-A review", *Journal Micromechanical Microengineering*, **3**, 168-182, (1993).
- Horvai, G.; Pungor, E.**, "Theoretical backgrounds of flow analysis", *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **17**, 2, 231-264, (1986).
- <http://www.c2v.nl> consultada en febrero de 2004
- Kamholz, A. E.; Schilling, E. A.; Yager, P.** "Optical measurement of transverse molecular diffusion in a microchannel", *Biophysical Journal*, **80**, 1967-1972 (2001).
- Kolev, S.D.**, "Mathematical modelling of flow-injection systems", *Analytica Chimica Acta*, **308**, 36-66, (1995).
- Levenspiel, O.**, "The Chemical Reactor Ommibook", OSU Book Stores, Corvallis, OR, (1979).
- Li, J.; Ananthasuresh, G.K.** "Three-dimensional low-temperature co-fired ceramic shells for miniature systems applications". *Journal of micromechanics and microengineering*, **12**, 198-203, (2002).
- Liu, R. H.; Stremler, M. A.; Sharp, K. V.; Olsen, M. G.; Santiago, J. G.; Adrian, R. J.; Aref, H.; Beebe, D. J.** "Passive mixing in a three-dimensional serpentine microchannel", *Journal of Microelectromechanical Systems*, **9**, 190-197, (2000).
- Manz, A.; Eijkel, J. C. T.** "Miniaturization and chip technology. What can we expect?", *Pure and Applied Chemistry*, **73** (10), 1555–1561, (2001).
- Mengeaud, V.; Josserand, J.; Girault, H.H.** "Mixing processes in a zigzag microchannel: finite element simulations and optical study", *Analytical Chemistry*, **74**, 4279-4286, (2002).
- Merlos, A.; Acero, M. ; Bao, M.H.; Bausells, J.; Esteve, J.** "TMAH:IPA anisotropic etching characteristics". *Sensors & Actuators A*, **37-38**, 737-743, (1993).
- Miller, J.C.; Miller, J.N.** "Estadística para Química Analítica". E.d. Addison-Wesley Iberoamerican, S .A., Wilmington, (1993).
- Miyake, R.; Lammerink, T.S.J.; Elwenspoek, M.; Fluitman, J.H.J.** "Micro mixer with fast diffusion", in Micro Electro Mechanical Systems, *IEEE-MEMS'93*, Fort Lauderdale, 248-253, (1993).
- Montesinos, J.L.; Alonso, J.; del Valle, M.; Lima, J.L.F.C.; Poch, M.** "Mathematical modelling of two-analyte sequential determinations by flow-injection sandwich techniques", *Analytica Chimica Acta*, **254**, 177-187, (1991).
- Munson, M.S.; Yager, P.** "Simple quantitative optical method for monitoring the extent of mixing applied to a novel microfluidic mixer", *Analytica Chimica Acta*, **507** (1), 63-71 , (2004).
- Ottino, J. M.; Leong, C. W.; Rising, H.; Swanson, P.D.** "Morphological Structures Produced by Mixing in Chaotic Flows", *Nature*, **333**, 419-425, (1988).
- Patalay, K.** "Desing of micromixers for chaotic advection", Report of the ME579W Project, Purdue University, West Lafayette, IN, (2002).
- Polson, N.; Hayes, M.** "Microfluidics controlling fluids in small places". *Analytical Chemistry*, **73**, 313A-319A, (2001).

- Rainelli, A.; Stratz, R.; Schweizer, K.; Hauser, Peter C.** “Miniature flow-injection analysis manifold created by micromilling”, *Talanta*, **61** (5), 659-665, (2003).
- Reyes, D.R.; Iossifidis, D.; Aurooux, P.A.; Manz, A.** “Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology”, *Analytical Chemistry*, **74** (12), 2623-2636, (2002).
- Sequeira, M.; Bowden, M.; Minogue, E.; Diamond, D.** “Towards autonomous environmental monitoring systems”. *Talanta*, **56**, 355-363, (2002a).
- Shoji, S.** “Micro total analysis system ( $\mu$ TAS)”. *Electronics and Communications in Japan, Part 2*, **82** (2), 21-29, (1999).
- Taylor, G.**, *Proceedings of the Royal Society of London, Serie A*, **225**, 473, (1953).
- Terry, S. C.; Harman, J. H.; Agnelli, J. B.** “A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer”, *IEEE Trans. Electron Devices*, **26**, 1880-1886, (1979).
- Tice, J.D.; Lyon, A.D.; Ismagilov, R.F.** “Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels”, *Analytica Chimica Acta*, **507** (1), 73-77, (2004).
- van Akker, E.B.; Bos, M.; van del Linden, W.E.**, “Convection and difusión in a micro-flow injection system”, *Analytica Chimica Acta*, **373**, 227-239, (1998).
- van Lintel, H. T. V., van de Pol, F. C. M., Bouwstra, S.** “Piezoelctric micropump based on micromachining of silicon”. *Sensors & Actuators*, **15**, 153-167, (1988).
- Zagatto, E. A. G.; Reis, B. F.; Oliveira, C. C.; Sartini, R. P.; Arruda, M. A. Z.** “Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis”, *Analytica Chimica Acta*, **400**, 249-256, (1999).



# **Conclusiones**



# Capítulo 8

---

## *Conclusiones generales*

---

El objetivo general de la presente tesis se ha alcanzado en gran medida. A lo largo de su realización se ha diseñado, construido y aplicado la infraestructura instrumental básica para la implementación de sistemas automatizados de análisis. Este objetivo global se ha concretado en cuatro objetivos parciales relativos a los distintos sistemas desarrollados.

Se ha conseguido implementar con éxito cuatro sistemas de gestión de fluidos con distinto grado de automatización y de selectividad aumentada mediante la incorporación de distintas estrategias de separación/preconcentración de muestra. Han sido integrados dos sistemas de detección diferentes basados en dos técnicas instrumentales distintas, la potociometría y la espectrofotometría. La detección potenciométrica ha sido implementada en modo convencional y modo diferencial en la determinación de Cadmio (II). El segundo modo de detección ha sido miniaturizado e integrado con buenos resultados como sistema de medida en el sistema microfluídico.

De un modo general, puede decirse que se han alcanzado todas las metas marcadas al inicio de esta tesis, dirigidas al desarrollo e implementación de sistemas de gestión de fluidos basados en distintas técnicas de flujo que, integrando distintas técnicas de detección, son capaces de suministrar analizadores automáticos, robustos y versátiles.

Especificando los resultados obtenidos en cada una de las partes de este trabajo pueden derivarse las siguientes conclusiones parciales:

En el sistema r-FIA ha sido validada la substitución, como elemento de inserción de muestra, de las válvulas de seis vías utilizadas habitualmente en un sistema FIA por una microbureta automática. Se ha comprobado la viabilidad de la substitución mediante la caracterización y comparación de la respuesta obtenida con ambos tipos de sistemas de inserción cuando no existe reacción química. No se encontraron diferencias significativas entre ambos sistemas de inyección. El nuevo método de inserción de muestra presenta adicionalmente las siguientes ventajas: no es necesaria una reconfiguración del sistema para variar el volumen de inyección, pudiéndose modificar este simplemente con un programa de inyección variable. Adicionalmente, se mejora el grado de mezcla de muestra y reactivo, ya que la microbureta inserta la muestra como si fuera un canal adicional mientras está en funcionamiento.

Es de destacar la potencialidad que presenta la utilización de la microbureta en el diseño de sistemas inteligentes de monitorización en continuo. Un adecuado estudio de los límites de fluctuación de la concentración de un analito permitiría prever diferentes intervalos de autocalibración. Como demostración de las posibilidades que aporta este tipo de inserción, se ha implementado un analizador autoadaptativo de ion nitrito en dos intervalos de concentración distintos, mediante variación del volumen de reactivo insertado.

Respecto a la aplicación del sistema al análisis de ozono puede concluirse que en el método propuesto se obtiene una sensibilidad media baja pero el intervalo lineal se amplia respecto a otros métodos. El límite superior de respuesta lineal (LSRL) es de 5,0 ppm frente al método estándar que tiene es de 0,5 ppm. Estos resultados no son una desventaja ya que la concentración de ozono residual normalmente está comprendida entre 0,05-5,0 mg/l. Así el sistema propuesto, aunque de baja sensibilidad, puede aplicarse en un amplio intervalo de concentración con la ventaja no ser necesaria la dilución previa de la muestra.

En el sistema de análisis por inyección secuencial desarrollado ha quedado demostrada la viabilidad y capacidad operacional de los sistemas autoadaptativos de análisis basados en la técnica SIA. Se ha desarrollado un programa de control que ha permitido el análisis de ion nitrito en dos amplios intervalos de concentración. Comparada con su predecesora, la técnica FIA, la aportación más importante de la técnica SIA es básicamente instrumental. En este ámbito presenta una gran potencialidad respecto a los cambios de operación, sin necesidad de modificaciones físicas directas en el sistema de gestión de fluidos. El sistema desarrollado permite, además, la implementación de cualquier determinación con detección espectrofotométrica con características de autodaptabilidad, lo que significa que el sistema

puede realizar de un modo autónomo el análisis de una muestra en las condiciones experimentales óptimas, adaptándose en cada caso concreto a la composición de esta.

La supervisión de procesos *on-line* es una de las aplicaciones de mayor futuro que presenta la técnica SIA. A pesar de todas las ventajas que aporta esta técnica en los sistemas de gestión de fluidos, todavía se ha de superar su principal limitación que es la elaboración del programa de control, problema que otras metodologías de flujo no presentan con tanta rigurosidad.

El sistema SIA implementado para la determinación de ion cadmio con los dos modos de detección, constituye una buena alternativa a métodos descritos en la literatura. Esta técnica permite, gracias a la incorporación de una columna de preconcentración por intercambio iónico, la determinación de ion cadmio para niveles de concentración inferiores al límite inferior de respuesta lineal del electrodo. Así mismo, la columna aporta selectividad al sistema ya que facilita la eliminación de posibles interferencias debidas a  $Pb^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ . El sistema propuesto permite la determinación de ion cadmio en un intervalo muy amplio de concentraciones, mayor que el de la espectrofotometría de absorción atómica de llama (0-2 ppm), y facilita el análisis de muestras con concentraciones de cadmio inferiores al LIRL del electrodo con mayor sensibilidad analítica mediante el modo de detección diferencial.

Los resultados obtenidos hasta el momento en el sistema microfluídico desarrollado han permitido demostrar que, sin necesidad de conseguir un grado de miniaturización total, es posible acceder ya a un conjunto importante de ventajas derivadas de la asociación simbiótica del concepto de miniaturización e integración.

Se ha desarrollado con éxito la infraestructura necesaria para realizar determinaciones espectrofotométricas en un sistema microfluídico. Se ha podido establecer un modelo satisfactorio del comportamiento hidrodinámico del microchip respecto al proceso de difusión sin reacción química. Este modelo describe la respuesta del microchip como un RCTA con retardo de un flujo pistón. La validez del modelo propuesto ha quedado demostrada ya que permite predecir con toda exactitud los resultados experimentales.

Los resultados obtenidos en los estudios con reacción química en línea han sido muy satisfactorios. La integración de la capacidad de conmutación de las válvulas junto con el comportamiento del microchip como reactor ha permitido obtener un grado de mezcla adecuado para que se produjese la reacción química y por tanto la respuesta en un tiempo mínimo. Además se ha conseguido eliminar el efecto Schlieren que no ha sido detectado en ninguna de las condiciones estudiadas.

Se puede concluir que el sistema desarrollado ha quedado bien establecido, y puede utilizarse para cualquier otro tipo de aplicación con detección espectrofotométrica. Además los buenos resultados obtenidos en las muestras reales abren un gran abanico de posibilidades para su utilización en línea en (micro)equipos automáticos de análisis. Por tanto, ha quedado demostrada la viabilidad y funcionalidad del sistema híbrido desarrollado.

### ***Perspectivas futuras***

El continuo avance en las técnicas de microfabricación y el desarrollo de nuevos materiales permite predecir en un futuro próximo la implantación con sistemas de separación de alta resolución, microreactores de menor tamaño y detectores ultrasensibles. Los nuevos materiales podrán ser utilizados para la fabricación de microcanales plásticos, nanoestructuras y sistemas de detección basados en LEDs. Las tendencias comerciales muestran un empuje importante hacia los substratos basados en polímeros o cerámicas, como LTCC, que pueden ser procesados con infraestructuras menos costosas de fabricación. Sin embargo, la fotolitografía convencional de silicio y vidrio seguirá utilizándose en aplicaciones concretas, particularmente cuando sea necesaria la presencia de componentes microelectrónicos activos sobre el chip.

La integración de los componentes individuales también será uno de los focos importantes de investigación. En la actualidad se está investigando en nuevos principios para la impulsión de fluidos basados la utilización de fluidos ferromagnéticos o la electrohumectación (*Electrowetting*). Una de las dificultades existentes en la comercialización de estos dispositivos es la falta de integración real que existe de momento, aunque no todas las posibles aplicaciones necesitan integración de todos componentes.

Los microsistemas construidos en esta tesis han demostrado su aplicabilidad en el diseño de sistemas analíticos miniaturizados con detección espectrofotométrica. En esa dirección, se abre un vasto campo para la implementación de dichos dispositivos en la determinación de nuevos parámetros químicos. En los estudios realizados hasta el momento sólo se ha utilizado uno de los cuatro microchips diseñados y construidos. Dos de ellos disponen de doble celda de detección y podrían ser utilizados para realizar determinaciones multiparamétricas en base a la técnica de flujo *sandwich*, para medidas diferenciales o en estudios cinéticos con técnicas de flujo detenido.

En la actualidad, en el Grup de Sensors i Biosensors se ha comenzado a trabajar en una vía alternativa de construcción de microsistemas basada en un nuevo substrato, las cerámicas verdes o LTCC. Una de las principales características de la tecnología LTCC es la posibilidad de construir dispositivos en 3D usando múltiples capas. Esto simplifica la integración de los detectores, los elementos activos y pasivos necesarios para la gestión de los líquidos y las etapas de pretratamiento necesarias (difusión de gases, preconcentración, etc.).



## **Apéndices**



# Apéndice 1

---

## *Programa en BASIC para la inyección con microbureta en un sistema FIA*

---

### **9.1 Descripción**

Este programa permite la inyección variable de reactivo para el análisis de ion nitrito en dos intervalos de concentración

```
*****
ON KEY(1) GOSUB PauseHandler
KEY(1) ON

CLS
PRINT : PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
PRINT " Programa de calibrado con volumen de inyección variable"
PRINT
PRINT " (c) Mireia"
PRINT : PRINT : COLOR 15: PRINT " 25 microlitros"
PRINT : PRINT : PRINT

' inyecta un volumen de 25 microlitros 5 veces

B$ = "0OD0025"
FOR I = 1 TO 5
COLOR 2: PRINT " estoy inyectando 25 microlitros, por "; I; " vez.": COLOR 7
GOSUB 100
NEXT I
' carga la bureta
PRINT : COLOR 15: LOCATE 21, 40: PRINT " estoy cargando 125 microlitros."
COLOR 7: PRINT C$ = "0IP0125": GOSUB 200

CLS
PRINT : PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
PRINT " Programa de calibrado con volumen de inyección variable"
PRINT
PRINT "(c) Mireia"
PRINT : PRINT : COLOR 15: PRINT " 35 microlitros"
PRINT : PRINT : PRINT

' inyecta un volumen de 35 microlitros 5 veces

B$ = "0OD0035"
FOR I = 1 TO 5
COLOR 2: PRINT " estoy inyectando 35 microlitros, por "; I; " vez.": COLOR 7
GOSUB 100
NEXT I
' carga la bureta
PRINT : COLOR 15: LOCATE 21, 40: PRINT " estoy cargando 175 microlitros."
COLOR 7: PRINT C$ = "0IP0175": GOSUB 200

CLS
PRINT : PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
PRINT " Programa de calibrado con volumen de inyección variable"
PRINT
PRINT "(c) Mireia"
PRINT : PRINT : COLOR 15: PRINT " 50 microlitros"
PRINT : PRINT : PRINT

' inyecta un volumen de 50 microlitros 5 veces

B$ = "0OD0050"
FOR I = 1 TO 5
COLOR 2: PRINT " estoy inyectando 50 microlitros, por "; I; " vez.": COLOR 7
GOSUB 100
NEXT I
' carga la bureta
PRINT : COLOR 15: LOCATE 21, 40: PRINT " estoy cargando 250 microlitros."
COLOR 7: PRINT C$ = "0IP250": GOSUB 200

CLS
PRINT : PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
PRINT " Programa de calibrado con volumen de inyección variable"
PRINT
PRINT "(c) Mireia"
PRINT : PRINT : COLOR 15: PRINT " 75 microlitros"
PRINT : PRINT : PRINT

' inyecta un volumen de 75 microlitros 5 veces

B$ = "0OD0075"
FOR I = 1 TO 5
COLOR 2: PRINT " estoy inyectando 75 microlitros, por "; I; " vez": COLOR 7
```

```

GOSUB 100
NEXT I
' carga la bureta
PRINT : COLOR 15: LOCATE 21, 40: PRINT " estoy cargando 375 microlitros."
COLOR 7: PRINT C$ = "0IP0375": GOSUB 200

CLS
PRINT : PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
PRINT " Programa de calibrado con volumen de inyección variable"
PRINT
PRINT "(c) Mireia"
PRINT : PRINT : COLOR 15: PRINT "100 microlitros"
PRINT : PRINT : PRINT

' inyecta un volumen de 100 microlitros 5 veces
B$ = "0OD0100"
FOR I = 1 TO 5
COLOR 2: PRINT " estoy inyectando 100 microlitros, por "; I; " vez.": COLOR 7
GOSUB 100
NEXT I
' carga la bureta
PRINT : COLOR 15: LOCATE 21, 40: PRINT " estoy cargando 500
    microlitros."
COLOR 7: PRINT C$ = "0IP0500": GOSUB 200

CLS
PRINT : PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
PRINT " Programa de calibrado con volumen de inyección variable"
PRINT
PRINT "(c) Mireia"
PRINT : PRINT : COLOR 15: PRINT "150 microlitros"
PRINT : PRINT : PRINT

' inyecta un volumen de 150 microlitros 5 veces
B$ = "0OD0150"
FOR I = 1 TO 5
COLOR 2: PRINT " estoy inyectando 150 microlitros, por "; I; " vez.; ": COLOR 7
GOSUB 100
NEXT I
' carga la bureta
PRINT : COLOR 15: LOCATE 21, 40: PRINT " estoy cargando 750 microlitros."
COLOR 7: PRINT C$ = "0IP0750": GOSUB 200

CLS
PRINT : PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
PRINT " Programa de calibrado con volumen de inyección variable H"
PRINT
PRINT "(C) Mireia"
PRINT : PRINT : COLOR 15: PRINT "200 microlitros"
PRINT : PRINT : PRINT

' inyecta un volumen de 200 microlitros 5 veces
B$ = "0OW200"
FOR I = 1 TO 5
COLOR 2: PRINT " estoy inyectando 200 microlitros, por "; I; " vez": COLOR 7
GOSUB 100
NEXT I
' carga la bureta
PRINT : COLOR 15: LOCATE 21, 40: PRINT " estoy cargando 1000 microlitros."
COLOR 7: PRINT C$ = "0IP1000": GOSUB 200

CLS
PRINT : PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
PRINT " Programa de calibrado con volumen de inyección variable"
PRINT
PRINT "(C) Mireia"
PRINT : PRINT : COLOR 15: PRINT "250 microlitros"
PRINT : PRINT : PRINT

' inyecta un volumen de 250 microlitros 5 veces
B$ = "0OW250"

```

```
FOR I = 1 TO 5
COLOR 2: PRINT " estoy inyectando 250 microlitros, por"; I; " vez.": COLOR 7
GOSUB 100
NEXT I
' carga la bureta
PRINT : COLOR 15: LOCATE 21, 40: PRINT " estoy cargando 1250 microlitros."
COLOR 7: PRINT C$ = "0IP1250": GOSUB 200

STOP ' FIN
END

100 CLOSE #2: OPEN "COM1:2400,e,7,2,asc" FOR OUTPUT AS #2
120 PRINT #2, "N" + CHR$(13)
130 PRINT #2, B$ + CHR$(13)
144 T1 = TIMER
'
MiLin% = CSRLIN
MiCol% = POS(0)
' espera 120 segundos

145 WHILE (TIMER - T1 < 119)
LOCATE 23, 32: PRINT "tiempo de análisis transcurrido "; INT(TIMER - T1)
LOCATE 23, 69: PRINT " segundos."
148 WEND
LOCATE (MiLin%), (MiCol%)
150 RETURN

' subrutina para cargar el reactivo inyectado

200 CLOSE #2: OPEN "COM1 :2400,e,7,2,asc" FOR OUTPUT AS #2
220 PRINT #2, "N" + CHR$(13)
230 PRINT #2, C$ + CHR$(13)
244 T2 = TIMER
'
' espera 3 segundos

245 WHILE (TIMER - T2 < 3): WEND
250 RETURN

PauseHandler:
SLEEP 0
CLOSE #2: OPEN "COM1:2400,e,7,2,asc" FOR OUTPUT AS #2
PRINT #2, "N" + CHR$(13)
PRINT #2, BS + CHR$(13)
T1 = TIMER
RETURN
```

## Apéndice 2

---

### *Programa en C para la gestión del análisis de ion nitrito en un sistema SIA autoadaptativo*

---

#### **9.2 Descripción**

Este programa que está escrito en ANSI C permite la comunicación con los diferentes elementos del sistema EASI, la adquisición de datos, la gestión del sistema de fluidos, visualizar y modificar los picos por pantalla, el cambio automático de las condiciones de operación en función de la concentración de ion nitrito en la muestra y además el programa introduce en el sistema la capacidad de autocalibración.

```
*****  
ANAL2.C- FUNCIONES PARA LA COMUNICACION CON ELEMENTOS EASI
```

SIA para nitritos con adquisición del colorimetro

PROGRAMADOR: Mireia Baeza Labat

ULTIMA REVISION: 5/3/98

```
*****
```

```
***** Librerías a incluir *****
```

```
#include <stdio.h>  
#include <string.h>  
#include <bios.h>  
#include <conio.h>  
#include <time.h>  
#include <dos.h>  
#include <graphics.h>  
#include <stdlib.h>  
#include <math.h>  
#include <io.h>  
  
***** Definiciones *****  
#define COM1 0  
#define COM2 1  
#define COM3 2  
#define COM4 3  
#define SETTINGS1 (_COM_9600 | _COM_CHR8 | _COM_STOP1 | _COM_NOPARITY)  
#define SETTINGS2 (_COM_9600 | _COM_CHR7 | _COM_STOP2 | _COM_NOPARITY)  
#define DTR 0x01 /* Data Terminal Ready */  
#define RTS 0x02 /* Ready To Send */  
#define DCOM1 0x3F8  
#define DCOM2 0x2F8  
#define DCOM3 0x3E8  
#define DCOM4 0x2E8  
#define THRE 0x2000 /* Bit 13, Transmission-hold register empty */  
#define DATA_READY 0x100  
#define DIREC_BASE 0X170 /* Dirección base de la placa ADDA-14 */
```

```
***** teclas *****
```

```
#define ARRIBA 0x4800 /*Código del teclado*/  
#define ABAJO 0x5000  
#define ESC 0x1b  
#define DERECHA 0x4d00  
#define IZQUIERDA 0x4b00  
#define PAGARRIBA 0x4900  
#define PAGABAJA 0x5100  
#define HOME 0x4700  
#define RETURN 0x1c0d  
#define BACKSP 0x0e08  
#define ALTQ 0x1000  
#define CTRL_C 0x2e03  
#define F1 0x3b00  
#define F2 0x3c00  
#define F3 0x3d00  
#define F4 0x3e00  
#define F5 0x3f00  
#define F6 0x4000  
#define F7 0x4100  
#define F8 0x4200  
#define F9 0x4300  
#define F10 0x4400  
#define ALTF1 0x6800  
#define ALTF2 0x6900  
#define ALTF3 0x6A00  
#define ALTF4 0x6B00  
#define ALTF5 0x6C00  
#define ALTF6 0x6D00  
#define ALTF7 0x6E00  
#define ALTF8 0x6F00  
#define ALTF9 0x7000  
#define ALTF10 0x7100
```

```
***** Definiciones globales *****
```

```
unsigned char fin=1; /* variable define el fin del programa*/
```

```

float tiempos[700],Absor[700],Absorf[700],Blanco1[700], Blanco2[700];/* datos del pico */
float Absmax[5]; /* m ximos de los picos para el c lculo*/
float alturas_max[20]; /* m ximos para guardarlos */
float a[5], b[5]; /* coeficientes regresión a cubico y b lineal */
float escala=1; /* m ximo absorbancia para gráfica*/
float max1=0.0, max2=0.0; /* m ximo del pico */
float t_max1=0.0, t_max2=0.0; /* tiempo del m ximo */
float t_espera=140; /* espera para análisis */
int tipo_anal=1; /* 0 si pico normal, 1 si es lento */
int rango=0; /* 0 si es la zona baja de concentración y 1 alta*/
int busco_max=1;
int FIN=0;

***** ordenes de la bureta *****/
char init_bur_der[20]="/1Z0R\n"; /*Inicializa la bureta derecha*/
char init_bur_izq[20]="/1Y0R\n"; /*Inicializa la bureta izquierda*/
char carg_bur[20]="/1A3000R\n"; /*Cargar la bureta al m ximo, 2500*/
char desc_bur[20]="/1D3000R\n"; /*Descargar la bureta al m ximo, 2500*/
char desc_inv_bur[20]="/1D3000OD0R\n"; /*Descargar la bureta al m ximo contrariamente a la ini*/
char desc_a0[20]="/1A0R\n"; /*Descargar la bureta*/
char desc_a0d[20]="/1OA0R\n"; /*Descargar la bureta*/
char carg_100_bur[20]="/1P120R\n"; /*Carga 100 microlitros bureta*/
char carg_200_bur[20]="/1P240R\n"; /*Carga 200 microlitros bureta*/
char carg_40_bur[20]="/1A40R\n"; /*Carga 40 microlitros bureta*/
char carg_2000_bur[20]="/1A2400R\n"; /*Carga 2000 microlitros bureta*/
char carg_10pasos_bur[20]="/1P10R\n"; /*Carga 8.33 microlitros bureta*/
char carg_15pasos_bur[20]="/1P15R\n"; /*Carga 12.5 microlitros bureta*/
char carg_20pasos_bur[20]="/1P20R\n"; /*Carga 16.6 microlitros bureta*/
char carg_30pasos_bur[20]="/1P30R\n"; /*Carga 25.0 microlitros bureta*/
char carg_40pasos_bur[20]="/1P40R\n"; /*Carga 33.3 microlitros bureta*/
char carg_50pasos_bur[20]="/1P50R\n"; /*Carga 41.6 microlitros bureta*/
char carg_60pasos_bur[20]="/1P60R\n"; /*Carga 50.0 microlitros bureta*/
char carg_70pasos_bur[20]="/1P70R\n"; /*Carga 58.3 microlitros bureta*/
char carg_75pasos_bur[20]="/1P75R\n"; /*Carga 62.5 microlitros bureta*/
char carg_80pasos_bur[20]="/1P80R\n"; /*Carga 66.6 microlitros bureta*/
char carg_90pasos_bur[20]="/1P90R\n"; /*Carga 75.0 microlitros bureta*/
char carg_100pasos_bur[20]="/1P100R\n"; /*Carga 83.3 microlitros bureta*/
char carg_120pasos_bur[20]="/1P120R\n"; /*Carga 100.0 microlitros bureta*/
char carg_150pasos_bur[20]="/1P150R\n"; /*Carga 125.0 microlitros bureta*/
char carg_180pasos_bur[20]="/1P180R\n"; /*Carga 150.0 microlitros bureta*/
char carg_240pasos_bur[20]="/1P240R\n"; /*Carga 200.0 microlitros bureta*/
char carg_300pasos_bur[20]="/1P300R\n"; /*Carga 250.0 microlitros bureta*/
char carg_360pasos_bur[20]="/1P360R\n"; /*Carga 300.0 microlitros bureta*/
char carg_420pasos_bur[20]="/1P420R\n"; /*Carga 350.0 microlitros bureta*/
char carg_480pasos_bur[20]="/1P480R\n"; /*Carga 400.0 microlitros bureta*/
char carg_540pasos_bur[20]="/1P540R\n"; /*Carga 450.0 microlitros bureta*/
char carg_600pasos_bur[20]="/1P600R\n"; /*Carga 500.0 microlitros bureta*/
char carg_inv_1300[20]="/1IP1300R\n"; /*Carga 1083.3 microl desde izquierda*/
char carg_inv_2805[20]="/1IP2805R\n"; /*Carga 2337.5 microl desde izquierda*/
char carg_inv_3000[20]="/1IP3000R\n"; /*Carga 2500.0 microl desde izquierda*/
char carg_inv_bur_fin20[20]="/1IP5800OA0R\n"; /*Carga 483.3 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_fin40[20]="/1IP5600OA0R\n"; /*Carga 466.6 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_fin60[20]="/1IP5400OA0R\n"; /*Carga 450.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_fin80[20]="/1IP5200OA0R\n"; /*Carga 433.3 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_fin100[20]="/1IP5000OA0R\n"; /*Carga 416.6 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_1300[20]="/1IP1300OA0R\n"; /*Carga 1083.3 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_1500[20]="/1IP1500OA0R\n"; /*Carga 1250.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2520[20]="/1IP2520OA0R\n"; /*Carga 2100.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2525[20]="/1IP2525OA0R\n"; /*Carga 2104.2 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2580[20]="/1IP2580OA0R\n"; /*Carga 2150.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2640[20]="/1IP2640OA0R\n"; /*Carga 2200.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2730[20]="/1IP2730OA0R\n"; /*Carga 2275.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2760[20]="/1IP2760OA0R\n"; /*Carga 2300.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2785[20]="/1IP2785OA0R\n"; /*Carga 2320.8 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2800[20]="/1IP2800OA0R\n"; /*Carga 2333.3 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2805[20]="/1IP2805OA0R\n"; /*Carga 2337.5 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2810[20]="/1IP2810OA0R\n"; /*Carga 2341.6 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2820[20]="/1IP2820OA0R\n"; /*Carga 2350.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2880[20]="/1IP2880OA0R\n"; /*Carga 2400.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2910[20]="/1IP2910OA0R\n"; /*Carga 2425.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2950[20]="/1IP2950OA0R\n"; /*Carga 2458.3 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2960[20]="/1IP2960OA0R\n"; /*Carga 2466.6 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2970[20]="/1IP2970OA0R\n"; /*Carga 2475.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_2980[20]="/1IP2980OA0R\n"; /*Carga 2483.3 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/

```

```
char carg_inv_bur_2990[20]="/1IP2990OA0R\r"; /*Carga 2491.6 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char carg_inv_bur_3000[20]="/1IP3000OA0R\r"; /*Carga 2500.0 microl desde izquierda e inyecta todo a la der*/
char velo_35_bur[20]="/1S35R\r"; /*Cambia velocidad de bur*/
char velo_33_bur[20]="/1S33R\r"; /*Cambia velocidad de bur*/
char velo_32_bur[20]="/1S32R\r"; /*Cambia velocidad de bur*/
char velo_30_bur[20]="/1S30R\r"; /*Cambia velocidad de bur*/
char velo_20_bur[20]="/1S20R\r"; /*Cambia velocidad de bur*/
char velo_15_bur[20]="/1S15R\r"; /*Cambia velocidad de bur*/
char velo_10_bur[20]="/1S10R\r"; /*Cambia velocidad de bur*/
char estado_bureta[20]="/1Q\r"; /*Pide estado bureta*/
***** ordenes de la v lvula *****
char init_val[20]="/2Z6R\r"; /*Inicializa la v lvula de 6 vjas*/
char val_pos1[20]="/2A1R\r"; /*Cambia v l a pos1*/
char val_pos2[20]="/2A2R\r"; /*Cambia v l a pos2*/
char val_pos3[20]="/2A3R\r"; /*Cambia v l a pos3*/
char val_pos4[20]="/2A4R\r"; /*Cambia v l a pos4*/
char val_pos5[20]="/2A5R\r"; /*Cambia v l a pos5*/
char val_pos6[20]="/2A6R\r"; /*Cambia v l a pos6*/
char estado_valvula[20]="/2Q\r"; /*Pide estado valvula*/
char posicion_valvula[20]="/2?\r"; /*Pide posicion valvula*/
***** listado Subrutinas del fichero *****
int comunica(char *orden, char *respuesta);
void esperar_bur(void);
void esperar_val(void);
int comunica_val(char *orden, char *respuesta);
int comunica_bur(char *orden, char *respuesta);
int comprueba_error_val(char *respuesta);
float lectura(void);
void leer_grafica(void);
void guardar_datos(void);
void filtrar_datos(void);
void buscar_maximo(void);
void grafica(void);
void aumentar_escala(void);
void disminuir_escala(void);
void escribir_menu(void);
void ejex(void);
void ejey(void);
void menu(void);
void selectmenu(void);
void limpieza(int m);
void lavado_especial1(void);
void lavado_especial2(void);
void lav1(void);
void lav2(void);
void lav4(void);
void lav5(void);
void lav6(void);
void bajas1(void);
void bajas2(void);
void bajas5(void);
void bajas6(void);
void altas1(void);
void altas2(void);
void altas5(void);
void altas6(void);
void hacer_cero(void);
void monitorizacion(void);
void calibracion1(void);
void calibracion2(void);
void calibrado_lineal(void);
void calibrado_orden2(void);
void prueba(void);
void prueba2(void);
void calculo(void);
void lectura_calibrados(void);
void guardar_calibrado1(void);
void guardar_calibrado2(void);
int si_o_no(void);
void guarda_mensaje( char *mensaje, char *fichero);
```

```
*****
Subrutina que manda una orden a un EASI y recibe la respuesta.
La respuesta debe comenzar por un char 47 y acabar por un char 10.
Para evitar el bloqueo si no existe comunicación, se establecen unos
límites de 5 lecturas para el comienzo y 18 lecturas para el total.

Devuelve los siguientes valores:
-1 En 5 lecturas no ha existido un 47 de inicio
-2 En 18 lecturas no ha existido un 10 de finalización
-3 Orden no correcta
1 Respuesta correcta
*****
```

```
int comunica(char *orden, char *respuesta)
{
/* definiciones locales */
int j=0, kk=0, largo, error=0;
/* comprueba que tenga un return el mensaje a enviar */
if (strchr(orden, 'r') == NULL) return -3;
while(orden[j] != 13) j++; /* Para determinar la longitud de la orden */
largo=j;
outp ( DCOM4 + 4, DTR | RTS ); /* commuta a DTR y RTS */
/* bucle para enviar el mensaje byte a byte */
for (j=0;j<=largo;j++)
{
    _bios_serialcom(_COM_SEND, COM4, orden[j]); /* envia el byte [j] del mensaje */
    kk=0;
/* espera a el que el byte sea enviado */
    do kk++;
    while ((THRE & _bios_serialcom(_COM_STATUS, COM4,0)) == 0 && kk < 30000);
/* espera a que llegue un byte (eco) un maximo de 30000 veces */
    kk=0;
    do kk++;
    while ((DATA_READY & _bios_serialcom(_COM_STATUS, COM4,0)) == 0 && kk < 30000);
/* lee el eco */
    respuesta[0] = (char) inp (DCOM4);
}
outp ( DCOM4 + 4, 0 ); /* commuta a escuchar */
/* lazo para leer el primer byte de la respuesta */
do {
    error++;
    kk=0;
/* espera a que llegue un byte, lee un maximo de 30000 veces */
    do kk++;
    while ((DATA_READY & _bios_serialcom(_COM_STATUS, COM4,0)) == 0 && kk < 30000);
/* lee el byte que ha llegado */
    respuesta[0] = (char) inp (DCOM4);
}
while (respuesta[0] != 47 && error < 5); /* acaba por una barra o 5 intentos */
if (error == 5) return -1; /* cinco caracteres sin que sea el byte inicial */
error=0;
j=0;
/* lazo para leer desde el segundo byte al final de la respuesta EASI */
do {
    error++;
    j++;
    kk=0;
/* espera a que llegue un byte, lee un maximo de 30000 veces */
    do kk++;
    while ((DATA_READY & _bios_serialcom(_COM_STATUS, COM4,0)) == 0 && kk < 30000);
/* lee el byte que ha llegado */
    respuesta[j] = (char) inp (DCOM4);
}
while (respuesta[j] != 0x0A && error < 18); /* busca el fin del mensaje o 18 caracteres leidos */
if (error == 18) return -2;
/* asigna un valor cero al elemento de despues al ultimo leido */
respuesta[j+1]=0;
/* finalización normal de la subrutina */
return 1;
}
```

```
*****
Subrutina que espera a que la valvula EASI este libre
*****
void esperar_val()
{
char respuesta[20];
/* lazo sin fin: envia Q y espera valvula ready */
do {
comunica(estado_valvula, respuesta);
comprueba_error_val(respuesta);
}while((~respuesta[2])&0X0020);
}

*****
Subrutina que espera a que la bureta EASI este libre
*****
void esperar_bur()
{
char respuesta[20];
/* lazo sin fin: envia Q y espera bureta ready */
do {
comunica(estado_bureta, respuesta);
}while((~respuesta[2])&0X0020);
}

*****
Subrutina que comunica con la valvula EASI esperando que este libre
*****
int comunica_val(char *orden, char *respuesta)
{
int i;
esperar_val();
i=comunica(orden,respuesta);
comprueba_error_val(respuesta);
return i;
}

*****
Subrutina que comunica con la bureta EASI esperando que este libre
*****
int comunica_bur(char *orden, char *respuesta)
{
int i;
esperar_bur();
i=comunica(orden,respuesta);
return i;
}

*****
Subrutina que comprueba si existe error en las instrucciones a la valvula
*****
int comprueba_error_val(char *respuesta)
{
switch ((respuesta[2])&0X000F) {
case 0:
/*printf(" No Error \n");*/
return 0;
case 1:
/*printf(" Error Initialization \n");*/
return 1;
case 2:
/*printf(" Invalid Command \n");*/
return 1;
case 3:
/*printf(" Invalid Operand \n");*/
return 1;
case 4:
/*printf(" Invalid Command Seq \n");*/
return 1;
case 7:
/*printf(" Device not Initialized \n");*/
return 1;
case 9:
printf(" Overload \n");
}
```

```

        return 1;
    case 15:
        /*printf(" Command Overflow \n");*/
        return 1;
    default:
        /*printf(" Mensaje desconocido \n");*/
        printf("%s\n", respuesta);
        return 1;
    }
}

/****************************************
Subrutina de A/D del colorimetro
*****************************************/
float lectura(void)
{
    int i=0,j=0,canal=1,A=0;
    float num_lec=100,p=0,AD=0;
    for (j=0;j<num_lec;j++)
    {
        outp( DIREC_BASE+1 , 0); /* borra datos previos */
        outp( DIREC_BASE+0 , canal); /* inicializa el canal a leer */
        for (i=0;i<8;i++) A=inp( DIREC_BASE+8 ); /* incializa la lectura */
        for (i=0;i<8;i++) A=inp( DIREC_BASE+12); /* incializa la lectura */
        A=inpw( DIREC_BASE+2 ) & 0x3FFF; /* anulo los dos primeros bits */
        p=A;
        AD=AD+p/num_lec;
    }
    return AD;
}

/****************************************
Subrutina de adquisición y gráfica del pico
*****************************************/
void leer_grafica(void)

{
/* definiciones locales */
int gdriver = DETECT, gmode, errorcode;
clock_t start, tiempo;
float incf,datos[1000];
int i,j,x1,y1;
time_t t_old, t_act;
char men_tiempo[40],men_AD[40],men_mV[40],men_Abs[40];
max1=0; /* inicializa el m ximo */
max2=0; /* inicializa el m ximo */
busco_max=1; /* primero el primer m ximo */
start=clock(); /* inicio tiempo de análisis */
clrscr(); /* borrar pantalla */
initgraph(&gdriver, &gmode, "c:\\tc\\bgi\\");
setcolor(GREEN);
setfillstyle(1,BLACK);
outtextxy(160,180, " Análisis de Nitritos");
/* espera (tiempo de espera) en segundos */
t_old=time(NULL);
do {t_act=time(NULL);
    incf=difftime(t_act,t_old);
    bar(380,200,600,250);
    sprintf(men_tiempo, "Tiempo de espera del pico: %3.1f",incf);
    outtextxy(170,225, men_tiempo);
} while (incf<t_espera);
cleardevice();
setcolor(WHITE);
menu();
ejey();
ejex();
for (j=0;j<600;) /* realizamos 600 lecturas */
{
    datos[j]=lectura();
    if (tipo_anal==0) /* lectura media 100 A/D 10 veces */
    {
        for(i=0;i<9;i++) datos[j]+=lectura(); /* suma 9 lecturas m s */
        datos[j]/=10; /* media de 10 lecturas de 100 datos */
    }
}
}

```

```

if (tipo_anal==1)           /* lectura media 100 A/D 20 veces */
{
    for(i=0;i<34;i++) datos[jj]=lectura(); /* suma 34 lecturas m s*/
    datos[jj]/=35;           /* media de 35 lecturas de 100 datos */
}
tiempo=clock();
tiempos[jj]=(tiempo-start) / CLK_TCK;      /* tiempo analisis */
x1=35+j;
y1=430-datos[jj]/5;
putpixel(x1,y1,EGA_WHITE);      /* dibuja el punto */
/* escribe resultados por pantalla */
setfillstyle(1,BLACK);
bar(0,460,640,479);
setcolor(GREEN);
sprintf(men_tiempo, "Tiempo: %f", tiempos[jj]);
sprintf(men_AD, "AD: %f", datos[jj]);
sprintf(men_mV, "mV: %f", datos[jj]*0.526);
sprintf(men_Abs, "Absorbancia: %f", (datos[jj]*0.0005265-0.0186)/1.009);
outtextxy( 10,465, men_tiempo);
outtextxy(160,465, men_AD);
outtextxy(310,465, men_mV);
outtextxy(460,465, men_Abs);
setcolor(WHITE);
/* busca el m ximo */
if (busco_max==1)
{
    if ( datos[jj] > max1 )
    {
        t_max1=tiempos[jj];
        max1=datos[jj];
    }
    if ((j>10) && (datos[j-10] > datos[jj]) && (datos[jj]>40)) busco_max=0;
}
if ((busco_max==0) && (datos[jj]>datos[j-8])) busco_max=2;
if (busco_max==2)
{
    if ( datos[jj] > max2 )
    {
        t_max2=tiempos[jj];
        max2=datos[jj];
    }
}
Absor[jj]=(datos[jj]*0.0005265-0.0186)/1.009;
}
if (busco_max==1)
{
    sprintf(men_Abs, "El m ximo del pico1 es: %f", (max1*0.0005265-0.0186)/1.009);
    outtextxy( 380,55, men_Abs);
    sprintf(men_Abs, "El tiempo del m ximo1 es: %f", t_max1);
    outtextxy( 380,70, men_Abs);
}
if (busco_max==2)
{
    sprintf(men_Abs, "El m ximo del pico2 es: %f", (max2*0.0005265-0.0186)/1.009);
    outtextxy( 380,85, men_Abs);
    sprintf(men_Abs, "El tiempo del m ximo2 es: %f", t_max2);
    outtextxy( 380,100, men_Abs);
}
return;
}

/****************************************
Subrutina que guarda los datos en fichero
****************************************/
void guardar_datos()
{
    time_t segns_ara;
    char fichero[33];
    int j;
    struct tm *time_ara;
    FILE *nombre;
/* crea el nombre del fichero de datos en función dia,mes,hora,minuto dat */
    tzset();
    time(& segns_ara);
}

```

```

time_ara = localtime(& segns_ara);
strftime(fichero, 33, "c:\\\\datosact\\\\%d%\\%H%M.dat", time_ara);
nombre=fopen(fichero,"w");
/* escribe datos en fichero */
for (j=0;j<600;j++)
    fprintf(nombre, " %f4 %f5 %f4 \n", tiempos[j],Absor[j],Absorf[j]);
fclose(nombre);
return;
}

*****
Subrutina que filtra datos con la media movil de siete puntos
*****
void filtrar_datos()
{
float A;
int i,j;
Absorf[0]=Absor[0];
Absorf[1]=(Absor[0]+Absor[1]+Absor[2])/3.;
Absorf[2]=(Absor[0]+Absor[1]+Absor[2]+Absor[3]+Absor[4])/5.;
for (j=3;j<597;j++)
{
    A=0;
    for (i=0;i<7;i++) A+=Absor[j+i-3];
    Absorf[j]=A/7.;
}
Absorf[597]=(Absor[595]+Absor[596]+Absor[597]+Absor[598]+Absor[599])/5.;
Absorf[598]=(Absor[597]+Absor[598]+Absor[599])/3.;
Absorf[599]=Absor[599];
return;
}

*****
Subrutina que dibuja los datos filtrados con l\\neas
*****
void grafica()
{
int j,x1,y1;
char men_Abs[40];
float p;
x1=35;
p=430-Absorf[0]*400/escala; /* calcula y1 de absorcion filtrada */
y1=p;
moveto(x1,y1); /* dibuja el primer punto */
for (j=1;j<600;j++) /* dibujamos 599 lecturas */
{
    x1=j+35;
    p=430-Absorf[j]*400/escala; /* calcula y1 de absorcion filtrada */
    y1=p;
    lineto(x1,y1); /* dibuja la linea al siguiente punto */
}
if (busco_max==1)
{
    sprintf(men_Abs, "El m\\ximo del pico1 es: %f", (max1*0.0005265-0.0186)/1.009);
    outtextxy( 380,55, men_Abs);
    sprintf(men_Abs, "El tiempo del m\\ximo1 es: %f", t_max1);
    outtextxy( 380,70, men_Abs);
}
if (busco_max==2)
{
    sprintf(men_Abs, "El m\\ximo del pico2 es: %f", (max1*0.0005265-0.0186)/1.009);
    outtextxy( 380,55, men_Abs);
    sprintf(men_Abs, "El tiempo del m\\ximo2 es: %f", t_max1);
    outtextxy( 380,70, men_Abs);
}
return;
}

*****
Subrutina que busca el m\\ximo para el calibrado
*****
void buscar_maximo ()
{
int i;

```

```
max1=0.0;           /*inicialización del máximo*/
for (i=0;i<599;i++) if (Absorfi[i]>max1) max1=Absorfi[i];
return;
}

/****************************************
Subrutina que amplia la escala del pico
*****************************************/
void aumentar_escala()
{
cleardevice();
escala=escala*2.0;
menu();
ejex();
ejey();
grafica();
return;
}

/****************************************
Subrutina que disminuye la escala del pico
*****************************************/
void disminuir_escala()
{
cleardevice();
escala=escala/2.0;
menu();
ejex();
ejey();
grafica();
return;
}

/****************************************
Subrutina dibuja eje x
*****************************************/
void ejex()
{
int i,j;
char label[10];
line(35,430,635,430);
for (i=0;i<6;i++)
{
sprintf(label,"%3.0f",t Espera+7.8*i);
outtextxy(25+i*100,450,label);
line(35+i*100,430,35+i*100,445);
for(j=1;j<10;j++) line(35+100*i+10*j,430,35+100*i+10*j,435);
}
line(635,430,635,445);
sprintf(label,"%3.0f",t Espera+46.8);
outtextxy(615,450,label);
setcolor(YELLOW);
outtextxy(452,450,"Tiempo(s)");
setcolor(WHITE);
return;
}

/****************************************
Subrutina dibuja eje y
*****************************************/
void ejey()
{
int i,j;
char label[10];
line(35,30,35,430);
for (i=0;i<5;i++)
{
sprintf(label,"%3.2f", (1-0.2*i)*escala);
outtextxy(0,20+80*i,label);
line(20,30+80*i,35,30+80*i);
for(j=1;j<10;j++) line(31,30+80*i+8*j,35,30+80*i+8*j);
}
sprintf(label,"%3.2f",0.0);
outtextxy(0,420,label);
```

```

line(20,430,35,430);
setcolor(YELLOW);
outtextxy(0,60,"Abs");
setcolor(WHITE);
return;
}

*****
Subrutina para el cálculo de la concentración
*****/
void calculo()
{
    int i;
    float concentracion=0.0;
    char linea[160];
    if(rango==0)
    {
        bajas2();
        leer_grafica();
        filtrar_datos();
        guardar_datos();
        for (i=0;i<600;i++) Absorf[i]=Absorf[i]-Blanco1[i];
        buscar_maximo();
        alturas_max[6]=max1;
        if(max1>1.5) /*corte rango bajo*/
        {
            cleardevice();
            printf("\n\n\n La concentración de la muestra no está en el rango \n");
            delay(5000);
            rango=1;
            altas2();
            leer_grafica();
            filtrar_datos();
            guardar_datos();
            for (i=0;i<600;i++) Absorf[i]=Absorf[i]-Blanco2[i];
            buscar_maximo();
            alturas_max[7]=max1;
        }
    }
    else
    {
        altas2();
        leer_grafica();
        filtrar_datos();
        guardar_datos();
        for (i=0;i<600;i++) Absorf[i]=Absorf[i]-Blanco1[i];
        buscar_maximo();
        alturas_max[8]=max1;
        if(max1<0.3) /*corte rango alto*/
        {
            cleardevice();
            printf("\n\n\n La concentración de la muestra no está en el rango \n");
            delay(5000);
            rango=0;
            bajas2();
            leer_grafica();
            filtrar_datos();
            guardar_datos();
            for (i=0;i<600;i++) Absorf[i]=Absorf[i]-Blanco2[i];
            buscar_maximo();
            alturas_max[9]=max1;
        }
    }
    if (rango==0)
    {
        concentracion=(max1-b[0])/b[1];
        cleardevice();
        printf("\n\n\n La concentración de la muestra es: %f", concentracion);
        delay(10000);
    }
    else
    {
        concentracion=(-a[1]+sqrt(a[1]*a[1]-4*a[2]*(a[0]-max1)))/(2*a[2]);
        cleardevice();
    }
}

```

```
printf("\n\n\n La concentración de la muestra es: %f", concentracion);
delay(10000);
}
sprintf(linea,"Concentración: %8.3f ",concentracion);
guarda_mensaje( linea, "C:\datos\resulta.dat");
return;
}

***** Subrutina dibuja menu gr fico *****/
void menu()
{
setfillstyle(1,BLUE);
bar(25,0,639,18);
setcolor(LIGHTGREEN);
outtextxy(26,5,"F1");
outtextxy(80,5,"F2");
outtextxy(135,5,"Ctrl C");
outtextxy(190,5,"F4");
outtextxy(275,5,"F5");
outtextxy(410,5,"F6");
outtextxy(565,5,"F7");
setcolor(YELLOW);
outtextxy(41,5,"lav1");
outtextxy(95,5,"lav2");
outtextxy(150,5,"stop");
outtextxy(205,5,"nitritos");
outtextxy(290,5,"ampliar escala");
outtextxy(425,5,"disminuir escala");
outtextxy(580,5,"fichero");
setcolor(WHITE);
return;
}

***** Subrutina que da un primer menu en formato texto *****/
void escribir_menu()
{
clrscr();
printf("\n\n Teclas de función \n\n");
printf(" F1 : lavado especial 1 \n");
printf(" F2 : lavado especial 2 \n");
printf(" F3 : an lisis rango bajo \n");
printf(" F4 : an lisis rango alto \n");
printf(" F5 : aumentar escala \n");
printf(" F6 : disminuir escala \n");
printf(" F7 : borrar pantalla \n");
printf(" F8 : guardar datos en fichero \n");
printf(" F9 : hacer cero \n");
printf(" CTRL C : salir \n");
printf(" ALTF1 : calibraci n1 \n");
printf(" ALTF2 : calibraci n2 \n");
printf(" ALTF3 : monitorización \n");
printf(" ALTF4 : ambientación de un canal determinado\n");
printf(" : canales 1, 2, 4, 5 y 6\n");
printf(" ALTF5 : prueba zona baja de concentraci n\n");
printf(" ALTF6 : prueba zona alta de concentraci n\n");
printf(" ALTF7 : prueba de c lculo\n");
return;
}

***** Subrutina actuaciones desde el teclado *****/
void selectmenu(void)
{
int tecla,m;
if(bioskey(1)==0) return;
tecla=bioskey(0);
switch(tecla){
    case F1:
        lavado_especial1();
```

```

clrscr();
escribir_menu();
break;
case F2:
    lavado_especial2();
    clrscr();
    escribir_menu();
break;
case F3:
    bajas5(); /*an lisis de nitritos por canal 2*/
    leer_grafica();
    cleardevice();
    filtrar_datos();
    escribir_menu();
break;
case F4:
    altas2();
    leer_grafica();
    cleardevice();
    filtrar_datos();
    escribir_menu();
break;
case F5:
    aumentar_escala();
break;
case F6:
    disminuir_escala();
break;
case F7:
    cleardevice();
    menu();
break;
case F8:
    guardar_datos();
    printf("\n\n\n\n Estoy grabando el fichero \n");
break;
case F9:
    hacer_cero();
    clrscr();
    escribir_menu();
break;
case CTRLC:
    fi=0;
break;
case ALTF1:
    calibracion1();
    escribir_menu();
break;
case ALTF2:
    calibracion2();
    escribir_menu();
break;
case ALTF3:
    monitorizacion();
    escribir_menu();
break;
case ALTF4:
    clrscr();
    printf("\n\n\n\n Escribe el canal a limpiar ");
    m=getche()-48; /* convierte ASCII del 0 al 9 en número*/
    limpieza(m);
    escribir_menu();
break;
case ALTF5:
    prueba();
    escribir_menu();
break;
case ALTF6:
    prueba2();
    escribir_menu();
break;
case ALTF7:
    prueba();
    prueba2();

```

```
    calculo();
    escribir_menu();
    break;
    case ALTF8:
    default:
        break;
    }
return;
}

//*********************************************************************
Subrutina que limpia un canal seleccionado de la válvula para trabajar
//********************************************************************

void limpieza (int m)
{
/* definiciones locales */
if (m==1)
{
    lav1();
    printf("\n\n\n\n\n\n He limpiado el canal 1 \n");
}
if (m==2) lav2();
if (m==4) lav4();
if (m==5) lav5();
if (m==6) lav6();
return;
}

//*********************************************************************
Subrutina que prepara el canal 1-agua con cido-CARRIER para trabajar
//********************************************************************

void lav1(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
int i;
comunica_bur(velo_30_bur, respuesta);
esperar_bur();
for (i=0;i<1;++)
{
    comunica_val(val_pos1, respuesta);
    comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
    printf("%s\n", respuesta);
    comunica_bur(carg_200_bur, respuesta);
    esperar_bur();
    comunica_val(val_pos3, respuesta);
    comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
    printf("%s\n", respuesta);
    comunica_bur(desc_a0, respuesta);
    esperar_bur();
}
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
esperar_bur();
return;
}

//*********************************************************************
Subrutina que prepara el canal 2-patrón para trabajar
//********************************************************************

void lav2(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
int i;
comunica_bur(velo_30_bur, respuesta);
esperar_bur();
for (i=0;i<1;++)
{
    comunica_val(val_pos2, respuesta);
    comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
    printf("%s\n", respuesta);
    comunica_bur(carg_200_bur, respuesta);
    esperar_bur();
    comunica_val(val_pos3, respuesta);
}
```

```

comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0, respuesta);
esperar_bur();
}
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
esperar_bur();
return;
}

/****************************************
 Subrutina que prepara el canal 4-reactivo para trabajar
*****************************************/
void lav4(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
int i;
comunica_bur(velo_30_bur, respuesta);
esperar_bur();
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_200_bur, respuesta);
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0, respuesta);
esperar_bur();
}
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
esperar_bur();
return;
}

/****************************************
 Subrutina que prepara el canal 5-patrón para trabajar
*****************************************/
void lav5(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
int i;
comunica_bur(velo_30_bur, respuesta);
esperar_bur();
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_val(val_pos5, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_200_bur, respuesta);
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0, respuesta);
esperar_bur();
}
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
esperar_bur();
return;
}

/****************************************
 Subrutina que prepara el canal 6-patrón para trabajar
*****************************************/
void lav6(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
int i;

```

```
comunica_bur(velo_30_bur, respuesta);
esperar_bur();

for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_val(val_pos6, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_200_bur, respuesta);
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0, respuesta);
esperar_bur();
}

comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
esperar_bur();
return;
}

/****************************************
Subrutina que ejecuta programa an lisis de nitritos
rango 0.0-3.0 ppm para el blanco(agua)
****************************************/
```

```
void bajas1(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];

comunica_bur(velo_35_bur, respuesta);
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_180pasos_bur, respuesta); /*Aqua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Aqua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta); /*Llenado por izq y salida al detector*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
return;
}

/****************************************
Subrutina que ejecuta programa an lisis de nitritos
rango 0.0-3.0 ppm para el patrón de 0.05ppm
****************************************/
```

```
void bajas2(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];

comunica_bur(velo_35_bur, respuesta);
comunica_val(val_pos4, respuesta);
```

```

comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos2, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_180pasos_bur, respuesta); /*Patrón de 0.05 ppm*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Agua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta); /*Llenado por izq y salida al detector*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
return;
}

*****
Subrutina que ejecuta programa an lisis de nitritos
rango 0.0-3.0 ppm para el patrón de 1ppm
*****/
```

```

void bajas5(void)
{
    /* definiciones locales */
    char respuesta[20];

    comunica_bur(velo_35_bur, respuesta);
    comunica_val(val_pos4, respuesta);
    comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
    printf("%s\n", respuesta);
    comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
    esperar_bur();
    comunica_val(val_pos5, respuesta);
    comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
    printf("%s\n", respuesta);
    comunica_bur(carg_180pasos_bur, respuesta); /*Patrón de 1ppm*/
    esperar_bur();
    comunica_val(val_pos4, respuesta);
    comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
    printf("%s\n", respuesta);
    comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
    esperar_bur();
    comunica_val(val_pos1, respuesta);
    comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
    printf("%s\n", respuesta);
    comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Agua*/
    esperar_bur();
    comunica_val(val_pos3, respuesta); /*Llenado por izq y salida al detector*/
    comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
    printf("%s\n", respuesta);
    comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
    return;
}

*****
Subrutina que ejecuta programa an lisis de nitritos
rango 0.0-3.0 ppm para el patrón de 2ppm
*****/
```

```

void bajas6(void)
{
    /* definiciones locales */
    char respuesta[20];

    comunica_bur(velo_35_bur, respuesta);
```

```
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos6, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_180pasos_bur, respuesta); /*Patrón de 2ppm*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Aqua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta); /*Llenado por izq y salida al detector*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
return;
}

/*****************
Subrutina que ejecuta programa análisis de nitritos
rango 0.0-20.0 ppm para el blanco (agua destilada)
*****************/
void altas1(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
comunica_bur(velo_35_bur, respuesta);
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Aqua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Aqua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta); /*Llenado por izq y salida al detector*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
return;
}

/*****************
Subrutina que ejecuta programa análisis de nitritos
rango 0.0-20.0 ppm para el patrón 2ppm
*****************/
void altas6(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
comunica_bur(velo_35_bur, respuesta);
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
```

```

printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos6, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Patrón de 2ppm*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Agua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta); /*Llenado por izq y salida al detector*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
return;
}

*****
Subrutina que ejecuta programa an lisis de nitritos
rango 0.0-20.0 ppm para el patrón 10ppm
*****
void altas2(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
comunica_bur(velo_35_bur, respuesta);
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos2, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Patrón de 10ppm*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Agua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta); /*Llenado por izq y salida al detector*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
return;
}

*****
Subrutina que ejecuta programa an lisis de nitritos
rango 0.0-20.0 ppm para el patrón 20ppm
*****
void altas5(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
comunica_bur(velo_35_bur, respuesta);
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/

```

```
esperar_bur();
comunica_val(val_pos5, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_30pasos_bur, respuesta); /*Patrón de 20ppm*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos4, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Vol reactivo constante*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_15pasos_bur, respuesta); /*Agua*/
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta); /*Llenado por izq y salida al detector*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(carg_inv_bur_1300, respuesta);
return;
}
***** Subrutina que ejecuta programa PRUEBA de calibración en la zona baja *****/
void prueba(void)
{
/* definiciones locales */
int i;
printf("Agua \n");
/*bajas1()*/
leer_grafica();
filtrar_datos();
guardar_datos();
for (i=0;i<600;i++) Blanco1[i]=Absorff[i];
delay(5000);
printf("Patrón de 0.05ppm \n");
/*bajas2()*/
leer_grafica();
filtrar_datos();
guardar_datos();
for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco1[i];
buscar_maximo();
Absmax[0]=max1; /*abs max 0.05ppm*/
alturas_max[0]=max1;
printf("\n La abs max de 0.05ppm es: %f", max1);
delay(5000);
printf("Patrón de 1.0ppm \n");
/*bajas5()*/
leer_grafica();
filtrar_datos();
guardar_datos();
for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco1[i];
buscar_maximo(); /*subrutina que busca el maximo*/
Absmax[1]=max1; /*abs max 1.0 ppm*/
alturas_max[1]=max1;
printf("\n La abs max de 1.0ppm es: %f", max1);
delay(5000);
printf("Patrón de 2.0ppm \n");
/*bajas6()*/
leer_grafica();
filtrar_datos();
guardar_datos();
for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco1[i];
buscar_maximo(); /*subrutina que busca el maximo*/
Absmax[2]=max1; /*abs max 2.0 ppm*/
alturas_max[2]=max1;
printf("\n La abs max de 2.0ppm es: %f", max1);
delay(5000);
cleardevice();
calibrado_lineal(); /*subrutina de minimos cuadrados*/
delay(10000);
return;
}
```

```

*****
Subrutina que ejecuta programa PRUEBA2 de calibración en la zona alta
*****
void prueba2(void)
{
    /* definiciones locales */
    int i;
    printf("Agua \n");
    /*altas1();*/
    leer_grafica();
    filtrar_datos();
    guardar_datos();
    for (i=0;i<600;i++) Blanco2[i]=Absorff[i];
    delay(5000);
    printf("Patrón de 2.0ppm \n");
    /* altas6();*/
    leer_grafica();
    filtrar_datos();
    guardar_datos();
    for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco2[i];
    buscar_maximo();
    Absmax[0]=max1; /*abs max 2.0ppm*/
    alturas_max[3]=max1;
    printf("\n La abs max de 2.0ppm es: %f", max1);
    delay(5000);
    printf("Patrón de 10.0ppm \n");
    /*altas2();*/
    leer_grafica();
    filtrar_datos();
    guardar_datos();
    for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco2[i];
    buscar_maximo(); /*subrutina que busca el maximo*/
    Absmax[1]=max1; /*abs max 10.0 ppm*/
    alturas_max[4]=max1;
    printf("\n La abs max de 10.0ppm es: %f", max1);
    delay(5000);
    printf("Patrón de 20.0ppm \n");
    /*altas5();*/
    leer_grafica();
    filtrar_datos();
    guardar_datos();
    for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco2[i];
    buscar_maximo(); /*subrutina que busca el maximo*/
    Absmax[2]=max1; /*abs max 20.0 ppm*/
    alturas_max[5]=max1;
    printf("\n La abs max de 20.0ppm es: %f", max1);
    delay(5000);
    cleardevice();
    calibrado_orden2(); /*subrutina de ajuste cuadr tico*/
    delay(10000);
    return;
}

*****
Subrutina que ejecuta programa de calibración
*****
void calibracion1(void)
{
    /* definiciones locales */
    int i;
    /*ciclo de limpieza inicial con cido*/
    printf("Limpieza sistema, portador por todos los canales \n");
    /*lavado_especial1();*/
    clrscr();
    /*calibración zona inferior de concentración 0.0-3.0 ppm*/
    printf("Calibrado zona 0.0-3.0ppm de nitritos \n");
    delay(20000);
    clrscr();
    /*ciclo de ambientación para cada canal*/
    printf("Ambientación de los 5 canales de trabajo \n");
    lav1();
    lav2();
}

```

```
lav4();
lav5();
lav6();
clrscr();
/*inyección de cada patrón*/
FIN=0;
do {
printf("Agua \n");
bajas1();
leer_grafica();
delay(2000);
filtrar_datos();
guardar_datos();
for (i=0;i<600;i++) Blanco1[i]=Absorf[i];
cleardevice();
printf("Quieres repetir el análisis de 0ppm? (s/n) \n\n");
if(si_o_no()==0) FIN=1;
} while (FIN==0);
FIN=0;
do {
printf("Patrón de 0.05ppm \n");
bajas2();
leer_grafica();
delay(2000);
filtrar_datos();
guardar_datos();
for (i=0;i<600;i++) Absorf[i]=Absorf[i]-Blanco1[i];
buscar_maximo();
Absmax[0]=max1;
alturas_max[0]=max1;
cleardevice();
printf("Quieres repetir el análisis de 0.05ppm? (s/n) \n\n");
if(si_o_no()==0) FIN=1;
} while (FIN==0);
FIN=0;
do {
printf("Patrón de 1.0ppm \n");
bajas5();
leer_grafica();
delay(2000);
filtrar_datos();
for (i=0;i<600;i++) Absorf[i]=Absorf[i]-Blanco1[i];
buscar_maximo();
guardar_datos();
Absmax[1]=max1;
alturas_max[1]=max1;
cleardevice();
printf("Quieres repetir el análisis de 1.0ppm? (s/n) \n\n");
if(si_o_no()==0) FIN=1;
} while (FIN==0);
FIN=0;
do {
printf("Patrón de 2.0ppm \n");
bajas6();
leer_grafica();
delay(2000);
filtrar_datos();
for (i=0;i<600;i++) Absorf[i]=Absorf[i]-Blanco1[i];
buscar_maximo();
guardar_datos();
Absmax[2]=max1;
alturas_max[2]=max1;
cleardevice();
printf("Quieres repetir el análisis de 2.0ppm? (s/n) \n\n");
if(si_o_no()==0) FIN=1;
} while (FIN==0);
calibrado_lineal(); /*subrutina de ajuste por mínimos cuadrados*/
guardar_calibrado1();
return;
}
```

```

/*calibración zona superior de concentración 0.0-20.0 ppm*/
void calibracion2(void)
{
    /* definiciones locales */
    int i;
    printf("Calibrado zona 0.0-20.0ppm de nitritos \n");
    clrscr();
    /*ciclo de ambientación para cada canal*/
    printf("Ambientación de los 2 nuevos canales de trabajo \n");
    delay(20000);
    lav2();
    lav5();
    clrscr();
    /*inyección de cada patrón*/
    FIN=0;
    do {
        printf("Agua \n");
        altas1();
        leer_grafica();
        delay(2000);
        filtrar_datos();
        guardar_datos();
        for (i=0;i<600;i++) Blanco2[i]=Absorff[i];
        clrscr();
        printf("Quieres repetir el an lisis de 0ppm? (s/n) \n\n");
        if(si_o_no()==0) FIN=1;
    } while (FIN==0);
    FIN=0;
    do {
        printf("Patrón de 2.0ppm \n");
        altas6();
        leer_grafica();
        delay(2000);
        filtrar_datos();
        guardar_datos();
        for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco2[i];
        buscar_maximo();
        Absmax[3]=max1;
        alturas_max[3]=max1;
        clrscr();
        printf("Quieres repetir el an lisis de 2ppm? (s/n) \n\n");
        if(si_o_no()==0) FIN=1;
    } while (FIN==0);
    FIN=0;
    do {
        printf("Patrón de 10.0ppm \n");
        altas2();
        leer_grafica();
        delay(2000);
        filtrar_datos();
        guardar_datos();
        for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco2[i];
        buscar_maximo();
        Absmax[4]=max1;
        alturas_max[4]=max1;
        clrscr();
        printf("Quieres repetir el an lisis de 10ppm? (s/n) \n\n");
        if(si_o_no()==0) FIN=1;
    } while (FIN==0);
    FIN=0;
    do {
        printf("Patrón de 20.0ppm \n");
        lav5();
        altas5();
        leer_grafica();
        delay(2000);
        filtrar_datos();
        guardar_datos();
        for (i=0;i<600;i++) Absorff[i]=Absorff[i]-Blanco2[i];
        buscar_maximo();
        Absmax[5]=max1;
        alturas_max[5]=max1;
        clrscr();
        printf("Quieres repetir el an lisis de 20ppm? (s/n) \n\n");

```

```
if(si_o_no()==0) FIN=1;
} while (FIN==0);
calibrado_orden2(); /*subrutina regresión segundo orden*/
guardar_calibrado2();
return;
}

/*********************************************
 Subrutina que realiza la calibración lineal
*****************************************/
void calibrado_lineal(void)
{
int i;
float xmedia=0.0, ymedia=0.0,x[5],sxx=0.0,syy=0.0,sxy=0.0;
x[0]=0.05;
x[1]=1.0;
x[2]=2.0;
for (i=0;i<3;i++)
{
xmedia+=x[i]/3.0; /* media de las x */
ymedia+=Absmax[i]/3.0; /* media de las y */
}
for (i=0;i<3;i++)
{
sxx=sxx+(x[i]-xmedia)*(x[i]-xmedia);
syy=syy+(Absmax[i]-ymedia)*(Absmax[i]-ymedia);
sxy=sxy+(x[i]-xmedia)*(Absmax[i]-ymedia);
}
b[1]=sxy/sxx; /* pendiente */
b[0]=ymedia-b[1]*xmedia; /* ordenada en el origen */
b[3]=sxy/sqrt(sxx*syy); /* coeficiente de regresión */
printf("\n\n La pendiente es: %f", b[1]);
printf("\n La ordenada en el origen: %f", b[0]);
printf("\n El coeficiente de regresión: %f", b[3]);
return;
}

/*********************************************
 Subrutina que realiza la calibración de segundo orden
*****************************************/
void calibrado_orden2()
{
a[2]=0.0;
a[1]=0.0;
a[0]=0.0; /*inicialización variables*/
a[0]=(Absmax[5]-2.25*Absmax[4]+1.25*Absmax[3])/180.0;
a[1]=(Absmax[5]-Absmax[4]-300.0*a[0])/10.0;
a[2]=Absmax[3]-4.0*a[0]-2.0*a[1];
printf("\n\n El coeficiente de segundo orden es, a0 es: %f", a[0]);
printf("\n El coeficiente de primer orden, a1 es: %f", a[1]);
printf("\n El primer coeficiente, a2 es: %f", a[2]);
return;
}

/*********************************************
 Subrutina que ejecuta programa de monitorización
*****************************************/
void monitorizacion()
{
/*ciclo de limpieza inicial con cido*/
printf("Limpieza sistema, portador por todos los canales \n");
/*lavado_especial2();*/
clrscr();
/*ciclo de ambientación para los canales 2*/
FIN=0;
do
{
printf("Ambientación del canal de trabajo \n");
lav2();
clrscr();
/*an lisis*/
printf("\n\n Muestra \n"); /*an lisis de 1 muestra*/
delay(5000);
}
```

```

calculo(); /*subrutina de control y cálculo de concentración*/
printf(" Quieres analizar otra muestra ? (S/N )");
if (si_o_no()==0) FIN=1;
}
while (FIN==0);
return;
}

/*********************************************
Subrutina que ejecuta programa para hacer el cero
*********************************************/
void hacer_cero(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
comunica_bur(velo_20_bur, respuesta);
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta);
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
esperar_bur();
return;
}

/*********************************************
Subrutina que limpia el sistema cogiendo agua por la izquierda
y sale por los canales 1,2,3,4,5 y 6
*********************************************/
void lavado_especial1(void) /*limpia todos los canales 1,2,3,4,5,6, dos veces*/
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
int i;
comunica_bur(velo_20_bur, respuesta);
for (i=0;i<3;i++)
{
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos1, respuesta); /*canal 1*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
esperar_bur();
}
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos2, respuesta); /*canal 2*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
esperar_bur();
}
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos3, respuesta); /*canal 3*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
esperar_bur();
}
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos4, respuesta); /*canal 4*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
}
}

```

```
esperar_bur();
}
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos5, respuesta); /*canal 5*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
esperar_bur();
}
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos6, respuesta); /*canal 6*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
esperar_bur();
}
return;
}

/****************************************
 Subrutina que limpia el sistema cogiendo agua por la izquierda y los canales 2 y 5
****************************************/
void lavado_especial2(void) /*limpia los canales 2,5,6, dos veces*/
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
int i;
comunica_bur(velo_20_bur, respuesta);
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos2, respuesta); /*canal 2*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
esperar_bur();
}
for (i=0;i<1;i++)
{
comunica_bur(carg_inv_3000,respuesta); /* Coge 2.5 ml de agua de la izquierda */
esperar_bur();
comunica_val(val_pos5, respuesta); /*canal 5*/
comunica_val(posicion_valvula, respuesta);
printf("%s\n", respuesta);
comunica_bur(desc_a0d,respuesta); /* Sale agua para el detector */
esperar_bur();
}
return;
}

void lectura_calibrados(void)
{
FILE *obert;
char linea[150];
if ( access("c:\\datos\\calibra1.dat",0) == 0 &&
    access("c:\\datos\\calibra2.dat",0) == 0 &&
    access("c:\\datos\\blanco1.dat",0) == 0 &&
    access("c:\\datos\\blanco2.dat",0) == 0 )
{
printf(" Quieres utilizar los ficheros de calibrados existentes ? (S/N )";
if (si_o_no()==0) return;
obert=fopen("c:\\datos\\calibra1.dat","rt");
/*En primer lugar se lee la linea y despues se traduce a numeros*/
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
sscanf(linea,"%f", &b[0]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
sscanf(linea,"%f", &b[1]);
}
```

```

fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &b[3]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &alturas_max[0]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &alturas_max[1]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &alturas_max[2]);
fclose(obert);
obert=fopen("c:\\datos\\calibra2.dat","rt");
/*En primer lugar se lee la linea y despues se traduce a numeros*/
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &a[0]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &a[1]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &a[2]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &alturas_max[3]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &alturas_max[4]);
fgets(linea,sizeof(linea),obert);
    sscanf(linea,"%f", &alturas_max[5]);
fclose(obert);
obert=fopen("c:\\datos\\blanco1.dat","rb");
    fread(&Blanco1,sizeof(Blanco1),1,obert);
fclose(obert);
obert=fopen("c:\\datos\\blanco2.dat","rb");
    fread(&Blanco2,sizeof(Blanco2),1,obert);
fclose(obert);
}
else
{
    sound(500);
    printf("!!!Atención--- No existe fichero de calibrados");
    delay(5000);
    nosound();
}
return;
}

void guardar_calibrado1(void)
{
FILE *obert;
obert=fopen("c:\\datos\\calibra1.dat","wt");
    fprintf(obert,"%f\n", b[0]);
    fprintf(obert,"%f\n", b[1]);
    fprintf(obert,"%f\n", b[3]);
    fprintf(obert,"%f\n", alturas_max[0]);
    fprintf(obert,"%f\n", alturas_max[1]);
    fprintf(obert,"%f\n", alturas_max[2]);
fclose(obert);
obert=fopen("c:\\datos\\blanco1.dat","wb");
    fwrite(&Blanco1,sizeof(Blanco1),1,obert);
fclose(obert);
return;
}

void guardar_calibrado2(void)
{
FILE *obert;
obert=fopen("c:\\datos\\calibra2.dat","wt");
    fprintf(obert,"%f\n", a[0]);
    fprintf(obert,"%f\n", a[1]);
    fprintf(obert,"%f\n", a[2]);
    fprintf(obert,"%f\n", alturas_max[3]);
    fprintf(obert,"%f\n", alturas_max[4]);
    fprintf(obert,"%f\n", alturas_max[5]);
fclose(obert);
obert=fopen("c:\\datos\\blanco2.dat","wb");
    fwrite(&Blanco2,sizeof(Blanco2),1,obert);
fclose(obert);
return;
}

```

```
int si_o_no(void)
{
char ch=0;
while (ch!='N' && ch!='n' && ch!='S' && ch!='s')  ch=bioskey(0);
if (ch=='N' || ch=='n') return 0;
if (ch=='S' || ch=='s') return 1;
return 2;
}

/*****************************************/
void guarda_mensaje( char *mensaje, char *fichero)
{
FILE *stream;
time_t ltime;
char la_frase[160];
time (&ltime);
sprintf(la_frase,"%s  %s\n",ctime( &ltime ), mensaje);
la_frase[24]=32;
stream = fopen( fichero, "a+" );
fprintf(stream,"%s", la_frase);
fclose(stream);
return;
}

/*****************************************/
Programa principal que comanda el SIA de EASI
/*****************************************/
int main(void)
{
/* definiciones locales */
char respuesta[20];
/* inicializa el COM4 */
_bios_serialcom(_COM_INIT, COM4, SETTINGS1);
clrscr();
lectura_calibrados();
clrscr();
comunica_val(init_val, respuesta); /* inicializa v lvula */
esperar_val();
comunica_bur(init_bur_der, respuesta); /* inicializa bureta */
esperar_bur();
escribir_menu();
do
{
selectmenu();
}
while (fi==1);
closegraph();
return 0;
}
```

## Apéndice 3

---

*Programa en BASIC para la gestión del sistema de análisis SIA de ión cadmio*

---

### 9.3 Descripción

Este programa permite la gestión de la bomba, la gestión de las válvulas y la frecuencia de oscilación de la válvula de tres vías.

```
REM ***** MIREIA *****
REM     SEM CONTROLADOR DE POSICAO
REM *****

DECLARE SUB porta (p, VA)
DECLARE SUB aspirar (VEL, tact, t1, p, FLAG)
DECLARE SUB bombear (VEL, t1, p, FLAG)

port% = &H220

10 CLS
SCREEN 10
OUT port% + 13, 63

REM *****DEFINIÇÃO DO ECR*****
WINDOW (1000, 1000)-(0, 0)
LINE (0, 0)-(1000, 1000), B
LINE (10, 900)-(990, 985), B
LINE (640, 50)-(965, 320), B
LOCATE 2, 22: PRINT "PROGRAMA DE CONTROLO DO SISTEMA SIA"
LOCATE 4, 4: PRINT "PORTA (1 to 8)"
LOCATE 4, 25: PRINT "TEMPO (s)"
LOCATE 4, 40: PRINT "VEL ROTA. (0-48)"
LOCATE 4, 60: PRINT "DIREÇÃO (i/a)"
LOCATE 19, 56: PRINT "TEMPO"
LOCATE 22, 62: PRINT "CICLO"
LOCATE 19, 69: PRINT "PORTA"

REM *****CARACTERISTICAS DO QUADRO*****
DIM col(4) 'define um vector de colunas para os dados no ecr,
DATA 10,27,45,65
FOR c = 1 TO 4
  READ p
  col(c) = p
NEXT c
RESTORE
REM*****INICIALIZAÇÃO DE VARIÁVEIS*****

DIM QUA(15, 4) 'este quadro vai conter os valores das variáveis
FOR I = 1 TO 15
  FOR K = 1 TO 4
    QUA(I, K) = 0
  NEXT K
NEXT I

REM*****ENTRADA DE DADOS*****
KLIN = 6
DO
  11 LOCATE KLIN, col(1): INPUT " ", DADO$
  IF DADO$ = "" THEN EXIT DO
  IF DADO$ <> "1" AND DADO$ <> "2" AND DADO$ <> "3" AND DADO$ <> "4" AND DADO$ <> "5" AND DADO$ <> "6" AND DADO$ <> "7" AND DADO$ <> "8" THEN
    BEEP
    LOCATE KLIN, col(1): PRINT SPACE$(6)
    GOTO 11
  END IF
  DADO = VAL(DADO$)
  QUA(KLIN - 5, 1) = DADO
  22 LOCATE KLIN, col(2): INPUT " ", x
  IF x < 0 THEN
    BEEP
    LOCATE KLIN, col(2): PRINT SPACE$(6)
    GOTO 22
  END IF
  QUA(KLIN - 5, 2) = x
  33 LOCATE KLIN, col(3): INPUT " ", y
  IF y < 0 OR y > 48 THEN
```

```

BEEP
LOCATE KLIN, col(3): PRINT SPACE$(6)
GOTO 33
END IF
QUA(KLIN - 5, 3) = y
55 LOCATE KLIN, col(4): INPUT " ", b$
IF LCASE$(b$) <> "a" AND LCASE$(b$) <> "i" THEN
    BEEP
    LOCATE KLIN, col(4): PRINT SPACE$(6)
    GOTO 55
END IF
IF LCASE$(b$) = "a" THEN QUA(KLIN - 5, 4) = 0
IF LCASE$(b$) = "i" THEN QUA(KLIN - 5, 4) = 1
KLIN = KLIN + 1
LOOP
3 LOCATE 20, 5: INPUT "Numero de ciclos ? ", CICLO
LOCATE 19, 5: INPUT "%tempo activo?", tact

REM*****EXECUÇÃO DAS INSTRUÇÕES*****
FOR CIC = 1 TO CICLO
FLAG = 0
LOCATE 23, 64: PRINT CIC
FOR LIN = 1 TO (KLIN - 6)
    OUT port% + 13, 63
    QUA(0, 1) = 1
    f = QUA(LIN, 4)
    p = QUA(LIN, 1)
    g = (KLIN - 6)
    h = QUA(g, 1)
    VA = QUA(LIN - 1, 1)
    CALL porta(p, VA)

    LOCATE 20, 71: PRINT p
    VEL = QUA(LIN, 3)
    t1 = QUA(LIN, 2)

    IF FLAG = 1 THEN
        OUT port% + 14, 0
        FOR xxx = 1 TO 1000
        NEXT xxx
        OUT port% + 13, (63 - 16 - 1)
        GOTO 16
    END IF
    IF QUA(LIN, 4) = 1 THEN CALL bombear(VEL, t1, p, FLAG)
    IF QUA(LIN, 4) = 0 THEN CALL aspirar(VEL, tact, t1, p, FLAG)

    IF p = 1 THEN
        FOR I = 1 TO 10000: NEXT I
        OUT port% + 13, (63 - 32)
        FOR I = 1 TO 10000
        NEXT I
    END IF

    IF FLAG = 1 THEN
        OUT port% + 14, 0
        FOR xxx = 1 TO 1000
        NEXT xxx
        OUT port% + 13, (63 - 16 - 1)
        GOTO 16
    END IF
    OUT port% + 14, 0
    FOR xxx = 1 TO 10000
    NEXT xxx
    LOCATE 20, 71: PRINT SPACE$(5)
    NEXT LIN
    OUT port% + 13, (63 - 16 - 1)

```

```
FOR qqq = 1 TO (7 - Vn) * 14000: NEXT qqq
OUT port% + 13, 63
NEXT CIC
16 LOCATE 20, 71: PRINT SPACE$(4)
LOCATE 23, 64: PRINT SPACE$(5)
LOCATE 20, 5: PRINT SPACE$(40)
LOCATE 19, 5: PRINT "
1 BEEP
LOCATE 18, 5: INPUT "Alterar as condicões (s/n) ? ", D$
IF LCASE$(D$) <> "s" AND LCASE$(D$) <> "n" THEN
    LOCATE 18, 33: PRINT SPACE$(6)
    GOTO 1
END IF
IF LCASE$(D$) = "s" THEN
    cont = KLIN - 1
    GOTO 2
END IF
LOCATE 18, 5: PRINT SPACE$(40)
IF LCASE$(D$) = "n" THEN
    GOTO 3
END IF
2 LOCATE 18, 5: PRINT SPACE$(40)
66 BEEP
LOCATE 22, 5: INPUT "Alterar quadro ou fazer um novo (a/n)? ", n$
IF LCASE$(n$) <> "n" AND LCASE$(n$) <> "a" THEN
    LOCATE 22, 5: PRINT SPACE$(42)
    GOTO 66
END IF
IF LCASE$(n$) = "a" THEN 4000
IF LCASE$(n$) = "n" THEN 10
STOP

REM*****SUB ROTINA DA PORTA*****
REM*****SUB ROTINA BOMBEAR*****
REM*****SUB ROTINA ASPIRAR*****


REM *****ALTERAÇAO DE QUADRO*****
4000
LOCATE 22, 5: PRINT SPACE$(45)
FOR hh = 1 TO cont - 5
    LOCATE hh + 5, col(1): INPUT " ", DADO$
    IF DADO$ <> "" THEN
        DADO = VAL(DADO$)
        QUA(hh, 1) = DADO
    END IF
    LOCATE hh + 5, col(2): INPUT " ", x$
    IF x$ <> "" THEN
        x = VAL(x$)
        QUA(hh, 2) = x
    END IF
    LOCATE hh + 5, col(3): INPUT " ", y$
    IF y$ <> "" THEN
        y = VAL(y$)
        QUA(hh, 3) = y
    END IF
    LOCATE hh + 5, col(4): INPUT " ", b$
    IF b$ <> "" THEN
        IF LCASE$(b$) = "i" THEN QUA(hh, 4) = 1
        IF LCASE$(b$) = "a" THEN QUA(hh, 4) = 0
    END IF
NEXT hh
GOTO 3

SUB aspirar (VEL, tact, t1, p, FLAG)
port% = &H220
```

```
REM ***** ACTIVACAO DA BOMBA *****
tt = TIMER
```

```

NUM = 0
DO
TENSAO = INT(VEL / 45 * 4095)
lb% = TENSAO - INT(TENSAO / 256) * 256
hb% = (TENSAO - lb%) / 256
OUT port% + 4, lb%
OUT port% + 5, hb%
OUT port% + 14, 12
LOCATE 20, 56: PRINT USING "##.#####"; TIMER - tt
COLOR 2
LOCATE 23, 5: PRINT "Para interromper prima P..."
COLOR 3

IF p = 3 THEN
    OUT port% + 14, (12 + 16)
    FOR c = 1 TO tact * 1 * 201
        NEXT c
    OUT port% + 14, 12
    FOR c = 1 TO ((100 - tact) * 1) * 201
        NEXT c
    LOCATE 22, 48: PRINT NUM + 1
    NUM = NUM + 1

    IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
        LOCATE 23, 64: PRINT SPACE$(6)
        LOCATE 20, 56: PRINT SPACE$(7)
        LOCATE 20, 71: PRINT SPACE$(5)
        FLAG = 1
        EXIT DO
    END IF
END IF
LOOP WHILE TIMER - tt <= t1
OUT port% + 14, 0
LOCATE 23, 5: PRINT " "
LOCATE 20, 56: PRINT SPACE$(7)
LOCATE 22, 48: PRINT " "
END SUB

SUB bombear (VEL, t1, p, FLAG)
port% = &H220

```

```

REM ***** ACTIVACAO DA BOMBA *****
tt = TIMER
DO
TENSAO = INT(VEL / 45 * 4095)
lb% = TENSAO - INT(TENSAO / 256) * 256
hb% = (TENSAO - lb%) / 256
OUT port% + 4, lb%
OUT port% + 5, hb%
OUT port% + 14, 4
LOCATE 20, 56: PRINT USING "##.#####"; TIMER - tt
COLOR 2
LOCATE 23, 5: PRINT "Para interromper prima P..."
COLOR 3
IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
    LOCATE 23, 64: PRINT SPACE$(6)
    LOCATE 20, 56: PRINT SPACE$(7)
    LOCATE 20, 71: PRINT SPACE$(5)
    FLAG = 1
    EXIT DO
END IF
LOOP WHILE TIMER - tt <= t1
OUT port% + 14, 0
LOCATE 23, 5: PRINT " "
LOCATE 20, 56: PRINT SPACE$(7)
LOCATE 20, 71: PRINT SPACE$(5)
END SUB

SUB porta (p, VA)
port% = &H220

```

OUT port% + 13, (63 - 16 - p)

```
IF p > VA THEN
    TESP = (p - VA) * 6 / 8
    TTT = TIMER
    DO
        LOOP WHILE TIMER - TTT <= TESP
    END IF
    IF p < VA THEN
        TESP = ((8 - VA) + p) * 6 / 8
        TTT = TIMER
        DO
            LOOP WHILE TIMER - TTT <= TESP
        END IF

    IF p = 1 THEN
        FOR I = 1 TO 1000: NEXT I
        OUT port% + 13, (63 - 16 - p - 32)
        FOR I = 1 TO 10000
        NEXT I
    END IF

    OUT port% + 13, 63

    END SUB
```

## Apéndice 4

---

### *Programa en Visual-BASIC para la gestión integrada del sistema a escala microchip*

---

#### **9.4 Descripción**

Este programa ha sido realizado en el entorno VISUAL BASIC, se ha desarrollado como un conjunto de subrutinas con funciones específicas y simultáneamente se han creado las pantallas que permiten la interacción con el usuario. Este programa no tiene una secuencia de ejecución, sino que las subrutinas se ejecutan indiferentemente desde otras subrutinas, desde teclado o pantalla, fichero o en función del tiempo transcurrido desde un punto determinado.

Este programa permite la gestión integral del sistema de gestión de fluidos híbrido desarrollado. Integrando el control de válvulas, microbureta, adquisición de datos, gestión de procedimientos de análisis y tratamiento de datos.

```
*****
global.BAS
*****
Attribute VB_Name = "Module2"
Global Const MaxEntries = 255
Global DeviceHandle As Long
Global ptDevGetFeatures As PT_DeviceGetFeatures
Global lpDevFeatures As DEVFEATURES
Global devicelist(0 To MaxEntries) As PT_DEVLIST
Global SubDevicelist(0 To MaxEntries) As PT_DEVLIST
Global ErrCode As Long
Global szErrMsg As String * 80
Global bRun As Boolean

Global IpAIConfig As PT_AIConfig
Global AiVolln As PT_AIVoltageIn
Global ptAIGetConfig As PT_AIGetConfig
Global AiCtrMode As Integer

Global IpDioPortMode As PT_DioSetPortMode
Global IpDioWritePort As PT_DioWritePortByte

*****
proced_analisis.BAS
*****
Attribute VB_Name = "proced_analisis"
Public Sub procedimiento(index As Integer)

Principal.ConfigDb.RecordSource = Principal.TablasDbLista
If index = 0 Then
    Principal.ConfigDb.Refresh
    Principal.ConfigDb.Recordset.Edit
    Principal.ConfigDb.Recordset.MoveLast
    numvar = Principal.ConfigDb.Recordset.RecordCount
    Principal.ConfigDb.Recordset.MoveFirst
Else
    Principal.ConfigDb.Recordset.MoveNext
End If
tiempo_accion = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(0).value
micro_acc_boo = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(1).value
aspir_acc_boo = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(2).value
caudal_acc = caudal1
valvula_boo(0) = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(3).value
valvula_boo(1) = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(4).value
valvula_boo(2) = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(5).value
valvula_boo(3) = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(6).value
valvula_boo(4) = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(7).value
adquisi_boo = Principal.ConfigDb.Recordset.Fields(8).value

Principal.timer_analisis.Enabled = False
Principal.timer_analisis_2.Enabled = False
Principal.timer_analisis_3.Enabled = False
Principal.timer_analisis_4.Enabled = False
Principal.timer_analisis_5.Enabled = False
Principal.Timer3.Enabled = False
'calcula el tiempo de la siguiente acción he añadido 2,5 segundos de espera
'para V=2500microL y 1,2 para V=250microL
'he añadido un segundo contador para poder llegar mas de 30 segundos
tiempo_espera = 1700
tiempo_des_adqui = tiempo_accion * 1000
tiempo_accion = tiempo_accion * 1000 + tiempo_espera

If tiempo_accion > 30000 Then
    Principal.timer_analisis_2.Interval = 30000
    Principal.timer_analisis_2.Enabled = True
    If tiempo_des_adqui < 30001 Then
        Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui
        Principal.Timer3.Enabled = True
    End If
Else
    Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui
    Principal.Timer3.Enabled = True
    Principal.timer_analisis.Interval = tiempo_accion
    Principal.timer_analisis.Enabled = True
```

```

End If

If adquisi_boo = True Then
    Principal.Timer1.Enabled = True
    Principal.ShapeAdqui.FillColor = &HFF&
Else
    Principal.Timer1.Enabled = False
    Principal.ShapeAdqui.FillColor = &H808080
End If

If micro_acc_boo = True Then
    microbureta
Else
    micro_funciona = False
    micro_aspira = False
    Principal.Text6.Text = 0
    Principal.Text7.Text = 0
    Principal.shapLed(5).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(6).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(7).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(13).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(14).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(15).FillColor = &H808080
End If
valvula
'activa el tiempo para la siguiente orden
'Principal.timer_analisis.Enabled = True
paso_programa = index
End Sub

Public Sub microbureta()
'se ha de rellenar con toda la información
kk = caudal_acc * (tiempo_accion - tiempo_espera) / 1000
pasos = Round(3000 * (kk / Val(Principal.Volumén_jeringa)))
'vel=2 * pasos / tiempo_accion
'cambiar dependiendo de lo que se hace
'comunica_micro ("v" + Str$(vel))
'comunica_micro ("c" + Str$(vel))
'comunica_micro ("V" + Str$(vel))
'si se ha de aspirar
If aspir_acc_boo = True Then
    micro_funciona = True
    micro_aspira = True
    Form1.List1.AddItem "a" & Time
    Principal.shapLed(5).FillColor = &HFF00&
    Principal.shapLed(6).FillColor = &HFF00&
    Principal.shapLed(7).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(13).FillColor = &HFF00&
    Principal.shapLed(14).FillColor = &HFF00&
    Principal.shapLed(15).FillColor = &H808080
    Principal.Text6.Text = caudal_acc
    Principal.Text7.Text = (tiempo_accion - tiempo_espera) / 1000
    'cambiar dependiendo de lo que se hace
    comunica_micro ("IP" + Str$(pasos))
Else
    micro_funciona = True
    micro_aspira = False
    Principal.shapLed(5).FillColor = &HFF00&
    Principal.shapLed(6).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(7).FillColor = &HFF00&
    Principal.shapLed(13).FillColor = &HFF00&
    Principal.shapLed(14).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(15).FillColor = &HFF00&
    Principal.Text6.Text = caudal_acc
    Principal.Text7.Text = (tiempo_accion - tiempo_espera) / 1000
    'cambiar dependiendo de lo que se hace
    comunica_micro ("OD" + Str$(pasos))
End If
End Sub

Public Function DoBit(bit As Integer) As Integer
Dim i As Integer
DoBit = 1
If bit >= 1 Then

```

```
For i = 1 To bit
    DoBit = DoBit * 2
Next i
End If
End Function

Public Sub valvula()
Dim i As Integer
For i = 0 To 4
    If valvula_boo(i) = True Then
        Principal.shapLed(i).FillColor = &HFF&
        Principal.shapLed(i + 8).FillColor = &HFF&
    End If
    If valvula_boo(i) = False Then
        Principal.shapLed(i).FillColor = &H808080
        Principal.shapLed(i + 8).FillColor = &H808080
    End If
Next i
'cambiar el valor de la salida digital para las válvulas
DoValue = 0
For i = 0 To 4
    If (valvula_boo(i) = True) Then
        DoValue = DoValue + DoBit(i)
    End If
Next i
'actuar en la placa
IpDioWritePort.Port = IpDioPortMode.Port
IpDioWritePort.Mask = 255
IpDioWritePort.state = DoValue
ErrCde = DRV_DioWritePortByte(DeviceHandle, IpDioWritePort)
If (ErrCde <> 0) Then
    DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
    Response = MsgBox(szszErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
    Exit Sub
End If
End Sub

Public Sub apaga_todo()
'apaga color de adquisición
    Principal.ShapeAdqui.FillColor = &H808080
'apaga micro
    micro_funciona = False
    micro_aspira = False
    Principal.shapLed(5).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(6).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(7).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(13).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(14).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(15).FillColor = &H808080
    Principal.Text7.Text = 0
    Principal.Text6.Text = 0
'cierra válvulas
For i = 0 To 4
    Principal.shapLed(i).FillColor = &H808080
    Principal.shapLed(i + 8).FillColor = &H808080
Next i
'para la adquisición de datos
    Principal.Timer1.Enabled = False
    anal_activo = False
If numAnal < Principal.numrep Then analysis
End Sub

Public Sub analysis()
anal_activo = True
numAnal = numAnal + 1
Principal.numanalisis.Text = Str(Format(numAnal, "00")) + " de" + Str(Format(Principal.numrep, "00"))
hora_inicio = Now
If numAnal = 1 Then a = 0
Principal.Text5.Text = cronometre(Now)
Principal.etiq_tiempo.Caption = Principal.Text5.Text
If numAnal = 1 Then
    Principal.dta.RecordSource = "datos"
    Principal.dta.Refresh
    'dta.Recordset.Edit
```

```

'dta.Recordset.MoveFirst
Do While Not Principal.dta.Recordset.EOF
    Principal.dta.Recordset.Delete
    Principal.dta.Recordset.MoveNext
Loop
End If
Principal.crono.Enabled = True
Principal.timer_analisis.Enabled = True
Principal.shapLed2.FillColor = &HFF&
procedimiento (0)
End Sub

*****
MICROS.BAS
*****
Attribute VB_Name = "micros"
Public Sub comunica_micro(Missatge As String)
Principal.MSComm1.PortOpen = True
Principal.MSComm1.InputLen = 0
Principal.MSComm1.Output = "/1" + Missatge + "R" + Chr$(13)
Principal.MSComm1.PortOpen = False
End Sub

Public Sub comunica_val(Missatge As String)
Principal.MSComm1.PortOpen = True
Principal.MSComm1.InputLen = 0
Principal.MSComm1.Output = "/2" + Missatge + "R" + Chr$(13)
Principal.MSComm1.PortOpen = False
End Sub

*****
declaraciones.BAS
*****
Attribute VB_Name = "Declaraciones"
Public mat() As Double
Public tiempo_analisis() As Double
Public hora_inicio As Double
Public micro_funciona As Boolean
Public micro_aspira As Boolean
Public micro_impulsa As Boolean
Public alarma_volumen As Boolean
Public numAnal As Integer
Public anal_activo As Boolean
Public a As Double
Public pasos As Integer
Public numvar As Integer
Public numval As Integer
Public Hz(0 To 20) As Double
Public caudal1 As Double
'variables de registro de programa
Public tiempo_accion As Single
Public tiempo_espera As Single
Public tiempo_des_adqui As Single
Public micro_acc_boo As Boolean
Public aspir_acc_boo As Boolean
Public caudal_acc As Single
Public valvula_boo(5) As Boolean
Public adquisi_boo As Boolean
Public pasc_programa As Integer
'Public veloci As Integer
Public path_datos
Public NombreArchivo As String
Public fecha_hora As String

*****
TEMPS.BAS
*****
Attribute VB_Name = "Temps"

Public Function cronometre(hora_inicial As Variant) As String
crono = Timer - Hour(hora_inicial) * 3600 - Minute(hora_inicial) * 60 _
- Second(hora_inicial)
reste = crono Mod 3600
hores = CInt((crono - reste) / 3600)

```

```
restem = reste Mod 60
minuts = CInt((reste - restem) / 60)
restes = restem Mod 1
segons = CInt((restem - restes))
'cronometre = Str(Format(hores, "00")) + ":" + Str(Format(minuts, "")) + ":" + Str(Format(segons, "00"))
cronometre = Str(Format(minuts, "")) + ":" + Str(Format(segons, "00"))
'Dades(0).valor = (hores + minuts / 60 + segons / 3600)
End Function

Public Function tiempo_anal(hora_inicial As Variant) As Double
tiempo_anal = Timer - Hour(hora_inicial) * 3600 - Minute(hora_inicial) * 60 - Second(hora_inicial)
End Function

Public Sub delay(ms As Integer)
waited = False
'Principal.timerretardo.Interval = ms
'Principal.timerretardo.Enabled = True
'Do Until waited = True
'DoEvents
'Loop
'Principal.timerretardo.Enabled = False
End Sub

*****
adquisición.frm
*****
Private Sub cmdExit_Click()
Unload frmRun
frmDevSel.cmdExit.SetFocus
End Sub

Private Sub cmdRead_Click()
Dim tt As Long
Dim voltage As Single
tmrRead.Enabled = False
AiVolln.chan = lpAIConfig.DasChan
AiVolln.gain = lpAIConfig.DasGain
AiVolln.TrigMode = AiCtrMode
AiVolln.voltage = DRV_GetAddress(voltage)
shapLed.FillColor = QBColor(12)
ErrCde = DRV_AIVoltageIn(DeviceHandle, AiVolln)
If (ErrCde <> 0) Then
DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
Exit Sub
End If
UpDateValue (voltage)
End Sub

Private Sub cmdRead_MouseDown(Button As Integer, Shift As Integer, X As Single, Y As Single)
shapLed.FillColor = QBColor(12)
End Sub

Private Sub Form_Load()
hscrlFreq_Change
End Sub

Private Sub Form_Unload(Cancel As Integer)
frmDevSel.Show
End Sub

Private Sub hscrlFreq_Change()
If hscrlFreq.value = 0 Then
tmrRead.Interval = 0
Else
tmrRead.Interval = 10000 / hscrlFreq.value
End If
txtSample.Text = Format((hscrlFreq.value / 10), "##0.00")
' "Read One Shot" would disable the "trmREAD" Timer,
' so it need to enable here.
tmrRead.Enabled = True
tmrLed.Enabled = True
End Sub
```

```

Private Sub tmrLed_Timer()
    shapLed.FillColor = QBColor(8)
End Sub

Private Sub tmrRead_Timer()
    Dim voltage As Single
    shapLed.FillColor = QBColor(12)
    AiVolln.chan = IpAIConfig.DasChan
    AiVolln.gain = IpAIConfig.DasGain
    AiVolln.TrigMode = AiCtrMode
    AiVolln.voltage = DRV_GetAddress(voltage)
    ErrCde = DRV_AIVoltageIn(DeviceHandle, AiVolln)
    If (ErrCde <> 0) Then
        DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
        Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
        Exit Sub
    End If
    UpDateValue (voltage)
End Sub

Private Sub UpDateValue(fValue As Single)
    ' Since the output box is too small to display all the digits
    ' of the input voltage, so it must use to format to get better
    ' display.
    txtVoltRead.Text = Format(fValue, "###0.00")
End Sub

Private Sub txtVoltRead_Click()
    tmrRead.Enabled = True
    tmrLed.Enabled = True
End Sub

*****
Captar base de datos.frm
*****
Attribute VB_Name = "Form1"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = False
Attribute VB_PredeclaredId = True
Attribute VB_Exposed = False

Private Sub Form_Load()
    ' poner el programa de captación de datos de la base de datos o en otro sitio donde haga falta
    Dim stables(1) As String
    stables(0) = "Table1"
    stables(1) = "Table2"
    PopulateFieldListControl "D:\usuarios\MIreia\oriol\proyecto1\Configuración.mdb", Combo1, stables
End Sub

Public Sub PopulateFieldListControl(DBPath As String, ListControl As Object, TableNames() As String, Optional Qualify As
Boolean = False)
    Dim ICtr As Long, ICnt As Long
    Dim oFields As Collection
    Dim i As Integer
    Dim sItem As String, sTest As String
    Dim iTableStart As Integer, iTableEnd As Integer
    Dim db As DAO.Database
    Dim td As DAO.TableDef
    iTableStart = LBound(TableNames)
    iTableEnd = UBound(TableNames)
    On Error Resume Next
    ListControl.AddItem "a"
    ListControl.Clear
    If Err.Number > 0 Then Exit Sub
    sTest = Dir(DBPath)
    If sTest = "" Then Exit Sub
    Set db = Workspaces(0).OpenDatabase(DBPath)
    If Err.Number > 0 Then Exit Sub
    For i = iTableStart To iTableEnd
        Set td = db.TableDefs(TableNames(i))
        If Err.Number > 0 Then
            db.Close
            Exit Sub
        End If
    End If

```

```
Next
For i = iTableStart To iTableEnd
    Set td = db.TableDefs(TableNames(i))
    Set oFields = FieldNames(td)
    ICnt = oFields.Count
    For ICtr = 1 To ICnt
        sItem = IIf(Qualify, TableNames(i) & "." & oFields(ICtr), oFields(ICtr))
        ListControl.AddItem sItem
    Next
Next
db.Close
End Sub

Private Function FieldNames(td As DAO.TableDef) As Collection
Dim oCol As New Collection
Dim i As Integer
For i = 1 To td.Fields.Count
    oCol.Add td.Fields(i - 1).Name
Next
Set FieldNames = oCol
End Function
End Function

*****
Form1.frm
*****
Attribute VB_Name = "Principal"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = False
Attribute VB_PredeclaredId = True
Attribute VB_Exposed = False
Public a As Integer

Public Sub grafica()
dta.RecordSource = "datos"
dta.Refresh
dta.Recordset.Sort = "Orden"
If Principal.dta.Recordset.EOF Then Exit Sub
dta.Recordset.Edit
dta.Recordset.MoveLast
numval = dta.Recordset.RecordCount - 1
dta.Recordset.MoveFirst
If numval > 0 Then
    ReDim mat(1 To numval, 1 To 2) As Double
    ReDim tiempo_analisis(1 To numval) As Double
    For i = 1 To numval
        mat(i, 1) = dta.Recordset.Fields("Orden").value
        mat(i, 2) = dta.Recordset.Fields("Abs").value
        tiempo_analisis(i) = dta.Recordset.Fields("tiempo").value
        dta.Recordset.MoveNext
    Next
    dta.Refresh
    MSChart1.ChartData = mat
    MSChart1.Plot.UniformAxis = False
End If
End Sub

Private Sub CmdButAdq_Click()
If anal_activo = False And Principal.Timer1.Enabled = False Then
    Principal.dta.RecordSource = "datos"
    Principal.dta.Refresh
    If Not Principal.dta.Recordset.EOF Then Principal.dta.Recordset.MoveFirst
    Do While Not Principal.dta.Recordset.EOF
        Principal.dta.Recordset.Delete
        Principal.dta.Recordset.MoveNext
    Loop
    a = 0
End If
If Principal.Timer1.Enabled = True Then
    Principal.Timer1.Enabled = False
    Principal.crono.Enabled = False
    adquisi_boo = False
    ShapeAdqui.FillColor = &H808080
Else

```

```

hora_inicio = Now
Principal.Timer1.Enabled = True
Principal.crono.Enabled = True
adquisi_boo = True
ShapeAdqui.FillColor = &HFF&
End If
End Sub

Private Sub Command1_Click()
numAnal = Principal.numrep
Principal.crono.Enabled = False
Principal.timer_analisis.Enabled = False
Principal.numanalisis.Text = "parada manual"
shapLed2.FillColor = &H808080
anal_activo = False
apaga_todo
End Sub

Private Sub CheckVal_Click(index As Integer)
Dim i As Integer
If CheckVal(index).value = 1 Then
    shapLed(index).FillColor = &HFF&
    shapLed(index + 8).FillColor = &HFF&
End If
If CheckVal(index).value = 0 Then
    shapLed(index).FillColor = &H808080
    shapLed(index + 8).FillColor = &H808080
End If
'cambiar el valor de la salida digital para las válvulas
DoValue = 0
For i = 0 To 4
    If (CheckVal(i).value = 1) Then
        DoValue = DoValue + DoBit(i)
    End If
Next i
'actuar en la placa
IpDioWritePort.Port = IpDioPortMode.Port
IpDioWritePort.Mask = 255
IpDioWritePort.state = DoValue
ErrCde = DRV_DioWritePortByte(DeviceHandle, IpDioWritePort)
If (ErrCde <> 0) Then
    DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
    Response = MsgBox(szszErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
    Exit Sub
End If
End Sub

Public Function DoBit(bit As Integer) As Integer
Dim i As Integer
DoBit = 1
If bit >= 1 Then
    For i = 1 To bit
        DoBit = DoBit * 2
    Next i
End If
End Function

Private Sub CmdButAspirar_Click()
pasos = 3000 * (Val(Text6.Text) * Val(Text7.Text) / Val(Principal.Volumén_jeringa))
vel = 2 * pasos / Val(Text7.Text)
'cambiar dependiendo de lo que se hace
comunica_micro ("v" + Str$(vel))
comunica_micro ("c" + Str$(vel))
comunica_micro ("V" + Str$(vel))
If micro_funciona = False Then
    micro_funciona = True
    micro_aspira = True
comunica_micro ("IP" + Str$(pasos))
    shapLed(5).FillColor = &HFF00&
    shapLed(6).FillColor = &HFF00&
    shapLed(13).FillColor = &HFF00&
    shapLed(14).FillColor = &HFF00&
Else
    micro_funciona = False

```

```
micro_aspira = False
shapLed(5).FillColor = &H808080
shapLed(6).FillColor = &H808080
shapLed(13).FillColor = &H808080
shapLed(14).FillColor = &H808080
End If
End Sub

Private Sub CmdButGuardar_Click()
Dim i, MenRes As Integer
Dim mensaje As String
'preguntar si quieres guardar un comentario
MenRes = MsgBox("quieres introducir un comentario en el fichero", vbYesNo, "grabando el análisis")
If MenRes = 6 Then
    mensaje = InputBox("Escribe el comentario", "Comentario del análisis")
End If
'calcular el nombre de fichero para guardar datos y enseñarlo por la pantalla
fecha_hora = Str(Hour(Now)) + Str(Minute(Now)) + Str(Day(Now)) + Str(Month(Now))
NombreArchivo = path_datos + fecha_hora + ".dat"
Open NombreArchivo For Output As #1
For i = 1 To numval
    Print #1, Format(tiempo_analisis(i), "##000##"), mat(i, 1), Format(mat(i, 2), "##0.000")
Next i
Print #1, mensaje
Print LOF(1)
Close
End Sub

Private Sub CmdButImpulsar_Click()
pasos = 3000 * (Val(Text6.Text) * Val(Text7.Text) / Val(Principal.Volumén_jeringa))
vel = 2 * pasos / Val(Text7.Text)
'cambiar dependiendo de lo que se hace
comunica_micro ("v" + Str$(vel))
comunica_micro ("c" + Str$(vel))
comunica_micro ("V" + Str$(vel))
If micro_funciona = False Then
    micro_funciona = True
    micro_aspira = True
comunica_micro ("OD" + Str$(pasos))
    shapLed(5).FillColor = &HFF00&
    shapLed(7).FillColor = &HFF00&
    shapLed(13).FillColor = &HFF00&
    shapLed(15).FillColor = &HFF00&
Else
    micro_funciona = False
    micro_aspira = False
    shapLed(5).FillColor = &H808080
    shapLed(7).FillColor = &H808080
    shapLed(13).FillColor = &H808080
    shapLed(15).FillColor = &H808080
End If
End Sub

Private Sub CmdButInicio_Click()
numAnal = 0
a = 0
analisis
End Sub

Private Sub Command2_Click()
Form1.Show
End Sub

Private Sub crono_Timer()
Principal.etiq_tiempo.Caption = cronometre(hora_inicio)
Principal.Text5.Text = Principal.etiq_tiempo.Caption
If adquisi_boo = True Then grafica
End Sub

Private Sub HScroll_freq_Change()
Txtfreq.Text = HScroll_freq.value
Principal.Timer1.Interval = 1000 / HScroll_freq.value
End Sub
```

```

Private Sub numrep_Change()
num_ana.Text = numrep
End Sub

Private Sub timer_analisis_2_Timer()
Principal.timer_analisis_2.Enabled = False
If tiempo_accion > 60000 Then
    Principal.timer_analisis_3.Interval = 30000
    Principal.timer_analisis_3.Enabled = True
    If tiempo_des_adqui < 60001 Then
        Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui - 30000
        Principal.Timer3.Enabled = True
    End If
Else
    Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui - 30000
    Principal.Timer3.Enabled = True
    Principal.timer_analisis.Interval = tiempo_accion - 30000
    Principal.timer_analisis.Enabled = True
End If
End Sub

Private Sub timer_analisis_3_Timer()
Principal.timer_analisis_3.Enabled = False
If tiempo_accion > 90000 Then
    Principal.timer_analisis_4.Interval = 30000
    Principal.timer_analisis_4.Enabled = True
    If tiempo_des_adqui < 90001 Then
        Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui - 60000
        Principal.Timer3.Enabled = True
    End If
Else
    Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui - 60000
    Principal.Timer3.Enabled = True
    Principal.timer_analisis.Interval = tiempo_accion - 60000
    Principal.timer_analisis.Enabled = True
End If
End Sub

Private Sub timer_analisis_4_Timer()
Principal.timer_analisis_4.Enabled = False
If tiempo_accion > 120000 Then
    Principal.timer_analisis_5.Interval = 30000
    Principal.timer_analisis_5.Enabled = True
    If tiempo_des_adqui < 120001 Then
        Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui - 90000
        Principal.Timer3.Enabled = True
    End If
Else
    Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui - 90000
    Principal.Timer3.Enabled = True
    Principal.timer_analisis.Interval = tiempo_accion - 90000
    Principal.timer_analisis.Enabled = True
End If
End Sub

Private Sub timer_analisis_5_Timer()
Principal.timer_analisis_5.Enabled = False
Principal.timer_analisis.Interval = tiempo_accion - 120000
Principal.timer_analisis.Enabled = True
Principal.Timer3.Interval = tiempo_des_adqui - 120000
Principal.Timer3.Enabled = True
End Sub

Private Sub timer_analisis_Timer()
'espera a la siguiente orden
paso_programa = paso_programa + 1
If paso_programa = numvar Then
    Principal.timer_analisis.Enabled = False
    Principal.crono.Enabled = False
    Principal.shapLed2.FillColor = &H808080
    apaga_todo
Else
    procedimiento (paso_programa)
End If

```

```
End If
End Sub

Private Sub Timer2_Timer()
Dim sItem As String
Dim i As Integer
Principal.TablasDbLista.Clear
Principal.ConfigDb.Refresh
For i = 0 To Principal.ConfigDb.Database.TableDefs.Count - 1
    sItem = Principal.ConfigDb.Database.TableDefs(i).Name
    If (Left(sItem, 4) <> "MSys") And (sItem <> "plantilla") Then TablasDbLista.AddItem sItem
Next i
Principal.TablasDbLista.Text = sItem
Principal.Timer2.Enabled = False
'enseñar en la tabla el método por defecto (el último de la lista)
TablasDbLista_Click
End Sub

Private Sub Form_Load()
Hz(0) = 170
Hz(1) = 160
Hz(2) = 150
Hz(3) = 140
Hz(4) = 130
Hz(5) = 120
Hz(6) = 110
Hz(7) = 100
Hz(8) = 90
Hz(9) = 80
Hz(10) = 70
Hz(11) = 60
Hz(12) = 50
Hz(13) = 40
Hz(14) = 30
Hz(15) = 20
Hz(16) = 18
Hz(17) = 16
Hz(18) = 14
Hz(19) = 12
Hz(20) = 10
Principal.Timer1.Enabled = False
Principal.timer_analisis.Enabled = False
Principal.crono.Enabled = False
alarma_volumen = False
path_datos = "C:\gesfluid\proyecto1bis\datos"
Text1.Text = Volumen_jeringa
Principal.Timer1.Interval = 1000 / HScroll_freq.value
comunica_micro ("Z")
'dta.RecordSource = "datos"
'dta.Refresh
'dta.Recordset.Edit
'dta.Recordset.MoveLast
'a = dta.Recordset.Fields("Hora").Value
'dta.Refresh
'Text2.Text = a
End Sub

Private Sub TablasDbLista_Click()
Dim i, j As Integer
ConfigDb.RecordSource = TablasDbLista
ConfigDb.Refresh
ConfigDb.Recordset.Edit
ConfigDb.Recordset.MoveLast
numvar = ConfigDb.Recordset.RecordCount
ConfigDb.Recordset.MoveFirst
    alarma_vol.Visible = False
    alarma_volumen = False
With taulametode
    .Clear
    .CellAlignment = Center
    .Row = 0
    For i = 1 To ConfigDb.Recordset.Fields.Count
        .Col = i
        .Text = ConfigDb.Recordset.Fields(i - 1).Name
    Next i
End With
End Sub
```

```

Next
    .Col = 0
    For i = 1 To numvar
        .Row = i
        .Text = "orden " + Str(i)
    Next
    ConfigDb.Recordset.MoveFirst
    For j = 1 To numvar
        .Row = j
        For i = 1 To ConfigDb.Recordset.Fields.Count
            .Col = i
            .Text = ConfigDb.Recordset.Fields(i - 1).value
        Next
        'comprueba error volumen jeringa
        vol = ConfigDb.Recordset.Fields(0) * ConfigDb.Recordset.Fields(3)
        If vol > Val(Volumén_jeringa) Then alarma_volumen = True
        ConfigDb.Recordset.MoveNext
    Next
    ConfigDb.Refresh
End With
If alarma_volumen = True Then
    alarma_vol.Visible = True
End If
End Sub

Private Sub Timer1_Timer()
Dim voltage As Single
'LLAMAR a la adquisición de datos
AiVolln.chan = IpAIConfig.DasChan
AiVolln.gain = IpAIConfig.DasGain
AiVolln.TrigMode = AiCtrMode
AiVolln.voltage = DRV_GetAddress(voltage)
ErrCde = DRV_AIVoltageIn(DeviceHandle, AiVolln)
If (ErrCde <> 0) Then
    DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
    Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
    Exit Sub
End If
a = a + 1
dta.RecordSource = "datos"
dta.Refresh
If a > 1 Then dta.Recordset.MoveLast
dta.Recordset.AddNew
dta.Recordset.Fields("Hora") = Now
dta.Recordset.Fields("Orden") = a
dta.Recordset.Fields("tiempo") = tiempo_anal(hora_inicio)
'factor de corrección del voltage (se tendría que buscar por qué pasa-
'- de esta manera en la escala 0-2V el voltaje se corresponde con la salida del detector,
'si se utiliza la escala 0-1V el voltaje medido por placa tiene un valor 60% superior)
voltage = 0.626 * voltage
pr = Format(voltage, "#0.000")
dta.Recordset.Fields("Abs") = pr
dta.Recordset.Update
Text2.Text = Format(voltage, "#0.000")
Text3.Text = Format(voltage, "#0.000")
End Sub

Private Sub Timer3_Timer()
Principal.Timer3.Enabled = False
Principal.Timer1.Enabled = False
End Sub

Private Sub vel_bur_Scrol_Change()
vel_micro.Text = vel_bur_Scrol
n = Int(Val(vel_micro.Text)) - 20
'falta calcular el caudal y poner que se actualice al principio solo
caudal1 = Volumén_jeringa * Hz(n) / 6000
caudal.Text = Str$(caudal1)
comunica_micro ("S" + Str$(vel_bur_Scrol))
End Sub

Private Sub Volumén_jeringa_Click()
Text1.Text = Volumén_jeringa
End Sub

```

```
*****
frmstart.frm
*****
Attribute VB_Name = "frmDevSel"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = False
Attribute VB_PredeclaredId = True
Attribute VB_Exposed = False
Dim lpDEVCONFIG_AI As DEVCONFIG_AI
Dim lpAIGetConfig As PT_AIGetConfig
Dim gnNumOfSubdevices As Integer
Dim bRun As Boolean
Private Sub cmdExit_Click()
    If bRun Then
        ErrCde = DRV_DeviceClose(DeviceHandle)
        If (ErrCde <> 0) Then
            DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
            Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
        End If
    End If
    End
End Sub

Private Sub cmdRun_Click()
    Dim tempNum As Integer
    'parte analogica (se tendria que eliminar como lo de la parte digital)
    tempNum = lstVoltageRange.ListIndex
    AiCtrMode = lpDEVCONFIG_AI.usGainCtrMode
    lpAIConfig.DasChan = lstChannel.ListIndex
    ' Gain code no use for ADAM series
    If gnNumOfSubdevices = 0 Then
        lpAIConfig.DasGain = lpDevFeatures.gIGainList(tempNum).usGainCde
    End If
    ErrCde = DRV_AIConfig(DeviceHandle, lpAIConfig)
    If (ErrCde <> 0) Then
        DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
        Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
        Exit Sub
    End If
    'parte digital comprobar a partir de aqui
    lpDioPortMode.Port = 0
    lpDioPortMode.dir = OUTPORT
    ' not every digital I/O card could use DRV_DioSetPortMode function
    If lpDevFeatures.usDIOPort > 0 Then
        ErrCde = DRV_DioSetPortMode(DeviceHandle, lpDioPortMode)
        If (ErrCde <> 0) Then
            DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
            Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
            Exit Sub
        End If
    End If
    Principal.Show
    'Principal.cmdRead.SetFocus
    frmDevSel.Hide
End Sub

Private Sub Form_Load()
    Dim gnNumOfDevices As Integer
    Dim nOutEntries As Integer
    Dim i, ii As Integer
    Dim tt As Long
    Dim tempStr As String
    bRun = False
    ' Add type of PC Laboratory Card
    tt = DRV_GetAddress(devicelist(0))
    ErrCde = DRV_DeviceGetList(tt, MaxEntries, nOutEntries)
    If (ErrCde <> 0) Then
        DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
        Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
        Exit Sub
    End If
    ' Return the number of devices which you install in the system using
    ' Device Installation
```

```

ErrCde = DRV_DeviceGetNumOfList(gnNumOfDevices)
If (ErrCde <> 0) Then
  DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
  Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
  Exit Sub
End If
For i = 0 To (gnNumOfDevices - 1)
  tempStr = ""
  For ii = 0 To MaxDevNameLen
    tempStr = tempStr + Chr(devicelist(i).szDeviceName(ii))
  Next ii
  lstDevice.AddItem tempStr
Next i
labChannel.Enabled = False
lstChannel.Enabled = False
labVoltageRange.Enabled = False
lstVoltageRange.Enabled = False
'labExpChl.enabled = False
'lstExpChl.enabled = False
'labThermocouple.enabled = False
'lstThermocouple.enabled = False
cmdRun.Enabled = False
End Sub

Private Sub lstDevice_Click()
Dim i, ii As Integer
Dim tempNum As Integer
Dim TestRes As Boolean
Dim nOutEntries As Integer
Dim lpSubDeviceList As Long
Dim dwDeviceNum As Long
Dim lpDEVCONFIG_AI As DEVCONFIG_AI
lstChannel.Clear
lstVoltageRange.Clear
'lstExpChl.Clear
' Check if there is any device attached on this COM port or CAN
gnNumOfSubdevices = devicelist(lstDevice.ListIndex).nNumOfSubdevices
If (gnNumOfSubdevices > MaxDev) Then
  gnNumOfSubdevices = MaxDev
End If
'retrieve the information of all installed devices
If (gnNumOfSubdevices <> 0) Then
  dwDeviceNum = devicelist(lstDevice.ListIndex).dwDeviceNum
  lpSubDeviceList = DRV_GetAddress(SubDevicelist(0))
  ErrCde = DRV_DeviceGetSubList(dwDeviceNum, lpSubDeviceList, gnNumOfSubdevices, nOutEntries)
  If (ErrCde <> 0) Then
    DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
    Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
    Exit Sub
  End If
  For i = 0 To (gnNumOfSubdevices - 1)
    tempStr = ""
    For ii = 0 To MaxDevNameLen
      tempStr = tempStr + Chr(SubDevicelist(i).szDeviceName(ii))
    Next ii
    lstModule.AddItem tempStr
  Next i
  lstModule.ListIndex = 0
  lstModule.Enabled = True
  labModule.Enabled = True
End If
'Data Acquisition & Control or Digital I/O card
If (gnNumOfSubdevices = 0) Then
  dwDeviceNum = devicelist(lstDevice.ListIndex).dwDeviceNum
  ErrCde = DRV_DeviceOpen(dwDeviceNum, DeviceHandle)
  If (ErrCde <> 0) Then
    DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
    Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
    Exit Sub
  Else
    bRun = True
  End If
  ptDevGetFeatures.buffer = DRV_GetAddress(lpDevFeatures)
  ErrCde = DRV_DeviceGetFeatures(DeviceHandle, ptDevGetFeatures)
End If

```

```
If (ErrCde <> 0) Then
    DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
    Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
    Exit Sub
End If
ptAIGetConfig.buffer = DRV_GetAddress(lpDEVCONFIG_AI)
ErrCde = DRV_AIGetConfig(DeviceHandle, ptAIGetConfig)
If (ErrCde <> 0) Then
    DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
    Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
    Exit Sub
End If
If (lpDEVCONFIG_AI.usChanConfig = 0) Then
    tempNum = lpDevFeatures.usMaxAISigChl
Else
    tempNum = lpDevFeatures.usMaxAIDiffChl
End If
If (tempNum > 0) Then
    For i = 0 To (tempNum - 1)
        temp$ = "Chan#" + Str(i)
        lstChannel.AddItem temp$, i
    Next i
    lstChannel.Text = lstChannel.List(0)
    labChannel.Enabled = True
    lstChannel.Enabled = True
End If
' add gain code list
tempNum = lpDevFeatures.usNumGain
If (lpDevFeatures.usNumGain > 0) Then
    For i = 0 To (lpDevFeatures.usNumGain - 1)
        tempStr = ""
        For ii = 0 To 15
            tempStr = tempStr + Chr(lpDevFeatures.gIGainList(i).szGainStr(ii)))
        Next ii
        lstVoltageRange.AddItem tempStr
    Next i
    lstVoltageRange.Text = lstVoltageRange.List(0)
    lstVoltageRange.Enabled = True
    labVoltageRange.Enabled = True
End If
cmdRun.Enabled = True
End If
End Sub

Private Sub lstModule_Click()
    Dim i, ii As Integer
    Dim dwDeviceNum As Long
    Dim tempNum As Integer
    lstChannel.Clear
    lstVoltageRange.Clear
    ' open COM device or CAN device
    dwDeviceNum = SubDevicelist(lstModule.ListIndex).dwDeviceNum
    ErrCde = DRV_DeviceOpen(dwDeviceNum, DeviceHandle)
    If (ErrCde <> 0) Then
        DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
        Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
        Exit Sub
    Else
        bRun = True
    End If
    ptDevGetFeatures.buffer = DRV_GetAddress(lpDevFeatures)
    ErrCde = DRV_DeviceGetFeatures(DeviceHandle, ptDevGetFeatures)
    If (ErrCde <> 0) Then
        DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
        Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
        Exit Sub
    End If
    ' Add analog input channel item
    ptAIGetConfig.buffer = DRV_GetAddress(lpDEVCONFIG_AI)
    ErrCde = DRV_AIGetConfig(DeviceHandle, ptAIGetConfig)
    If (ErrCde <> 0) Then
        DRV_GetErrorMessage ErrCde, szErrMsg
        Response = MsgBox(szErrMsg, vbOKOnly, "Error!!")
        Exit Sub
    End If
```

```
End If
If (lpDEVCONFIG_AI.usChanConfig = 0) Then
    tempNum = lpDevFeatures.usMaxAISigIChl
Else
    tempNum = lpDevFeatures.usMaxAIDiffChl
End If
If (tempNum > 0) Then
    For i = 0 To (tempNum - 1)
        temp$ = "Chan#" + Str(i)
        lstChannel.AddItem temp$, i
    Next i
    lstChannel.Text = lstChannel.List(0)
    labChannel.Enabled = True
    lstChannel.Enabled = True
End If
' add gain code list
tempNum = lpDevFeatures.usNumGain
If (lpDevFeatures.usNumGain > 0) Then
    For i = 0 To (lpDevFeatures.usNumGain - 1)
        tempStr = ""
        For ii = 0 To 15
            tempStr = tempStr + Chr(lpDevFeatures.gIGainList(i).szGainStr(ii))
        Next ii
        lstVoltageRange.AddItem tempStr
    Next i
    lstVoltageRange.Text = lstVoltageRange.List(0)
    lstVoltageRange.Enabled = True
    labVoltageRange.Enabled = True
End If
cmdRun.Enabled = True
End Sub
```