



UNIVERSIDAD DE LAS ISLAS BALEARES

Departamento de Química

TESIS DOCTORAL

Laura Ferrer

Palma de Mallorca, Marzo de 2007.

Desarrollo de métodos automáticos de
análisis por inyección en flujo multijeringa
(MSFIA) para la determinación del ion
sulfuro en aguas



UNIVERSIDAD DE LAS ISLAS BALEARES

Departamento de Química

El Dr. Víctor Cerdà Martín, Catedrático de Química Analítica y el Dr. José Manuel Estela Ripoll, Profesor Titular del Área de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares, en carácter de director y co-director de esta Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado "Desarrollo de métodos automáticos de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para la determinación del ion sulfuro en aguas" ha sido realizado por Laura Daniela Ferrer Trovato en el Área de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares, como requisito para optar al Título de Doctor en Ciencias Experimentales y Tecnología, mención Química.

Palma de Mallorca, 1 de marzo de 2007.

Dr. Víctor Cerdà Martín

Dr. José Manuel Estela Ripoll

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas, que de un modo u otro participaron en la realización de esta tesis doctoral, deseo expresarles mi agradecimiento.

Para empezar, a quienes son directamente responsables de este trabajo, a Víctor Cerdà y José Manuel Estela, por la confianza y el apoyo que me brindaron.

A Graciela de Armas y Manuel Miró, co-autores de la mayoría de los trabajos, por su entusiasmo y aportes permanentes.

A los integrantes del Grupo de Química Analítica, Automatización y Medioambiente: Enrique Gómez, Xisca Mas, Rafael Forteza, Eduardo Becerra, Paolo Rumori y a los becarios Carmen Pons, Luz Leal, Yamila Fajardo, Matías Manera y Burkhard Horstkotte, con quienes compartí muy buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A los nuevos miembros del "autolab": Antonia Frías, Toni Serra, María Rosende, Miquel Coll y Fernando Maya, quienes hacen muy ameno el día a día en el laboratorio.

Y en el plano personal, a Hernán porque siempre estuvo y está incondicionalmente, y a quien además dedico esta Tesis.

A todos y cada uno de ustedes, gracias.

RESUMEN

Se han desarrollado varios métodos de análisis en flujo, basados en el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para la determinación automática del ión sulfuro en muestras ambientales y aguas residuales. Estos métodos, en combinación con esquemas de multiconmutación, utilizan una detección espectrofotométrica del analito, previa transformación química del mismo. La reacción se basa en el acoplamiento oxidativo de los iones sulfuro con la N-N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) en presencia de Fe(III) –reacción de Fischer– para formar el colorante azul de metileno.

Se acopló un procedimiento de separación en línea mediante difusión gaseosa a un sistema MSFIA, con el objetivo de lograr el aislamiento del analito de matrices complejas (por ejemplo, el agua residual) sin ningún requerimiento adicional de tratamiento manual preliminar de la muestra.

Con el objetivo de determinar niveles traza de sulfuro, se desarrolló un sistema MSFIA, al cual se le acopló un procedimiento de pre-concentración en fase sólida. El mismo consistió en un optrodo de reflectancia difusa sobre disco de membrana.

También se llevó a cabo un método que combina la separación y la pre-concentración en línea del sulfuro, con la consiguiente ventaja de ofrecer unas elevadas selectividad y sensibilidad.

Además, se desarrolló un sistema MSFIA inteligente totalmente automatizado para la determinación de sulfuro en un amplio rango de concentraciones. El sistema propuesto fue capaz de auto-ajustarse a las diferentes situaciones sin ninguna intervención del analista.

Por último, se presenta un estudio comparativo de las metodologías analíticas para la determinación de sulfuro en matrices acuosas mediante análisis en flujo, en el cual se discuten críticamente las distintas técnicas y sistemas de detección empleados.

ABSTRACT

Several multisyringe flow injection analysis (MSFIA) systems for automatic determination of sulfide in environmental and wastewater samples have been developed. These methods exploit both multicommutated schemes and spectrophotometric detection prior derivatization of the analyte. The reaction is based on the oxidative coupling of sulfide with N-N-dimethyl-p-phenylene diamine (DMPD) in presence of Fe(III) –Fischer's reaction– in order to form the methylene blue dye.

An on line gas-diffusion separation procedure was coupled to a MSFIA system to achieve the isolation of the analyte from complex matrices (e.g. wastewater) without any preliminary batch sample treatment.

With the aim to determine trace level of sulfide, a flow-through optical fiber diffuse reflectance sensor (optrode) using disk-based solid-phase extraction procedures in a MSFIA set-up is proposed.

On the other hand, a hyphenated method which combines the on line separation and pre-concentration of sulfide is presented. The high selectivity and sensitivity of the aforementioned method should be pointed out.

Moreover, a fully automated smart MSFIA system for sulfide monitoring in a wide concentration range is proposed. It is able to choose by itself the best approach to quantify the analyte without the analyst intervention.

Finally, a review of analytical methodologies for sulfide determination in aqueous matrices exploiting flow-based approaches is presented. The advantages and disadvantages of automated protocols based on flow techniques using several detection systems are discussed in detail.

ÍNDICE

Página

Capítulo 1. Introducción

1.1. Métodos de análisis en flujo	1
1.1.1 Análisis en flujo segmentado – SFA	2
1.1.2 Análisis por inyección en flujo – FIA	4
1.1.3 Análisis por inyección secuencial – SIA	5
1.1.4 Análisis por inyección en flujo multiconmutado – MCFIA	7
1.1.5 Análisis por inyección en flujo multijeringa – MSFIA	9
1.1.6 Nueva generación de análisis en flujo	10
1.2. Consideraciones sobre el sulfuro	12
1.2.1 Fuentes	12
1.2.2 Presencia en cuerpos de agua	12
1.2.3 Reactividad en agua	14
1.2.4 Toxicidad	16
1.2.5 Fundamento de la detección espectrofotométrica	17
1.3. Objetivos	19

Capítulo 2. Parte experimental

2.1. Sistema de análisis en flujo	21
2.1.1 Módulo de difusión gaseosa	25
2.1.2 Celda de flujo optródica	26
2.1.3 Sistemas de detección	27
2.2. Software	29
2.3. Reactivos y disoluciones	32
2.4. Validación de los métodos propuestos	33

Capítulo 3. Método MSFIA automático para la determinación espectrofotométrica de sulfuro en agua

3.1. Introducción	35
3.2. Parte experimental	36
3.2.1. Reactivos y disoluciones	36

3.2.2.	Sistema de flujo y detector óptico	36
3.2.3.	Protocolo de multiconmutación	38
3.3.	Resultados y Discusión	41
3.3.1	Configuración del sistema	41
3.3.2	Variables químicas	42
3.3.3	Parámetros de flujo	44
3.3.4	Características analíticas del método optimizado	47
3.3.5	Evaluación de interferencias	48
3.3.6	Análisis de muestras	49
3.3.7	Comparación de las características analíticas con las de otros métodos en flujo publicados	51
3.4.	Conclusiones	53

Capítulo 4. Método MSFIA de separación en línea para la determinación espectrofotométrica de sulfuro en aguas residuales

4.1.	Introducción	55
4.2.	Parte experimental	57
4.2.1	Reactivos y disoluciones	57
4.2.2	Sistema de flujo y detector óptico	57
4.2.3	Procedimiento MSFIA para analizar sulfuro	59
4.3.	Resultados y discusión	61
4.3.1	Composición química de las corrientes dadora y aceptora	61
4.3.2	Parámetros de flujo	64
4.3.3	Características analíticas del método MSFIA-DG	66
4.3.4	Comparación de los sistemas MSFIA-DG y MSFIA-diálisis	70
4.3.5	Aplicación analítica	70
4.4.	Conclusiones	72

Capítulo 5. Sensor de fibra óptica en flujo para la determinación automática de sulfuro en aguas mediante MSFIA usando reflectometría de fase sólida

5.1.	Introducción	75
------	--------------	----

5.2. Parte experimental	77
5.2.1 Reactivos y membranas	77
5.2.2 Sistema de flujo y detector óptico	78
5.2.3 Protocolo del sistema MSFIA – optrodo	79
5.3. Resultados y Discusión	81
5.3.1 Selección de la membrana	81
5.3.2 Investigación de las variables químicas	83
5.3.3 Investigación de los parámetros de flujo	85
5.3.4 Elución	88
5.3.5 Características analíticas del método optimizado	89
5.3.6 Análisis de muestras	90
5.3.7 Comparación del MSFIA-optrodo con otros métodos previos de pre-concentración con detección espectrofotométrica	92
5.4. Conclusiones	95

Capítulo 6. Sistema MSFIA automático con separación en-línea por difusión gaseosa acoplado a un optrodo de membrana

6.1. Introducción	97
6.2. Parte experimental	99
6.2.1 Reactivos y membranas	99
6.2.2 Sistema de flujo y detector óptico	99
6.2.3 Procedimiento del sistema MSFIA – DG – optrodo	101
6.3. Resultados y discusión	105
6.3.1 Potencial del sistema combinado MSFIA – DG – optrodo	105
6.3.2 Configuración del sistema MSFIA – DG – optrodo	106
6.3.3 Investigación de las variables químicas	107
6.3.4 Investigación de los parámetros de inyección en flujo	109
6.3.5 Características analíticas	111
6.3.6 Ventajas de la metodología propuesta	112
6.3.7 Análisis de muestras	113
6.4. Conclusiones	114

Capítulo 7. Sistema MSFIA inteligente para el análisis de muestras con alta variabilidad en la concentración de sulfuro	
7.1. Introducción	117
7.2. Parte experimental	119
7.2.1 Reactivos y membranas	119
7.2.2 Instrumentación	120
7.2.3 Procedimientos	122
7.3. Resultados y discusión	125
7.3.1 Sistema Inteligente	125
7.3.2 Optimización de variables experimentales	130
7.3.3 Características analíticas del método MSFIA inteligente	132
7.3.4 Análisis de muestras	134
7.3.5 Comparación con sistemas previos: ventajas del sistema MSFIA inteligente	135
7.4. Conclusiones	139
Capítulo 8. Estudio comparativo de metodologías analíticas para la determinación de sulfuro en matrices acuosas mediante análisis en flujo	
8.1. Introducción	141
8.2. Sistemas de detección	143
8.3. Métodos en flujo para la determinación de sulfuro	146
8.4. Separación en línea	149
8.5. Pre-concentración en línea	150
8.6. Detección espectrofotométrica	151
8.7. Detección electroquímica	153
8.8. Detección quimioluminiscente	155
8.9. Sistemas inteligentes para la monitorización de sulfuro	156
8.10. Conclusiones	157
Capítulo 9. Conclusiones	159
Bibliografía	163
Anexo. Publicaciones	169

1

INTRODUCCIÓN

1.1 Métodos de análisis en flujo

En las últimas décadas se han desarrollado nuevas metodologías analíticas, con el objeto de realizar una vigilancia y control continuos de un gran número de parámetros ambientales, que permitan obtener resultados fiables, seguros y económicos, de un gran número de muestras en un corto lapso de tiempo.

La automatización de los métodos analíticos permite obtener numerosas ventajas, tales como el incremento de la calidad de los análisis y la flexibilidad de los sistemas, lo que mejora la sensibilidad y selectividad en la determinación de los distintos parámetros sin realizar grandes modificaciones en los instrumentos. Además hace posible el almacenamiento de los datos experimentales, de modo que pueden ser procesados en cualquier momento, reduce el tiempo de análisis y libera al personal especializado de las labores más rutinarias.

El desarrollo de técnicas de análisis en flujo continuo ha posibilitado la automatización parcial o total de los procesos analíticos. Un método completamente automatizado debe ser capaz de llevar a cabo todos los pasos del procedimiento analítico sin la intervención del analista, incluso tomar decisiones y cambiar las condiciones de trabajo si los resultados así lo exigen. Generalmente, se realiza la automatización parcial de un proceso confiriendo esta característica a una o varias etapas pero no a todas. La automatización total debe incluir todas las etapas que un análisis pueda requerir: toma de muestra, separación del analito, eliminación de interferencias, dilución o

concentración en línea, medición del analito, tratamiento de los datos obtenidos, evaluación de resultados, toma de decisión y cambios de estrategia para la medición.

Evidentemente, se hace dificultoso realizar un análisis completamente automático en todos los casos, especialmente para muestras sólidas que requieren de una dilución previa. Por el contrario, los fluidos se adaptan fácilmente para ser analizados mediante técnicas de análisis en flujo.

Los componentes básicos de los sistemas de análisis en flujo son un módulo de impulsión del líquido (bombas peristálticas, bombas de pistón bidireccional o microbombas) y un conjunto de tubos de plástico (*manifold*) que conduce los líquidos hacia el detector. Estos métodos se basan en la introducción de muestras en una tubería de pequeño diámetro a la que se agregan los reactivos y luego se conducen al detector para realizar la medición que permita determinar la concentración de la especie de interés. El orden de adición de la muestra y los reactivos, así como el tiempo de reacción y el caudal, se controlan automáticamente permitiendo una repetitividad de la señal analítica y una frecuencia de muestreo elevadas. La propiedad de interés (absorbancia, fluorescencia, potencial, etc.) se registra continuamente mediante un sistema de detección adecuado, que produce una señal transitoria en forma rectangular o de pico, cuyas características (altura o área del pico) se relacionan con la concentración del analito en la muestra.

Un tratamiento exhaustivo de las técnicas de análisis en flujo puede hallarse en los libros especializados [1-8] y en un gran número de artículos que tratan aspectos sobre sus fundamentos, características y aplicaciones [9-19].

1.1.1 Análisis en flujo segmentado – SFA

El análisis en flujo segmentado (SFA, *Segmented Flow Analysis*) fue la primera técnica implementada en laboratorios con requerimientos de un gran volumen de análisis, como laboratorios de análisis clínicos y oceanográficos. Los métodos de análisis continuo en flujo segmentado comercializados por la

marca Technicon® con el nombre de *Autoanalysers*, se basaron en la técnica propuesta por Skeggs en 1957 [20] (Figura 1.1).

En el SFA, las muestras son aspiradas secuencialmente y separadas por burbujas de aire, u otro gas, con el objetivo de segmentar el flujo e impedir la dispersión del bolo de muestra. En cada segmento de disolución, separado por dos burbujas de aire, se crea una mezcla homogénea entre muestra y reactivos, que necesita un elevado tiempo de residencia en el sistema (2 – 30 min.) para alcanzar las condiciones de equilibrio estacionario antes de realizar la detección. La forma de la respuesta es rectangular, midiéndose la altura de banda. Usualmente las burbujas son eliminadas antes que lleguen a la celda de flujo del detector.

La complicación que implica la introducción y eliminación de las burbujas en el sistema ha reducido su uso, y además éstas provocan la disminución de la eficacia de los sistemas de separación y dificultan los métodos de flujo detenido. Por estas razones, el SFA ha caído en desuso mientras que las otras técnicas de análisis en flujo se han ido desarrollando en mayor extensión.

Asimismo, el SFA presenta características, tales como un elevado gasto de reactivos, un ciclo de lavado esencial, una baja frecuencia de análisis (60 inyecciones/hora), así como la imposibilidad de realizar valoraciones y métodos cinéticos, que fueron superadas por los consecutivos métodos de análisis en flujo desarrollados.

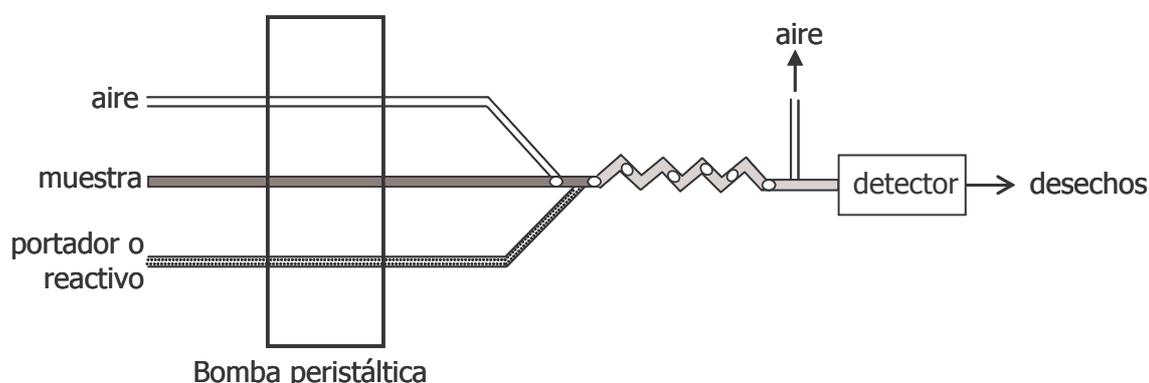


Figura 1.1. Representación esquemática de un sistema de análisis en flujo segmentado (SFA).

1.1.2 Análisis por inyección en flujo – FIA

El análisis por inyección en flujo (FIA, *Flow Injection Analysis*) fue propuesto por Ruzicka y Hansen en 1975 [21], y posee ventajas que han conducido a esta técnica a un extraordinario desarrollo, sin comparación con el resto de las técnicas en flujo.

Los componentes básicos del FIA son los mismos que en el SFA, no obstante la diferencia radica en que la muestra es introducida mediante una válvula de inyección en un canal por el que circula una corriente continua de fluido portador (*carrier*). Durante el transporte de la muestra hacia el detector se incorporan los reactivos necesarios en el canal del portador o mediante canales auxiliares conectados al principal (Figura 1.2).

Entre las características principales de los sistemas FIA caben destacar que las muestras no se hallan segmentadas por burbujas como en el SFA, los tubos son considerablemente más estrechos (0,5 mm de diámetro interno) en los cuales se produce un flujo laminar, y se alcanzan altas frecuencia de muestreo (100 inyecciones/hora) y una elevada precisión (1-2%). Además, se consigue una disminución del consumo de reactivos y no se requieren ciclos de lavado para evitar la contaminación entre muestras. Entre otras ventajas fundamentales del FIA merece ser destacada la facilidad de implementación considerando que es una técnica que puede realizarse sin excesivas dificultades, con muy bajo costo de inversión y de mantenimiento. Esta facilidad permitió una extraordinaria expansión en los laboratorios de investigación, inclusive sin comparación con otras técnicas de flujo más recientes.

No obstante, esta técnica tiene su punto débil en el uso de las bombas peristálticas para la impulsión de los líquidos. Estas bombas requieren el uso de tubos flexibles de Tygon®, lo que implica cambios en los caudales debido al aplastamiento progresivo que sufren los tubos, por lo que los sistemas deben ser re-calibrados frecuentemente. Estos tubos son especialmente vulnerables si se usan reactivos agresivos (ácidos o bases moderadamente concentrados) o disolventes orgánicos. Por otro lado, la técnica FIA es básicamente monoparamétrica, característica que ha sido superada por otros métodos que permiten la determinación simultánea de diferentes parámetros.

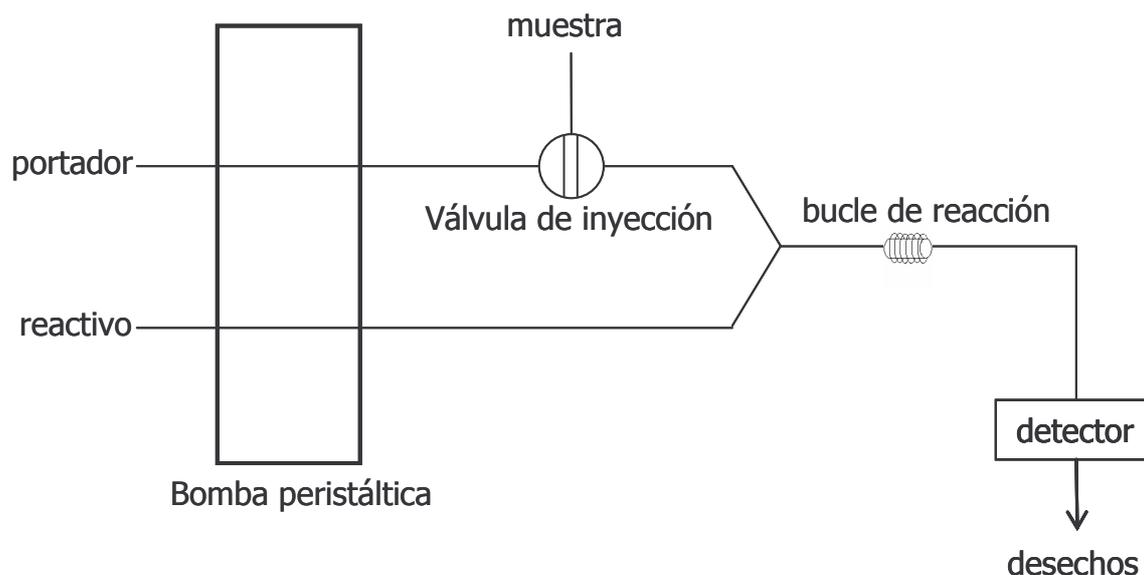


Figura 1.2. Representación esquemática de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).

1.1.3 Análisis por inyección secuencial – SIA

La técnica de análisis por inyección secuencial (SIA, *Sequential Injection Analysis*), introducida por Ruzicka y Marshall en 1990 [22], fue propuesta inicialmente como una alternativa del FIA, ya que ofrece algunas ventajas con respecto al FIA convencional.

Un sistema SIA está compuesto básicamente por una bomba de pistón bidireccional, una válvula de selección, la cual posee un puerto central conectado a la bomba impulsora de líquidos y puertos laterales conectados a los recipientes de reactivos, muestra y al detector. El SIA se basa en la aspiración secuencial de volúmenes precisos de muestra y reactivos que se conducen, mediante un portador, hacia un bucle de carga donde permanecen en contacto hasta que se envían a través de un bucle de reacción al detector (Figura 1.3). El envío del contenido del bucle de carga al detector se realiza en el sentido inverso de flujo, lo que provoca la mezcla entre muestra y reactivos para dar lugar a la formación del producto de reacción que permitirá la

detección de la propiedad seleccionada. La señal analítica transitoria es en forma de pico, cuya altura o área se relacionan con la concentración del analito en la muestra.

Entre las ventajas del SIA cabe destacar que el conjunto de tuberías es más simple y universal que el del FIA, ya que generalmente éste puede permanecer fijo y el control de los tiempos de reacción puede llevarse a cabo a través del ordenador, incluyendo técnicas de flujo detenido. Los tubos son de PTFE (politetrafluoroetileno, de 0,8 mm de diámetro interno), material resistente al uso de disolventes y reactivos agresivos. Las bombas peristálticas pueden ser eliminadas y remplazadas por bombas de pistón movidas por un motor paso a paso provistas de jeringas de vidrio, las cuales son también resistentes a diferentes tipos de reactivos agresivos. Además, dado que en SIA el sistema sólo funciona cuando se requieren mediciones, el ahorro en el volumen tanto de muestra como de reactivos es drástico respecto al FIA, al igual que la generación de desechos.

Por otro lado, la técnica SIA puede funcionar en modo multiparamétrico, lo cual es de especial interés para el desarrollo de monitores ambientales [23]. El análisis multiparamétrico se favorece al aumentar los puertos laterales, bien utilizando válvulas de selección de hasta 20 puertos o conectando un puerto lateral de la válvula principal con el puerto central de otras válvulas. Esta característica hasta ahora única, es quizás compartida en la actualidad con los sistemas multibomba (MPFS), ya que no existe otra técnica de flujo que tenga estas posibilidades multiparamétricas.

Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas, tales como una menor frecuencia de muestreo (70 inyecciones/hora) con respecto al FIA y dificultades en la mezcla de muestra y reactivos. El necesario control del sistema mediante un ordenador provisto de un programa adecuado puede explicar el menor desarrollo de esta técnica respecto del FIA.

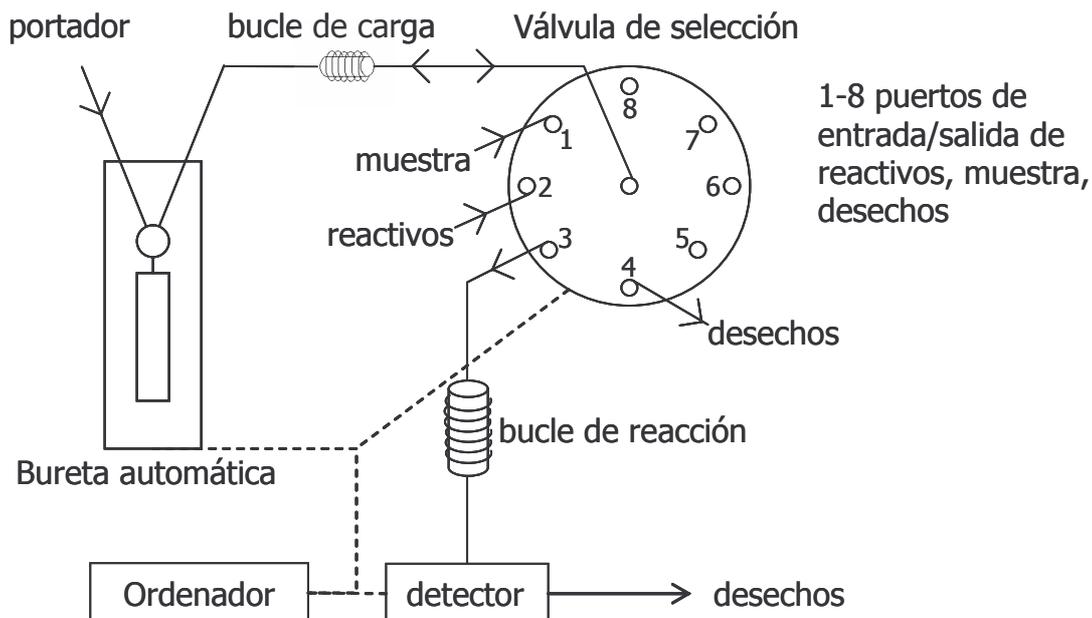


Figura 1.3. Representación esquemática de un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA).

1.1.4 Análisis por inyección en flujo multiconmutado – MCFIA

El análisis por inyección en flujo multiconmutado (MCFIA, *Multi-Commutated Flow Injection Analysis*), es un nuevo enfoque del análisis en flujo propuesto por Reis *et al.* en 1994 [24]. El MCFIA se basa en el uso de válvulas solenoides de tres vías de conmutación rápida (Figura 1.4).

En un principio, esta técnica utilizaba un sistema de conducción de líquidos que los aspiraba a través de las propias válvulas. Sin embargo, debido a que los sistemas de aspiración tienden a introducir burbujas de aire o producir la desgasificación de los líquidos dentro del sistema, se optó por utilizar sistemas basados en la impulsión de los líquidos, como bombas peristálticas o de pistón.

Las válvulas solenoides, cuya conmutación está controlada por un ordenador, permiten el retorno de muestra y reactivos a sus reservorios cuando no son necesarios, por lo que se consigue un bajo consumo de los mismos.

Otra ventaja del MCFIA es la alta frecuencia de inyección lograda (100 inyecciones/hora) debido a la rapidez con la que conmutan las válvulas. Sin embargo, un inconveniente que presenta este tipo de análisis en flujo es el sobrecalentamiento de las válvulas debido al calor disipado por el bobinado del solenoide, cuando las válvulas están activadas durante un tiempo prolongado. Para evitar dicho sobrecalentamiento es aconsejable utilizar algún dispositivo de protección electrónico [8].

El uso de estas válvulas de conmutación se ha extendido considerablemente en los últimos años, incluso combinándose con otras técnicas de análisis en flujo que se describen a continuación (análisis por inyección en flujo multijeringa y sistemas multibomba). De manera que estas tres técnicas en flujo multiconmutado se presentan como una posible alternativa a las técnicas en flujo clásicas, como el SFA, el FIA y el SIA [25].

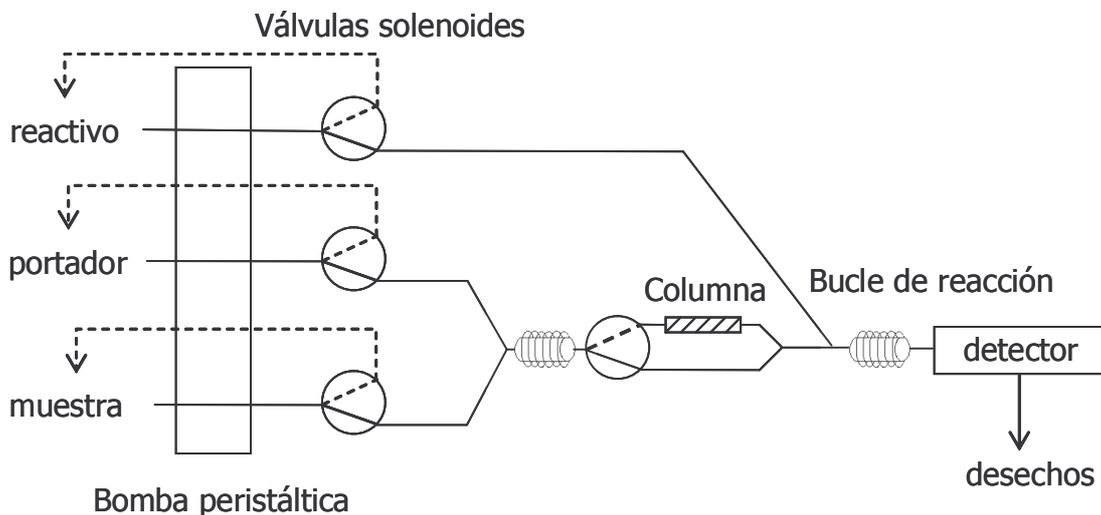


Figura 1.4. Representación esquemática de un sistema en flujo multiconmutado (MCFIA).

1.1.5 Análisis por inyección en flujo multijeringa – MSFIA

Esta nueva técnica de análisis automático, denominada análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA, *Multi-Syringe Flow Injection Analysis*) ha sido propuesta en 1999 por el grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares (UIB), [15,18,19,26]. Esta técnica, que se presenta como una herramienta poderosa para la manipulación automática en flujo de disoluciones, reúne diversas ventajas de las otras técnicas de análisis en flujo ya existentes, tales como la alta frecuencia de análisis del FIA, la robustez y versatilidad del SIA y la simplicidad del MCFIA.

El MSFIA se beneficia de la versatilidad y robustez de los sistemas de inyección secuencial utilizando bombas de pistón provistas de jeringas como impulsores de líquidos. De este modo, se evitan los continuos procedimientos de re-calibración requeridos en los sistemas basados en bombas peristálticas, como consecuencia del envejecimiento de los tubos flexibles de Tygon®, manteniendo la eficiencia de la mezcla radial de las zonas de muestra y reactivos de los métodos de inyección en flujo. Debido a que los líquidos entran en contacto solamente con tubos de vidrio o de PTFE, el MSFIA permite el uso de reactivos agresivos y disolventes orgánicos.

Básicamente, un sistema MSFIA está compuesto por un módulo con cuatro jeringas, movidas conjuntamente por un mismo pistón (Figura 1.5). Cada jeringa tiene acoplada en su cabeza una válvula solenoide de tres vías, lo que permite una gran variedad de modalidades de inyección, como protocolos de multiconmutación [27]. Además, gracias a estas válvulas, los reactivos son devueltos a sus depósitos cuando no son necesarios, sin perturbar el desarrollo de la reacción. Por lo tanto, se logra una reducción de más de 10 veces en la generación de residuos respecto a los procedimientos usuales de técnicas de inyección en flujo.

El *manifold* se compone de tubos de PTFE (0,8 mm de diámetro interno) y conectores de PMMA (polimetilmetacrilato) de dos, tres, cuatro y hasta cinco vías. Los sistemas MSFIA se controlan por ordenador, tanto el o los módulos multijeringa que lo compongan, como las válvulas solenoides adicionales o el

muestreador automático. Las válvulas solenoides, introducidas con la técnica MCFIA, pueden conmutar sin necesidad de parar el movimiento del pistón del módulo multijeringa. Su conmutación es tan rápida que no se produce ninguna sobrepresión al cambiar la posición de las mismas.

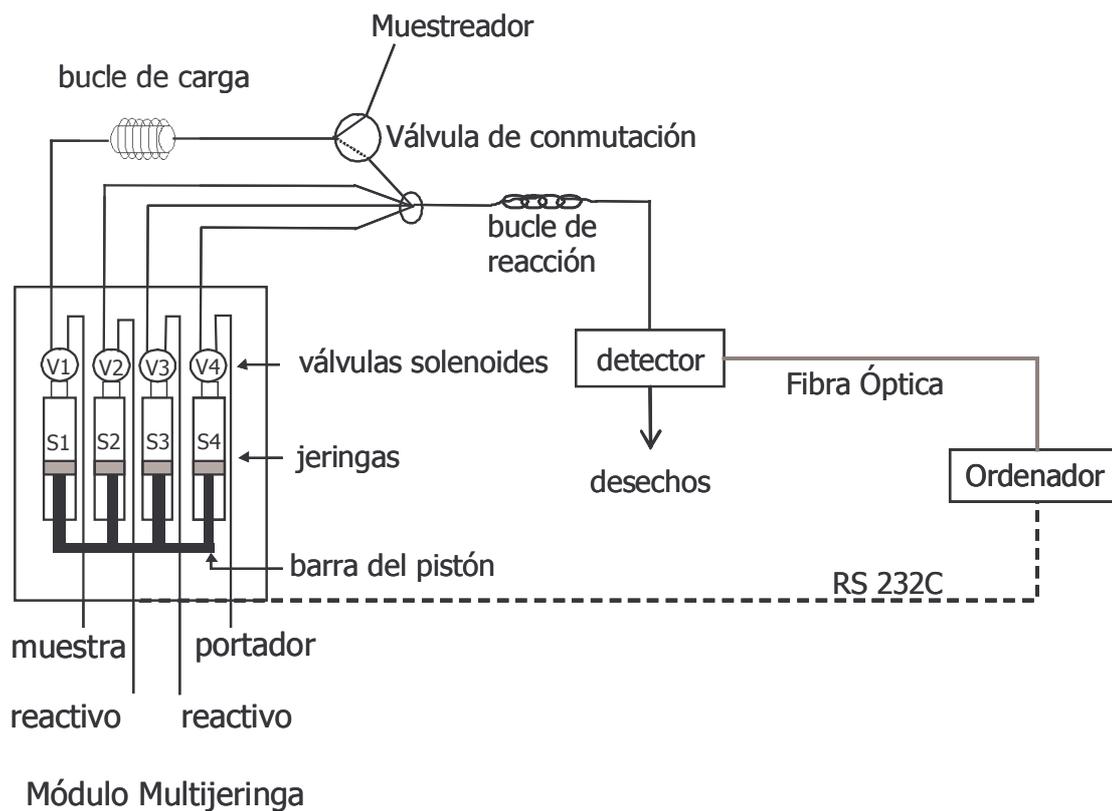


Figura 1.5. Representación esquemática de un sistema por inyección en flujo multijeringa.

1.1.6 Nueva generación de análisis en flujo

En los últimos años, se han presentado dos nuevas técnicas de análisis en flujo: el sistema *Lab-on-valve* (LOV) propuesto por Ruzicka en 2000 [28] y

el sistema multibomba (MPFS, *Multi-Pumping Flow System*) propuesto por Lapa *et al.*, en 2002 [29].

El LOV es una metodología concebida para reducir reactivos basada en ensayos a nivel de microlitro y sub-microlitro, en la cual la manipulación de la muestra se realiza de modo de inyección secuencial. Esta técnica puede emplear flujo hacia adelante, reverso o detenido y ser programada para ajustarse a una amplia variedad de ensayos utilizando el mismo mecanismo de microfluidos. El método se basa en un sistema de canales integrado a una celda de flujo multipropósito, montado sobre una válvula multiposición convencional. Las ventajas del LOV son su compactibilidad y la posición rígida permanente del canal que procesa la muestra, que asegura la repetitividad de la manipulación de los microfluidos.

El MPFS se basa en la utilización de bombas solenoides de pistón, donde cada pistonada significa la impulsión de un volumen predeterminado de líquido (3, 8, 20, 25, 50 μ l), y que junto con la frecuencia de dichas pistonadas definen el caudal del sistema. Las características más destacables del MPFS son su gran versatilidad, fácil configuración, robustez y bajo costo, ya que cada bomba hace a la vez la función de propulsor del líquido y de válvula. Además, se consigue una señal analítica más alta, efecto que se atribuye a que las pistonadas provocan movimientos turbulentos que facilitan la mezcla entre la muestra y los reactivos.

1.2. Consideraciones sobre el sulfuro

1.2.1 Fuentes

Entre las fuentes naturales, que proporcionan alrededor del 90% del sulfuro de hidrógeno total de la atmósfera, se destacan la actividad volcánica y geotérmica, las aguas estancadas y contaminadas, el estiércol y las minas de carbón con bajo contenido de oxígeno [30]. Asimismo, el sulfuro de hidrógeno puede ser liberado directamente en el agua por la descomposición de organismos acuáticos, o como resultado de procesos químicos anaeróbicos en pantanos y ciénagas.

Entre las fuentes antropogénicas, pueden señalarse los procesos de extracción, transporte y refinado de petróleo, azufre y gas natural, debido a que el sulfuro de hidrógeno es un componente natural de los depósitos de estas fuentes energéticas; y en general, por liberaciones accidentales (escapes industriales). Los vertederos son otra fuente de sulfuro de hidrógeno al ambiente, ya que éstos constituyen hasta el 1% del volumen de los gases típicos de vertederos [31]. Además, el sulfuro de hidrógeno se utiliza frecuentemente en las industrias, tanto como un reactivo o bien se produce como un subproducto en procesos industriales. Ejemplos de estos procesos son los de curtidos, plantas de tratamiento de aguas residuales, alcantarillados, fábricas textiles de rayón, productoras de azufre, hornos de coque, fábricas de papel (Kraft), fundiciones de hierro, plantas procesadoras de alimentos, fábricas de asfalto, plantas de gas natural y plantas petroquímicas [32].

1.2.2 Presencia en cuerpos de agua

El sulfuro de hidrógeno (o ácido sulfhídrico H_2S) es uno de los componentes principales en el ciclo natural del azufre. En la Figura 1.6 se

muestra un modelo conceptual del sulfuro de hidrógeno dentro de una laguna [33].

El sulfuro de hidrógeno que entra desde la atmósfera o es directamente liberado en el agua, puede ser fácilmente oxidado por el oxígeno presente en aguas superficiales, o puede disolverse en la columna de agua con bajo contenido de oxígeno, o bien unirse a arcilla y materia orgánica, formando parte del material particulado en suspensión y más tarde de los sedimentos.

Las bacterias y los hongos presentes en el cuerpo de agua, liberan sulfuro de hidrógeno durante la descomposición de proteínas que contengan azufre. Además, las bacterias anaeróbicas sulfato reductoras, presentes en los sedimentos, lo liberan mediante la reducción directa del sulfato (SO_4^{2-}). Estas bacterias requieren materia orgánica metabolizable, un ambiente (o microambiente) anóxico y sulfato disuelto.

El sulfuro tiene un importante papel dentro de los procesos biogeoquímicos, tanto por formar sales insolubles con varios metales (cobre, zinc, níquel, hierro) que pueden estar presentes en los sedimentos o en el agua; como por la liberación de metales al ambiente acuático mediante la movilización bacteriana del sulfuro contenido en minerales [34]. En los ambientes anóxicos, el sulfuro de hidrógeno controla la biodisponibilidad de los metales pesados. Por ejemplo, en la interfase agua-sedimentos, la disponibilidad de oxígeno (condiciones redox) juega un papel importante en el ciclo de los nutrientes y de los metales pesados. Al aumentar la profundidad el potencial redox decrece, y tiene lugar la reducción del sulfato formándose sulfuros. Los sulfuros de metales poseen una solubilidad extremadamente baja, de modo que mantiene a los metales no biodisponibles y generalmente una baja concentración de sulfuro libre en el agua intersticial.

Asimismo, el sulfuro de hidrógeno también es consumido por bacterias que se encuentran en los sedimentos y en el agua, las cuales lo oxidan hasta azufre elemental. El azufre (S^0) se une fácilmente al sulfuro de hierro presente en los minerales de los sedimentos para convertirse en piritita (FeS_2).

Por otra parte, puede ocurrir que las bacterias fotosintéticas oxiden el sulfuro de hidrógeno a azufre y sulfato en presencia de luz y ausencia de oxígeno [35].

El sulfuro de hidrógeno se desprende fácilmente del agua, y su tasa de volatilidad depende de factores tales como temperatura, humedad, pH y la concentración de ciertos iones metálicos. El sulfuro de hidrógeno atraviesa la interfase aire-agua con cinéticas similares a otros gases como el oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono, a $\text{pH} \leq 6$. A pH más altos, tal como el del agua de mar ($\text{pH} \geq 8$), la cantidad de sulfuro de hidrógeno liberada es mayor debido al gradiente de especies iónicas en el agua cercana a la superficie [30].

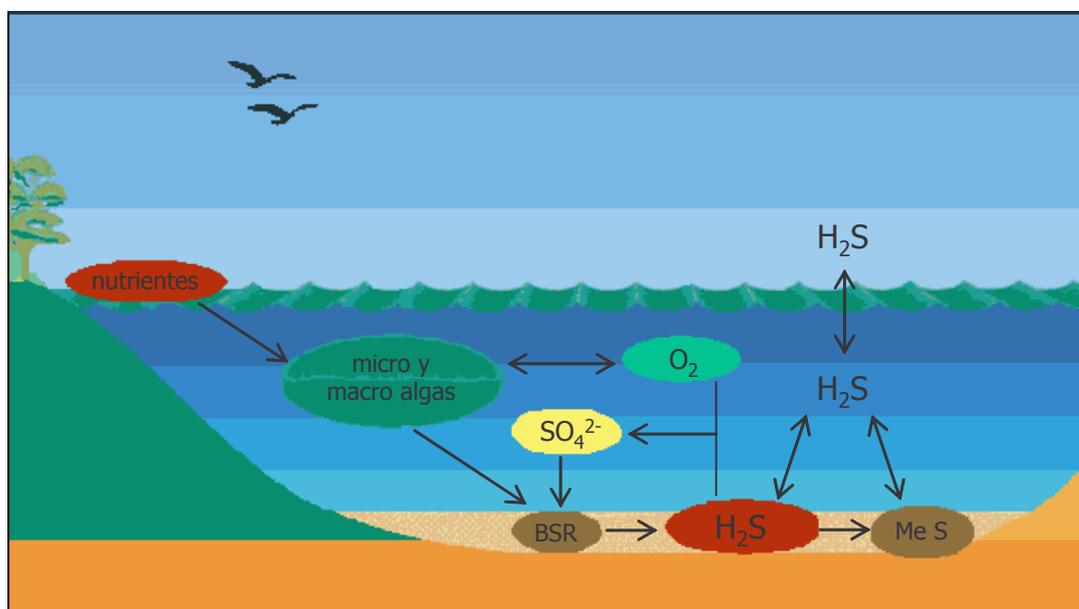


Figura 1.6. Modelo conceptual del sulfuro de hidrógeno en un lago. BSR: bacterias sulfato reductoras. MeS: sulfuro de metales.

1.2.3 Reactividad en agua

Debido a que el sulfuro de hidrógeno existe como un gas a presión atmosférica, la partición en el aire comúnmente ocurre luego de una liberación ambiental. Sin embargo, el compuesto también es soluble en aceite y agua, y

por lo tanto puede particionarse en agua superficial, agua subterránea o suelo húmedo. La solubilidad del sulfuro de hidrógeno en agua pura varía con la temperatura desde $5,3 \text{ g l}^{-1}$ a 10 °C hasta $3,2 \text{ g l}^{-1}$ a 30 °C [36].

El sulfuro de hidrógeno se solubiliza fácilmente en agua. En disolución acuosa es un ácido débil, presentando dos constantes de disociación ácida, la primera disociación produce el ion monohidrógeno sulfuro (HS^-) y la segunda produce el ion sulfuro (S^{2-}), con valores de pK_a para cada una de estas disociaciones de 7,04 y 11,96, respectivamente [36]. A medida que el pH se incrementa por encima de 7, la relación de concentraciones entre el ion monohidrógeno sulfuro y el sulfuro de hidrógeno acuoso se incrementa. Solo a pH por encima de 12 la concentración del ion sulfuro será significativa (>50%).

Una vez que el sulfuro de hidrógeno está disuelto en agua, se disocia en el ion monohidrógeno sulfuro y en el ion sulfuro, cuyas concentraciones dependerán del pH del medio como se mencionó anteriormente. Los complejos que se forman entre los iones monohidrógeno sulfuro y sulfuro y los iones de metales traza (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) presentes en el agua, juegan un papel importante tanto en el ciclo de los metales como en el transporte del sulfuro de hidrógeno a través de la interfase aire-agua.

El sulfuro de hidrógeno es rápidamente oxidado por el oxígeno presente en aguas superficiales. Los tiempos de vida media a 25 °C y pH 8 fueron de 50 y 26 horas para agua dulce y agua de mar, respectivamente. La oxidación por peróxido de hidrógeno sólo comienza a ser competitiva con la oxidación por oxígeno a concentraciones de peróxido de hidrógeno como las encontradas en el agua de lluvia ($>10^{-5}\text{M}$). En las aguas residuales la concentración de sulfuro de hidrógeno puede ser controlada por la adición de oxidantes químicos, los cuales reaccionan para formar productos inofensivos. Esta oxidación puede producir azufre a pH 6-7, mientras que a pH 7-9 se forma azufre, polisulfuros, tiosulfatos y por último sulfatos. En ambientes cálidos y húmedos, el sulfuro de hidrógeno puede ser oxidado por bacterias autotróficas a ácido sulfúrico [30].

Debido a la fácil volatilización del sulfuro de hidrógeno de las aguas superficiales y a que no persiste en aguas altamente oxigenadas, los niveles en estos ambientes son bajos. A modo de ejemplo pueden citarse valores de sulfuro de hidrógeno de 0,9 ppm en agua subterránea de un área que recibe el drenaje de una mina y de 0,03 ppm en muestras de una planta de energía. En

agua intersticial de sedimentos anóxicos no perturbados, el contenido de sulfuro de hidrógeno puede llegar hasta 100 ppb, mientras que en zonas con perturbaciones la concentración sólo alcanza las 30 ppb.

Sin embargo, se pueden observar niveles mucho más elevados de sulfuro de hidrógeno en muestras de aguas residuales y de procesos industriales. Valores promedio de sulfuro de hidrógeno de 0,5 y 30 ppm corresponden a desechos urbanos e industriales [30], mientras que en plantas de procesamiento de pieles se encuentran concentraciones entre 10 y 200 ppm en sus efluentes y hasta de 2000 ppm en las disoluciones de procesamiento [37].

1.2.4 Toxicidad

El sulfuro de hidrógeno pertenece al grupo de los asfixiantes químicos, los cuales provocan daños al impedir el aporte de oxígeno a los tejidos. A su vez se subdividen en asfixiantes simples como el metano, que producen sus efectos al desplazar o eliminar al oxígeno del aire inspirado; y asfixiantes tisulares, como el monóxido de carbono, que disminuye la capacidad de transporte del oxígeno o el cianuro de hidrógeno y sulfuro de hidrógeno, que inhiben la utilización de oxígeno a nivel mitocondrial. El sulfuro forma complejos con el hierro en los citocromos mitocondriales deteniendo el metabolismo aeróbico.

El sulfuro de hidrógeno es una sustancia irritante y un tóxico celular, que como tal afecta todos los órganos, particularmente al sistema nervioso. Entre los efectos característicos que produce en los seres humanos y los mamíferos, se pueden destacar irritación en los ojos y vías respiratorias, catarro bronquial y náuseas. En grandes concentraciones produce anosmia (pérdida del sentido del olfato), convulsiones, narcosis y hasta la muerte por paro respiratorio. Si el paciente se recupera, usualmente queda una hipersensibilidad residual al sulfuro de hidrógeno durante mucho tiempo, acompañada de una serie de alteraciones: disminución de la audición, alteraciones del equilibrio, disminución

de la memoria, fatiga, cefaleas, ansiedad y depresión, además de síntomas respiratorios [38].

El umbral de olor para el ser humano puede ser tan bajo como de 0,02 ppm, aunque usualmente hay una sensibilidad alrededor de los 5 ppm [37]. El espectro de daños que puede causar depende de las concentraciones y del tiempo de exposición. En la Tabla 1.1 se presentan concentraciones de toxicidad para distintos grupos de animales expuestos [39].

Tabla 1.1. Concentraciones de sulfuro de hidrógeno que causan efectos tóxicos en diferentes grupos de organismos.

Grupo expuesto	Concentración H₂S
Seres humanos	1,2 - 2,8 mg l ⁻¹ aire (muerte instantánea)
	0,6 mg l ⁻¹ aire (0,5 - 1h de exposición: letal)
	0,1 - 0,15 mg l ⁻¹ aire (varias horas de inhalación: tóxico)
Mamíferos (ratones)	DL ₅₀ 53 mg kg ⁻¹ *
Peces (carpas)	0,86 mg l ⁻¹ (tóxico)
	1 mg l ⁻¹ (letal)
	CL ₅₀ 6,3 mg l ⁻¹ **

* DL₅₀: dosis letal 50 para sulfuro de sodio

**CL₅₀: concentración letal 50 para 24 h de exposición.

1.2.5 Fundamento de la detección espectrofotométrica

Uno de los métodos más frecuente y satisfactoriamente usados para la determinación de sulfuro como consecuencia de su especificidad inherente, es el acoplamiento oxidativo de los iones sulfuro con la N-N-dimetil-p-

fenilendiamina (DMPD) en presencia de Fe(III) – reacción de Fischer [40] – para formar el colorante azul de metileno. La reacción involucra la formación de un intermediario, la DMPD oxidada por el Fe(III), y luego este compuesto intermediario es reducido por el sulfuro de hidrógeno para formar el colorante tiazio heterocíclico denominado azul de metileno (Figura 1.7). El mecanismo de la reacción está descrito por varios autores [37,41,42].

Si bien esta reacción fue descrita por primera vez a fines del siglo XIX, conserva un importante valor analítico en la actualidad, en términos de simplicidad, selectividad y sensibilidad. Por ejemplo, los límites de detección alcanzados mediante espectrofotometría UV/visible pueden compararse favorablemente con los obtenidos con las técnicas más modernas (cromatografía de gases, HPLC, cromatografía iónica, electroforesis capilar, etc.) [37]. La cuantificación de las cantidades de azul de metileno formado es fácilmente llevada a cabo mediante métodos espectrofotométricos, ya que el colorante posee un máximo de absorción a una longitud de onda muy conveniente en el visible sobre los 670 nm.

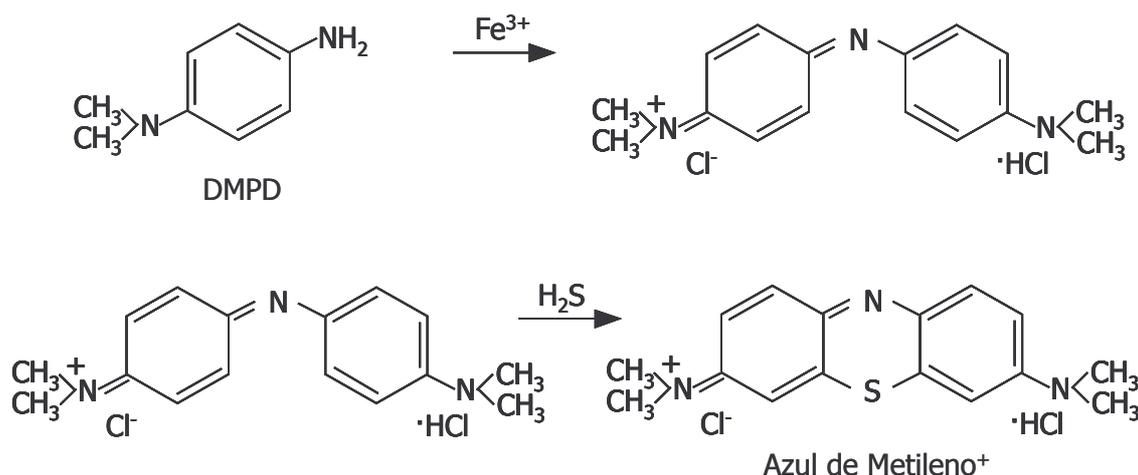


Figura 1.7. Representación esquemática de la formación del azul de metileno.

1.3 Objetivos

En este estudio se pretende desarrollar nuevas aplicaciones analíticas basadas en el análisis por inyección en flujo multijeringa, enfocadas fundamentalmente a la determinación automática del ion sulfuro en muestras de agua, con distintos niveles de concentración y complejidad de la matriz.

A su vez, se pretende conseguir métodos automáticos de análisis en flujo que impliquen la miniaturización de todo el sistema, incluso del detector, que disminuyan los costos y que posean ventajas respecto a otros sistemas de flujo ya existentes, tales como la reducción en el consumo de muestras y reactivos, reducción de desechos, y el aumento de sensibilidad y selectividad.

Además, se busca incorporar técnicas en-línea que permitan la determinación directa de las muestras, sin requerir ningún tratamiento previo de la misma.

Finalmente, se pretende conseguir un método inteligente totalmente automatizado, capaz de elegir por sí mismo el procedimiento adecuado para realizar la determinación de sulfuro en cualquier tipo de muestra de agua, sin ninguna intervención humana. El mismo deberá cubrir un amplio rango de concentraciones mediante la incorporación de distintos procedimientos en un único sistema.

Para llevar a cabo este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos particulares:

- Desarrollo de un método MSFIA automático para la determinación espectrofotométrica de sulfuro en aguas naturales y residuales.
- Desarrollo de un método MSFIA automático acoplado a un procedimiento de separación en línea para la determinación espectrofotométrica de sulfuro en muestras de matriz compleja.

- Desarrollo de un método MSFIA automático acoplado a un procedimiento de pre-concentración en línea para la determinación de concentraciones traza de sulfuro en aguas.

- Desarrollo de un método MSFIA automático que combine los procedimientos de separación y pre-concentración en línea para la determinación de concentraciones traza de sulfuro en muestras de matriz compleja.

- Desarrollo de un método inteligente MSFIA totalmente automatizado para la determinación de un amplio rango de concentraciones de sulfuro, con separación en línea del analito, involucrando procedimientos de dilución y pre-concentración en línea.

2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Sistema de análisis en flujo

Los sistemas desarrollados en este estudio para la determinación de sulfuro en aguas se basan en el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA). El MSFIA utiliza como impulsor de líquidos, una bomba de pistón multijeringa (Crison, Barcelona, España), equipada con cuatro jeringas S1–S4 (Hamilton, Suiza), las cuales se hallan conectadas en bloque mediante la barra del pistón al mismo motor a pasos (Figura 2.1). La gran variedad de jeringas con volúmenes comprendidos entre 0,5 y 25 ml, permite obtener diferentes caudales y volúmenes de inyección a través de un mismo conjunto de tuberías. También cabe señalar que la velocidad del motor a pasos puede ajustarse dentro de un amplio rango, de modo que las reacciones con diferentes cinéticas pueden fácilmente acomodarse sin ninguna re-configuración del *manifold*.

Cada jeringa tiene en la parte superior una válvula solenoide de tres vías (N-Research, Caldwell, NJ, USA), V1–V4, el conjunto de las cuales permiten los esquemas de multiconmutación. Las válvulas solenoides de tres vías tienen dos posiciones: “on” y “off”, las cuales permiten la conexión de un canal común a dos diferentes canales de entrada/salida, mediante la activación y desactivación del solenoide. Las posiciones “on” y “off” del solenoide son independientes del desplazamiento del pistón, resultando dos direcciones opcionales de flujo para el movimiento ascendente del pistón y otras dos para el movimiento descendente (Figura 2.2). Usualmente, la posición “on” se

conecta al sistema, mientras que la posición “off” se asigna a los reservorios de *carrier* y reactivos. Sin embargo, esta última se selecciona en los pasos largos, de modo de mantener el solenoide desactivado el mayor tiempo posible, y así evitar el recalentamiento de las válvulas. La implementación de estas válvulas de conmutación en la cabeza de cada jeringa permite la inyección precisa de volúmenes bien definidos de muestras y reactivos de acuerdo con una programación establecida para efectuar las mediciones analíticas. Además, permiten la devolución de los reactivos y el *carrier* a sus respectivos reservorios, en las etapas en que no son requeridos.



Figura 2.1. Módulo de multijeringa utilizado en un sistema MSFIA.

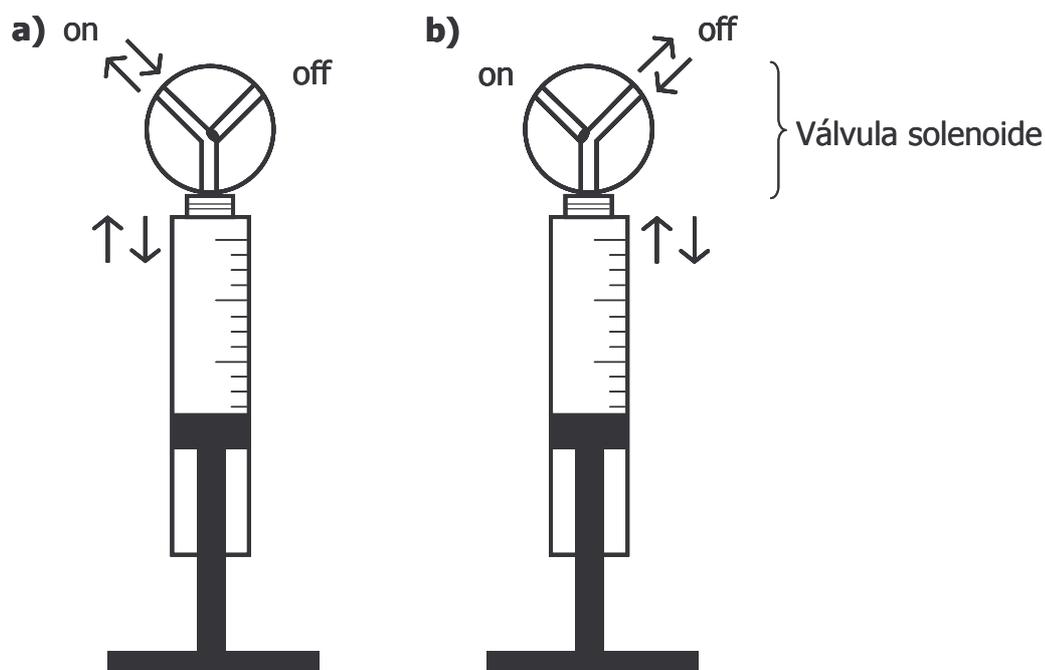


Figura 2.2. Representación de las válvulas solenoides ubicadas en el cabezal de cada jeringa. a) Solenoide activado: posición “on” y b) Solenoide desactivado: posición “off”.

Por otra parte, la incorporación de válvulas de conmutación adicionales, V5–V# (modelo MTV-3-N ¼ UKG, Takasago, Japón), aumenta aún más las posibilidades del sistema, de modo que se puede emplear el mismo módulo para técnicas de conmutación, haciendo al sistema más simple y barato (Figura 2.3). Todos los sistemas desarrollados tienen al menos una válvula solenoide adicional que permite cargar la muestra desde el muestreador automático al bucle de carga y luego dispensarla hacia el sistema. Este procedimiento se implementó en los sistemas MSFIA, ya que no es viable introducir la muestra directamente en una de las jeringas, debido al gran consumo de tiempo de los pasos de lavado, necesarios para evitar la contaminación cruzada entre muestras consecutivas.

El módulo multijeringa posee en su parte posterior un conector de cuatro salidas, a cada una de cuales se le puede conectar hasta tres válvulas. A cada una de las válvulas adicionadas al sistema se le incorpora un circuito electrónico de protección para evitar su sobrecalentamiento.

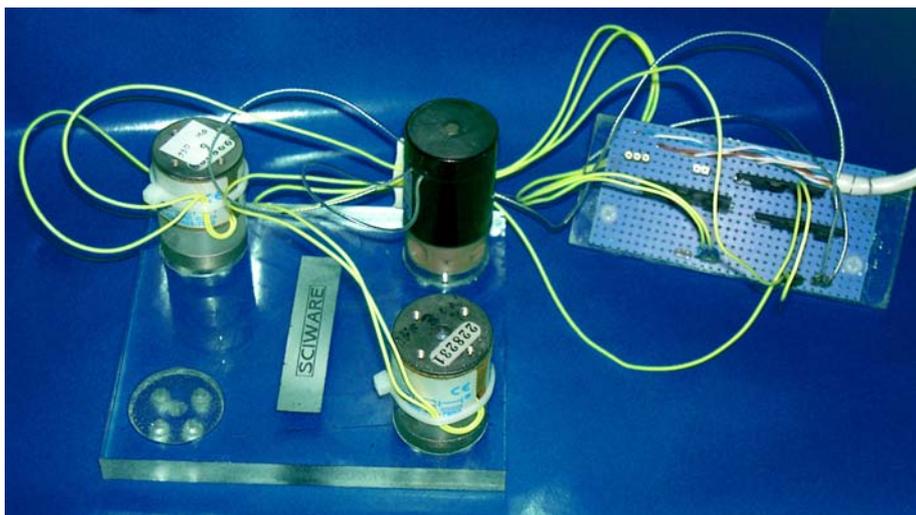


Figura 2.3. Detalle de una placa con 3 válvulas solenoides (3 vías) de conmutación rápida, con un circuito electrónico de protección.

El control automático del dispositivo de flujo mediante ordenador se realiza a través de una interfase RS232C. A su vez, esta interfase permite también la conexión de módulos en cadena, utilizando un solo puerto serie del ordenador.

Los sistemas también comprenden un muestreador automático (Crison) y el conjunto de tuberías. Los bucles de carga (BC) y de reacción (BR) y los conductos del sistema fueron hechos con tubería de PTFE (politetrafluoroetileno) de 0,8 mm de diámetro interno, mientras que los tubos utilizados para cargar las jeringas fueron de 1,5 mm de diámetro interno. Los bucles de reacción anudados se prepararon entrelazando la tubería de PTFE en nudos de unos 5 mm de diámetro (Figura 2.4). En cada capítulo se especifican las longitudes de los BC y los BR empleados en cada sistema en particular.

Los conectores utilizados, de dos, tres, cuatro y hasta cinco vías, fueron contruidos en el laboratorio con PMMA (polimetilmetacrilato).

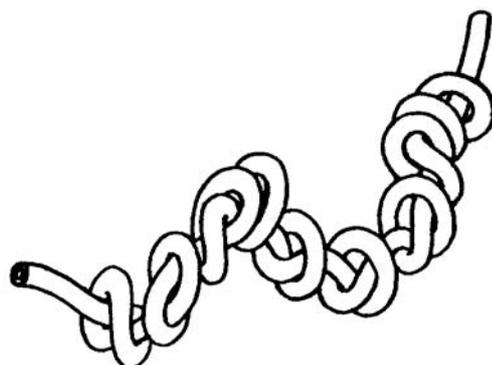


Figura 2.4. Bucle de reacción anudado.

2.1.1. Módulo de difusión gaseosa

El módulo de difusión gaseosa (DG) utilizado en los métodos de análisis en flujo propuestos para realizar la separación en línea del analito, está formado por dos bloques de TEFZEL (co-polimero de tetrafluoroetileno y etileno) con surcos semi-tubulares con forma de S que proporcionan un área superficial de $1,0 \text{ cm}^2$ y un volumen interno de $25 \text{ }\mu\text{l}$ cada uno. El surco de cada bloque coincide perfectamente con su imagen reflejada en el otro (Figura 2.5). La membrana hidrofóbica utilizada en los métodos propuestos se coloca entre los dos bloques de la unidad, de modo que separa físicamente la corriente aceptora de la dadora.

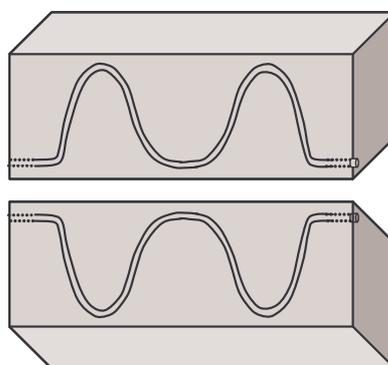


Figura 2.5. Esquema de los dos bloques que conforman el módulo de difusión gaseosa.

2.1.2. Celda de flujo optródica

El optrodo utilizado en los métodos de análisis en flujo propuestos para realizar la pre-concentración en línea del analito fue construido en el laboratorio (Figura 2.6). En la misma celda de flujo optródica se lleva a cabo la extracción en fase sólida y la medición de la reflectancia. Ésta estuvo formada por dos bloques opacos, químicamente resistentes, hechos de PEEK (polímero – poli éter éter cetona) de 1,2 cm de espesor y 3 cm de lado, firmemente unidos mediante tornillos. El bloque superior fue completamente perforado para alojar el brazo principal de la fibra óptica bifurcada. Este bloque también lleva una delgada ventana plástica, obtenida desde cubetas UV Plastibrand® (Wertheim, Alemania), la cual cubre el extremo de la fibra óptica para protegerlo de los reactivos agresivos.

Un espaciador de PTFE con un espesor de 0,5 mm y una ranura de 1 x 0,1 cm, fue colocado entre los dos bloques, el cual determina la zona de retención efectiva. El espesor del espaciador no supone ningún problema con el volumen muerto, pero es un factor muy importante en la sensibilidad de la técnica, ya que debe ser tan delgada como sea posible para evitar la pérdida de energía radiante. El bloque inferior fue cuidadosamente perforado para alojar el disco de extracción y la pieza que le sirve de sostén. La membrana fue ubicada sobre una frita de polietileno (9 mm de diámetro, 20 μm de tamaño de poro), y ambas fueron sostenidas por un conector de PVC (policloruro de vinilo). Este conector estaba abierto a la atmósfera, para permitir que el líquido fluyera libremente al atravesar la membrana, con lo que la celda de flujo optródica queda libre de efectos de sobrepresión. Este bloque inferior también fue perforado para insertarle el conector del flujo entrante.

Cabe resaltar que la celda de flujo utilizada en este trabajo es una versión mejorada de una configuración utilizada anteriormente [43]. Este nuevo diseño no requiere que la ventana protectora sea perforada ya que el flujo de entrada está colocado debajo. Además, el cambio de disco de membrana es extremadamente simple y rápido, sin necesitar desarmar todos los componentes de la celda de flujo. El tiempo requerido para reemplazar los discos de membrana fue inferior a un minuto.

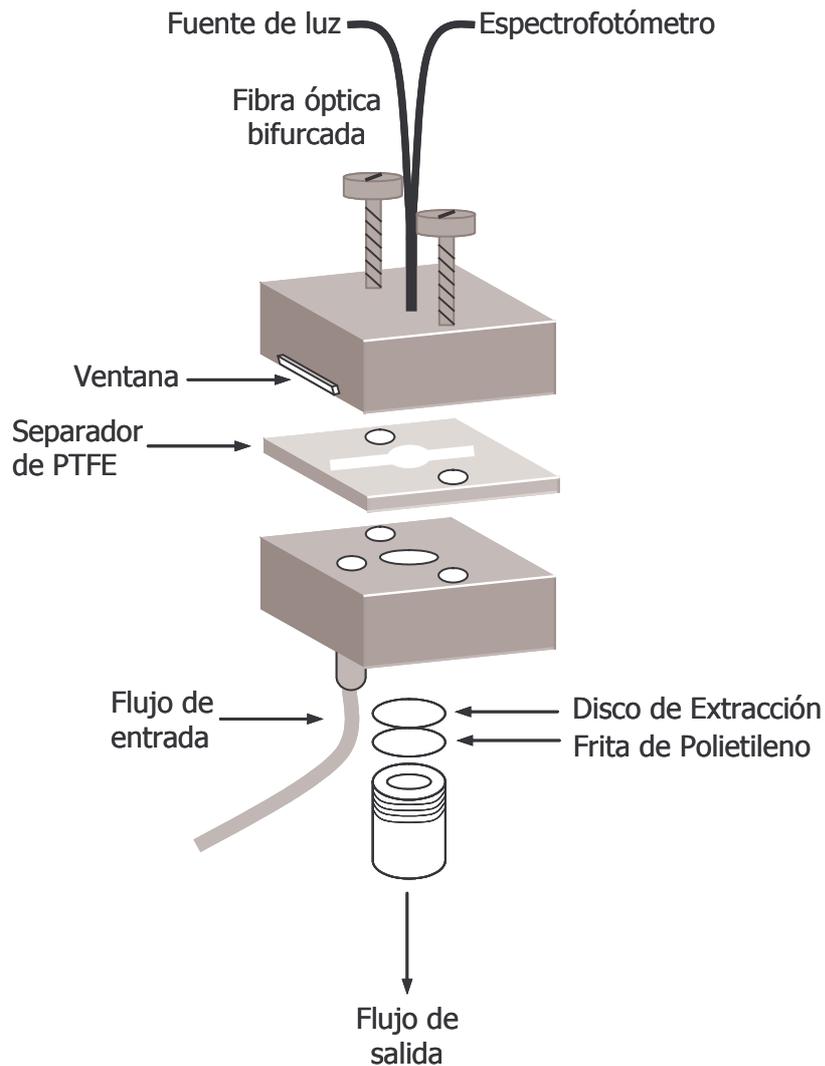


Figura 2.6. Representación esquemática de la celda de flujo para pre-concentración en fase sólida basada en discos de membrana.

2.1.3. Sistemas de detección

Dos tipos de sistemas de detección óptica miniaturizados fueron utilizados en los métodos desarrollados. Un tipo de detector óptico se conformó por un espectrofotómetro CCD (*Coupled Charge Device*) *PC-plug-in*, conectado al ordenador a través de una tarjeta PC 2000 A/D (Ocean Optics, Dunedin, FL) insertada en una ranura del ordenador. El otro tipo de detector óptico utilizado fue un espectrofotómetro CCD externo con conexión USB 2000 (Ocean Optics) (Figura 2.7). Ambos detectores utilizados se conectaron a la celda de flujo

mediante una fibra óptica (Ocean Optics) con un núcleo de de 400 μm de diámetro, que según el sistema fue simple o bifurcada.

Como fuente de luz se utilizaron diodos emisores de luz o LED (*Light Emission Diode*). Estos dispositivos son sencillos y generalmente muy económicos, de comportamiento muy estable y pueden alimentarse por dispositivos electrónicos muy simples. Debido a que la radiación emitida es proporcional a la intensidad de corriente que circula a través del LED, normalmente se alimentan con fuentes de intensidad (en vez de fuentes de tensión). Se utilizaron dos tipos de LEDs, un diodo emisor de luz (diodo rojo, 15 mA de intensidad máxima, banda espectral entre 600 y 700 nm, Sciware, Palma de Mallorca, España) y un diodo emisor de luz láser (diodo rojo, 75 mA de intensidad máxima, banda espectral de 620-700 nm, Sciware) con una fuente de suministro de energía de intensidad de corriente constante ajustable (Sciware).

En cada capítulo se especifican el tipo de espectrofotómetro y de diodo utilizado en cada caso en particular. La longitud de onda analítica seleccionada para determinar el azul de metileno fue de 666 nm.



Figura 2.7. Sistema de detección espectrofotométrica constituido por un espectrofotómetro CCD (USB 2000, Ocean Optics), una fibra óptica conectándolo con la celda y un cabezal de diodos LED alimentado por una fuente de intensidad.

2.2. Software

El control instrumental, la adquisición de datos y el procesamiento de los mismos se realizan mediante el programa AutoAnalysis 5.0 desarrollado por el mismo grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente [44]. La característica distintiva de dicho programa, realizado con Delphi 5.0 y Visual C++ 6.0 y basado en librerías dinámicas enlazadas (DLL's) a 32 bits, es la viabilidad de usar una aplicación simple y versátil, para cualquier instrumentación y sistema de detección utilizados. Además, el trabajar a 32 bits ha permitido desarrollar un programa multitarea, que permite simultáneamente la aplicación del método en flujo desarrollado, el tratamiento de datos por el mismo programa y la edición de documentos con otros programas comerciales. El programa incluye un protocolo básico, que permite la configuración de los equipos que conforman el analizador en flujo montado. Para comenzar se seleccionan de una lista de disponibles, las DLL's de los canales de comunicación necesarios para el detector y demás instrumentos. Luego se cargan las DLL's individuales y específicas de cada instrumento, tales como DLL's diseñadas para el control del módulo multijeringa, del muestreador automático o de un espectrofotómetro (Figura 2.8).

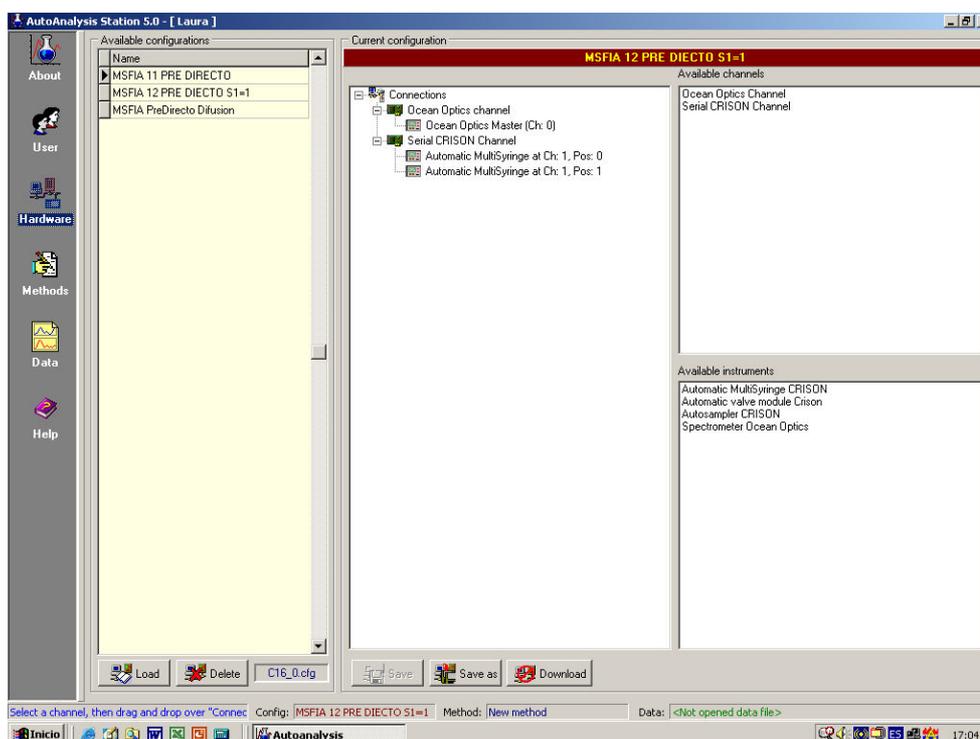


Figura 2.8. Panel de control de conexiones del programa AutoAnalysis.

La edición de un método analítico con el programa AutoAnalysis consiste en crear una secuencia de instrucciones, donde cada instrucción es ejecutada por uno de los instrumentos conectados o bien es un comando definido por el sistema para controlar el tiempo, agregar marcas, condicionales o repetir procedimientos. Un procedimiento es un conjunto de instrucciones agrupadas bajo el mismo nombre, que bien puede repetirse dentro del mismo método o puede ser utilizada por métodos diferentes, con la ventaja de definirla solo una vez. La ejecución de las instrucciones de los instrumentos puede llevarse a cabo de dos maneras, en forma exclusiva durante la cual no se realizará ninguna otra instrucción hasta finalizar la que está en curso, y en forma no exclusiva según la cual el método continúa con la ejecución de los pasos sucesivos sin finalizar la que está en curso (Figura 2.9).

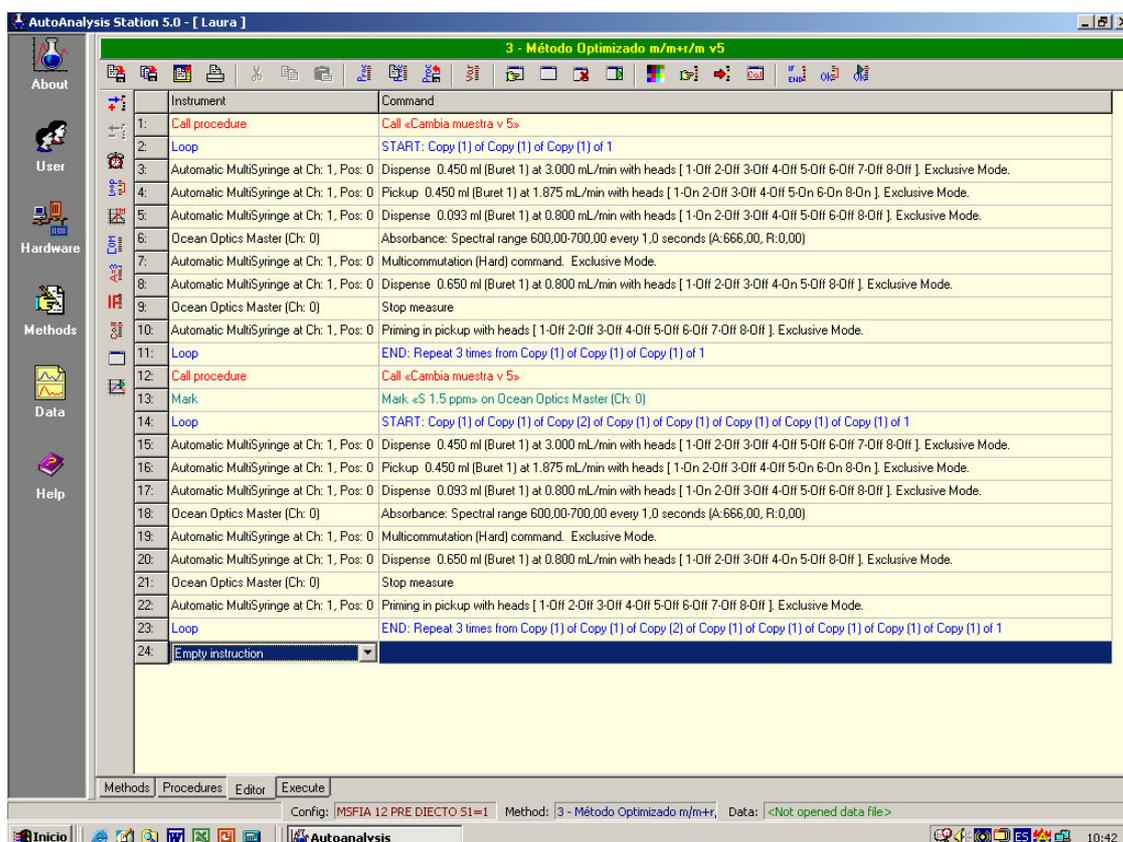


Figura 2.9. Panel de edición de métodos analíticos del programa AutoAnalysis.

Una vez definido un método o cargado uno existente, se procede a la ejecución del mismo. Mediante una barra de herramientas se puede controlar dicha ejecución y los parámetros del área de dibujo. El programa AutoAnalysis registra la señal analítica y a su vez da un valor numérico del parámetro de interés basado en dicha señal (altura de pico, área de pico) que es seleccionado por el usuario (Figura 2.10). Además, permite el procesamiento de los datos que acaba de adquirir o aquellos registrados en experimentos anteriores. También se pueden almacenar los espectros obtenidos durante la adquisición y recuperarlos más tarde. Dentro del procesamiento de datos, AutoAnalysis permite el suavizado de los picos, así como obtener su primera y segunda derivada, visualizar la línea de base utilizada en el cálculo de áreas y alturas de pico, así como corregir su integración si se aprecia que no son correctas, eliminar picos no deseados (pequeñas burbujas), realizar y trabajar con curvas de calibración integradas, hasta realizar el procesamiento en-línea de los datos mediante el uso de condicionales.

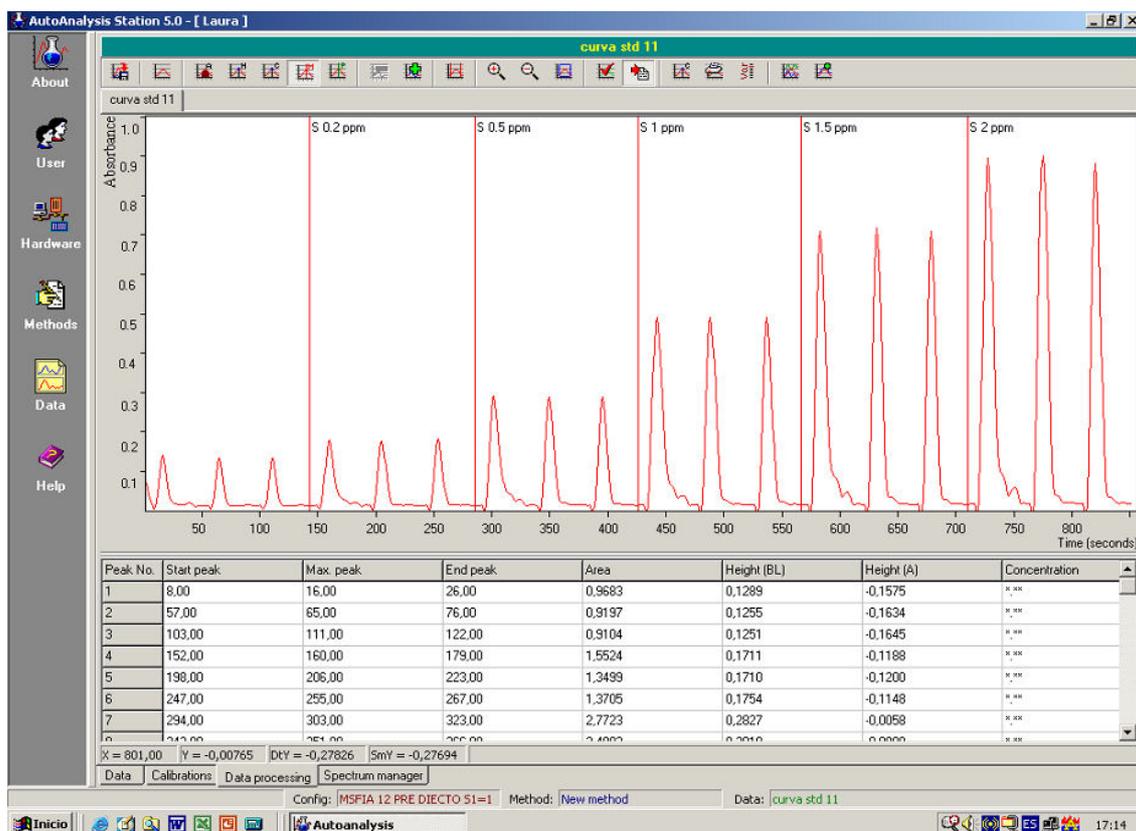


Figura 2.10. Registro de la señal analítica y tabla con valores de parámetros basados en dicha señal (comienzo de pico, altura máxima, final de pico).

2.3. Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y las disoluciones se prepararon con agua destilada, la cual fue previamente hervida para que la preparación de patrones y reactivos se realice con agua libre de oxígeno disuelto.

La disolución madre de reactivo cromogénico (125 mM) se preparó disolviendo 2,16 g de monoclóhidrato de N-N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD, Sigma) en aproximadamente 50 ml de agua destilada, a los cuales se les adicionó 10 o 30 ml de HCl 5 M según el método, antes de completar hasta 100 ml con agua destilada. Las distintas disoluciones de trabajo empleadas se obtuvieron por dilución de la disolución madre con HCl 0,5 o 1,5 M según el método.

La disolución madre de reactivo oxidante (200 mM Fe(III)) consistió en 9,64 g de $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Scharlau) disuelto en una mezcla de 50 ml de agua destilada y 10 o 36 ml de HCl 5M según el método, que luego se completó hasta 100 ml con agua destilada. Las disoluciones de trabajo de Fe(III) se prepararon por dilución de la disolución madre con HCl 0,5 o 1,8 M según el método.

El *carrier* o corriente portadora fue en todos los casos, una disolución de HCl preparada por dilución de ácido clorhídrico concentrado (Scharlau). En cada capítulo se especifica la concentración empleada en los sistemas.

La disolución madre de sulfuro (1000 mg l^{-1}) fue preparada diariamente disolviendo 0,75 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 95% (Panreac) en 50 ml de disolución NaOH 50 mM y posterior dilución hasta 100 ml con agua destilada. Los patrones fueron preparados por debida dilución de la disolución madre con NaOH 25 mM. Debido a que la sal utilizada en la preparación de la disolución madre no puede considerarse como patrón primario, la disolución final fue diariamente estandarizada iodométricamente [41]. El método de estandarización se basa en una valoración por retroceso, en la cual primero se valora una disolución de tiosulfato contra una de yodato de potasio anhidro calidad primaria (secado a 120°C durante 4 horas). Luego se procede a realizar las valoraciones de la disolución patrón de yodo y de la de sulfuro, con la disolución de tiosulfato

utilizando almidón como indicador. Los cálculos se realizan según la siguiente ecuación:

$$gS^{2-}l^{-1} = \frac{[(Va \times Ca) - (Vb \times Cb)] \times 16}{Vm}$$

Donde:

V_a = ml disolución de yodo

C_a = normalidad disolución de yodo

V_b = ml disolución de tiosulfato

C_b = normalidad disolución de tiosulfato

V_m = ml disolución de sulfuro

En cada capítulo se especifican las concentraciones de las disoluciones del patrón de sulfuro empleadas en cada caso en particular.

2.4. Validación de los métodos propuestos

Debido a que no existen patrones o muestras certificadas de sulfuro, fue necesario realizar en todos los casos, métodos de contraste sobre las muestras analizadas.

En los métodos desarrollados para determinar niveles de sulfuro del orden de los $mg\ l^{-1}$, se utilizó como método de contraste el método estandarizado propuesto por APHA–Métodos Normalizados [41] basado en la determinación espectrofotométrica del sulfuro.

En aquellos métodos donde los niveles de sulfuro determinados son muy bajos, concentraciones traza del orden de $\mu g\ l^{-1}$, se llevaron a cabo ensayos de recuperación, con el fin de descartar posibles efectos interferentes de la matriz de la muestra.

3

MÉTODO MSFIA AUTOMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE SULFURO EN AGUA*

3.1. Introducción

El objetivo de este trabajo es desarrollar un procedimiento MSFIA para la determinación espectrofotométrica de sulfuro en aguas naturales y residuales, basándose en la selectividad de la reacción antes mencionada en la cual los iones sulfuro son convertidos en azul de metileno. Se proponen dos modalidades de inyección, una basada en un nuevo tipo de inyección sándwich multiconmutada, desarrollada y aplicada satisfactoriamente para mejorar la sensibilidad y fiabilidad de la metodología, mientras que una modalidad de inyección múltiple fue desarrollada con el objeto de alcanzar una alta frecuencia de muestreo. Además, fueron evaluadas varias configuraciones atendiendo a las reacciones involucradas en la generación de la especie coloreada (es decir, la oxidación de la amina y el acoplamiento nucleofílico del sulfuro), capitalizando al máximo la versatilidad de las técnicas de flujo.

* L. Ferrer, G. de Armas, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, Talanta 64 (2004) 1119.
(Ver Anexo)

El sistema de flujo configurado con un espectrofotómetro sencillo y miniaturizado conectado por fibra óptica provisto con un diodo emisor de luz (LED) garantiza la aplicabilidad de la metodología automatizada en el análisis *in situ* y el monitoreo en tiempo real del analito, pudiendo extenderse a otros parámetros de interés ambiental con la debida selección de los LED's.

3.2. Parte experimental

3.2.1. Reactivos y disoluciones

Se preparó una disolución de trabajo 50 mM de DMPD por dilución de la disolución madre con HCl 1,5 M.

La disolución de trabajo 60 mM de Fe(III) fue preparada por dilución de la disolución madre con HCl 1,8 M.

El *carrier* o corriente portadora fue una disolución HCl 0,7 M preparada por dilución de ácido clorhídrico concentrado (Scharlau).

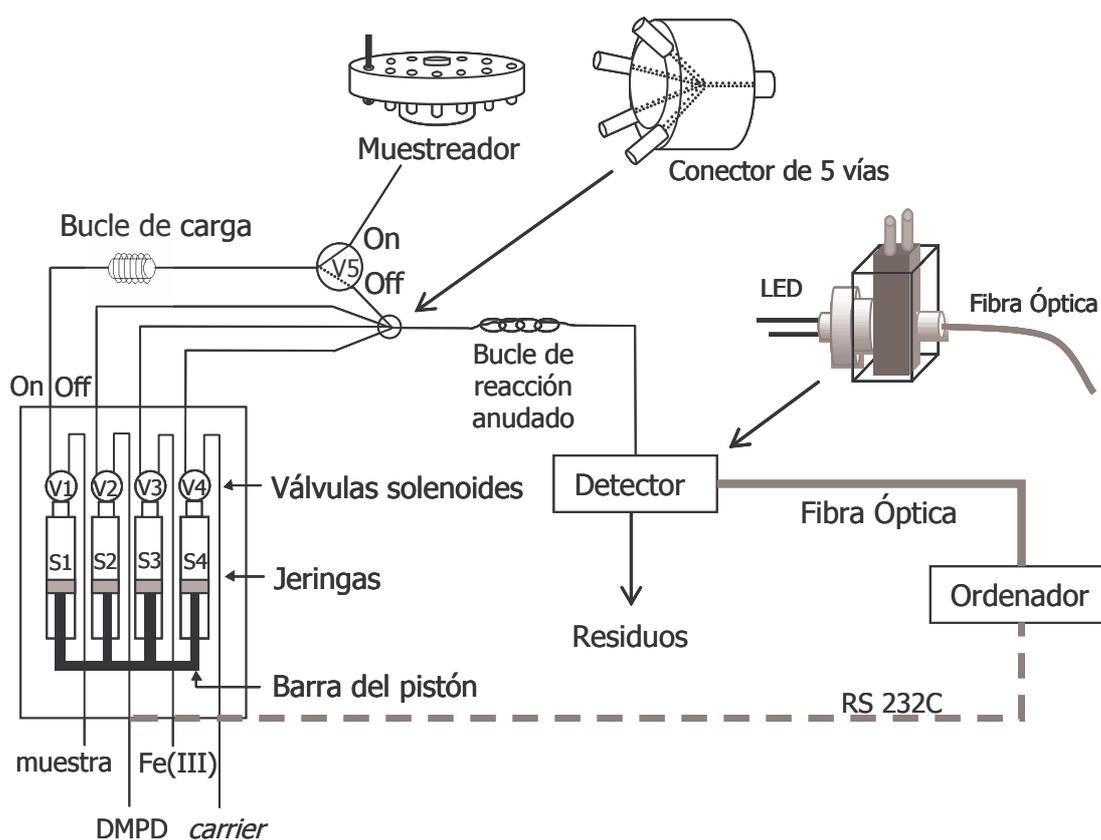
Los patrones de sulfuro ($0,2 - 2 \text{ mg l}^{-1}$) fueron preparados mediante adecuada dilución de la disolución madre con NaOH 25 mM.

3.2.2. Sistema de flujo y detector óptico

El sistema de inyección en flujo multijeringa concebido para la determinación espectrofotométrica de sulfuro se muestra en la Figura 3.1. La bomba de pistón multijeringa se equipó con cuatro jeringas S1–S4 (Hamilton, Suiza) de 2,5; 1; 1 y 5 ml, respectivamente. Una válvula solenoide discreta adicional (Takasago, Japón), V5, se colocó para dirigir la zona aspirada desde el muestreador (Crison) a un conector especialmente diseñado de 5 vías de PMMA (ver Figura 3.1 para más detalles). La longitud del bucle de carga (BC) y del bucle de reacción anudado (BR) fueron 3 m y 122 cm respectivamente.

El detector óptico miniaturizado está formado por un espectrofotómetro CCD (*Coupled Charge Device*) conectado al ordenador a través de una tarjeta PC 2000 A/D (Ocean Optics, Dunedin, FL) insertada en una ranura del

ordenador. Esta tarjeta está conectada a la celda de flujo de vidrio (10 mm de camino óptico y 36 μ l de volumen) a través de una fibra óptica con un núcleo de 400 μ m de diámetro. Como fuente de luz se utilizó un LED (diodo rojo, 15 mA de intensidad máxima, banda espectral 600-700 nm, Sciware) alimentado por una fuente de intensidad de corriente constante ajustable (Sciware). Las siguientes condiciones de trabajo se utilizaron para configurar la adquisición de datos con AutoAnalysis 5.0: λ 666 nm, 20 milisegundos de tiempo de integración, 2 lecturas para promediar, ventana de suavizado de 12 puntos y una frecuencia de lectura de 1 segundo.



Módulo Multijeringa

Figura 3.1. Representación esquemática del sistema de inyección en flujo multijeringa diseñado para la determinación de sulfuro. DMPD: monoclóhidrato de N-N-dimetil-p-fenilendiamina. LED: diodo emisor de luz.

3.2.3. Protocolo de multiconmutación para el análisis de sulfuro

La característica principal de la configuración propuesta es la viabilidad de evaluar diferentes modalidades de inyección usando volúmenes mínimos de muestra y de reactivos, los cuales pueden ser dispensados tanto simultáneamente como secuencialmente dentro de la tubería a diferentes caudales.

3.2.3.1 Modalidad de inyección sándwich

La modalidad de inyección adoptada consistió en un nuevo protocolo de multiconmutación que involucra la inyección simultánea de muestra y reactivos, entre dos segmentos adyacentes de muestra (Figura 3.2, Tabla 3.1).

El protocolo automatizado para la determinación espectrofotométrica MSFIA de sulfuro usando un protocolo de inyección del tipo sándwich puede resumirse como sigue:

- 1- Inicialmente, se llenan las jeringas con las disoluciones desde sus respectivos depósitos a un caudal de $5,0 \text{ ml min}^{-1}$ (para la jeringa 1) con las válvulas 1-On 2-Off 3-Off 4-Off 5-On. La activación de la válvula 5 permite la carga sincronizada del bucle de carga con $450 \mu\text{l}$ de muestra.
- 2- La jeringa 1 se prepara para dispensar $0,45 \text{ ml}$ a $6,0 \text{ ml min}^{-1}$, mientras se ejecuta el comando multiconmutación tipo sándwich detallado en la Tabla 3.1. En este paso, los segmentos de muestra y reactivos se colocan en el bucle de reacción durante un único desplazamiento hacia arriba de la barra del pistón.
- 3- El espectrofotómetro comienza la adquisición de datos a 1 Hz .
- 4- Con el objeto de registrar las señales analíticas transitorias, se programa la jeringa 1 con las válvulas 1-Off 2-Off 3-Off 4-On 5-Off para dispensar un volumen de portador determinado ($0,65 \text{ ml}$) dentro del bucle de reacción a 2 ml min^{-1} . Así los diferentes segmentos son interdispersados corriente abajo, teniendo lugar la reacción de Fischer. El exceso de portador liberado durante esta etapa tiene como objeto enjuagar el bucle de reacción,

dejando el sistema listo para un nuevo ciclo analítico. El portador es dispensado por dos jeringas (S1 en el paso de multiconmutación y S4 en el paso final) en orden de hacer uso de un único desplazamiento hacia arriba de la barra del pistón. Por otro lado, la utilización de una jeringa con un volumen mayor podría causar una pérdida de precisión.



Figura 3.2. Esquema del tipo de inyección sándwich multiconmutada.

Tabla 3.1. Protocolo de inyección multiconmutado tipo sándwich utilizado para la determinación espectrofotométrica de sulfuro por MSFIA.

Paso de multiconmutación	Posición válvula solenoide					Muestra (μl)	Reactivos (μl)		Carrier (μl)	Caudal total (ml min ⁻¹)
	V1	V2	V3	V4	V5		R ₁	R ₂		
Inyección de muestra	On	Off	Off	Off	Off	125	---	---	---	6,0
Inyección simultanea de muestra y reactivos	On	On	On	Off	Off	200	80	80	---	6,0
Inyección de muestra	On	Off	Off	Off	Off	125	---	---	---	6,0
Inyección de carrier	On	Off	Off	Off	Off	---	---	---	1200	4,0

R₁: DMPD; R₂: Fe(III).

3.2.3.2 Modalidad de inyección múltiple

Para esta modalidad se desarrolló un protocolo de multiconmutación que involucra la inyección simultánea de muestra y reactivos (Tabla 3.2). El protocolo automatizado para la determinación espectrofotométrica multiconmutada MSFIA de sulfuro mediante la modalidad de inyección múltiple puede resumirse como sigue:

- 1- Inicialmente, las jeringas son llenadas con las disoluciones desde sus respectivos depósitos a un caudal de $5,0 \text{ ml min}^{-1}$ (para la jeringa 1) con las válvulas 1-On 2-Off 3-Off 4-Off 5-On. La activación de la válvula 5 permite la carga sincronizada del bucle de carga con $700 \mu\text{l}$ de muestra. El bucle de carga se llena con un exceso de volumen para tener en cuenta la dispersión de la muestra y conseguir una buena repetitividad en la altura de los picos.
- 2- El espectrofotómetro comienza la adquisición de datos a 1 Hz .
- 3- La jeringa 1 se prepara para dispensar $0,20 \text{ ml}$ a $6,0 \text{ ml min}^{-1}$, mientras se ejecuta el comando de multiconmutación detallado en la Tabla 3.2. En este paso, los segmentos de muestra y reactivos se colocan en el bucle de reacción durante un único desplazamiento hacia arriba de la barra del pistón. Con el objeto de registrar las señales analíticas transitorias se dispensa un volumen de portador determinado dentro del bucle de reacción. Así los diferentes segmentos son interdispersados corriente abajo, teniendo lugar la reacción de Fischer. El exceso de portador liberado durante esta etapa tiene como objeto lavar el bucle de reacción, dejando el sistema listo para un nuevo ciclo analítico.
- 4- El paso 3 se repite tres veces durante un único desplazamiento hacia arriba de la barra del pistón obteniéndose tres inyecciones (estrategia múltiple) en el mismo protocolo analítico. Los tres picos son promediados para llevar a cabo la calibración y la cuantificación.

Tabla 3.2. Protocolo de inyección multiconmutada tipo múltiple utilizado para la determinación espectrofotométrica de sulfuro por MSFIA.

Paso de multiconmutación	Posición válvula solenoide					Muestra (μl)	Reactivos (μl)		Carrier (μl)	Caudal total (ml min^{-1})
	V1	V2	V3	V4	V5		R ₁	R ₂		
Inyección simultánea de muestra y reactivos	On	On	On	Off	Off	200	80	80	---	6,0
Inyección de <i>carrier</i>	Off	Off	Off	On	Off	---	---	---	900	4,0

R₁: DMPD; R₂: Fe(III).

3.3. Resultados y Discusión

Se han evaluado diferentes configuraciones del sistema flujo, tales como la utilización de un único reactivo formado por la mezcla de DMPD y Fe(III), la mezcla en línea previa de estos reactivos antes de su mezcla con la muestra, y la configuración que se adoptó finalmente, donde la mezcla de los segmentos de muestra y de ambos reactivos se realiza simultáneamente, en el mismo punto de confluencia.

3.3.1. Configuración del sistema

Los experimentos preliminares se llevaron a cabo para seleccionar la configuración apropiada en el montaje MSFIA. Al principio, se montó un esquema de zonas de mezcla consecutivas que involucraban una mezcla en línea de los reactivos antes de la unión con el segmento de muestra. Aunque este es el esquema más comúnmente utilizado en las determinaciones por inyección en flujo [42,45-47], no se encontraron diferencias importantes en cuanto a sensibilidad y coeficientes de variación en comparación con una configuración simple basada en la unión de la muestra con los reactivos en el

mismo punto de confluencia (ver Figura 3.1). Este último sistema fue seleccionado para llevar a cabo todas las investigaciones debido a su simplicidad y las potenciales características analíticas que podían ser alcanzadas.

3.3.2. Variables químicas

Las variables químicas fueron estudiadas para hallar las condiciones óptimas del desarrollo de color en línea del colorante azul de metileno. La influencia de la concentración de DMPD fue evaluada entre 15 y 60 mM en un medio 2,25 M HCl, manteniendo la concentración de Fe(III) fija a 100 mM. Como puede observarse en la Figura 3.3, se obtuvo la mayor absorbancia al utilizar concentraciones de amina por encima de 40 mM. El efecto de la concentración de reactivo oxidante (preparado en un medio 2,25 M de HCl) sobre la señal analítica fue también estudiado entre 10 y 100 mM, fijando la concentración de DMPD en 50 mM. Podría esperarse que grandes concentraciones de Fe(III) aumenten el rendimiento de la reacción de Fischer, sin embargo, concentraciones mayores a 60 mM de Fe(III) deberán evitarse debido a la fuerte interferencia óptica debida al efecto Schlieren [48-52]. También, se estudió la dependencia de la acidez de las disoluciones sobre la reacción de desarrollo del color, no encontrándose diferencias significativas en la señal analítica dentro del intervalo 1,4 – 3,0 M de HCl para ambos reactivos (Figura 3.3). Así, la composición final de los reactivos cromogénicos fue DMPD 50 mM en HCl 1,5 M y Fe(III) 60 mM en HCl 1,8 M para los siguientes experimentos.

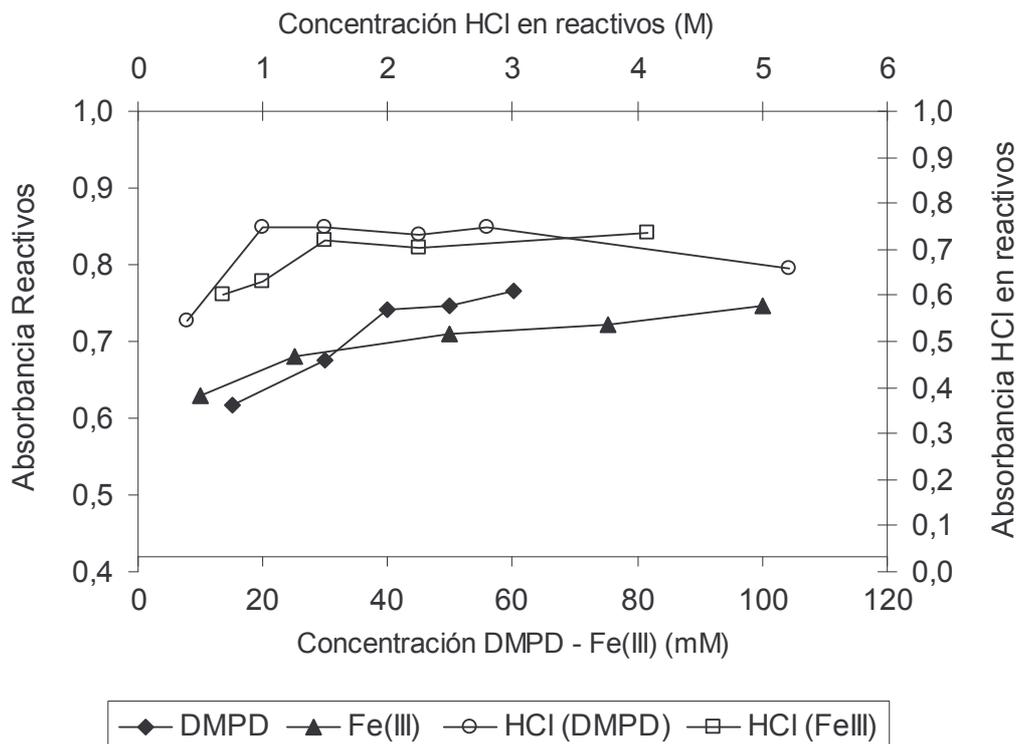


Figura 3.3. Influencia de las variables químicas sobre la señal analítica. Concentración de sulfuro: $1,6 \text{ mg l}^{-1}$. DMPD: monoclóhidrato de N-N-dimetil-p-fenilendiamina.

El punto débil de los procedimientos en flujo espectrofotométricos basados en LED's con mediciones en fase líquida, es la incapacidad de compensar las señales resultantes del efecto Schlieren mediante detección multi-longitud de onda. Sin embargo, los cambios en los índices de refracción en los extremos del pico pueden ser reducidos en gran parte, en el sistema de flujo descrito, con la adecuada selección de la composición de la disolución portadora. Por lo tanto, la disolución portadora recomendada debe contener HCl 0,7 M, con el objeto de igualarse con la concentración de ácido del segmento de azul de metileno detectado por el espectrofotómetro.

3.3.3. Parámetros de flujo

Una vez optimizadas las condiciones químicas, se evaluaron los efectos de los parámetros de flujo, tales como los volúmenes de muestra y de reactivos y el caudal, utilizando una concentración de sulfuro de $1,6 \text{ mg l}^{-1}$. Un parámetro crítico a tener en cuenta es el volumen de muestra. Para el cual, como puede verse en la Figura 3.4, se obtiene un incremento de cuatro veces en los valores de la altura de pico, al incrementarlo de 100 a 450 μl . Con el objeto de evitar un excesivo consumo de muestra sin disminuir el intervalo de trabajo, se seleccionó un volumen de muestra de 450 μl para el procedimiento basado en la modalidad de inyección sándwich.

Cabe destacar que una característica notable del módulo multijeringa es el amplio rango de caudales disponibles para un conjunto particular de jeringas. Los distintos caudales de inyección ensayados de un volumen determinado de muestra (en un rango de un orden de magnitud, $0,9$ a $9,0 \text{ ml min}^{-1}$) no resultaron en diferencias significativas en cuanto a sensibilidad, aunque se produce una apreciable pérdida de precisión por encima de los 6 ml min^{-1} . Un comportamiento similar se halló para el caudal del portador. Con el objeto de asegurar una frecuencia de análisis conveniente, los caudales de muestra y portador seleccionados, para ambos procedimientos de inyección, fueron de $6,0$ y $4,0 \text{ ml min}^{-1}$ respectivamente.

El tipo y la longitud del bucle de reacción fueron también estudiados con el fin de mejorar las condiciones de reacción. Así, se ensayaron reactores lisos y anudados con longitudes que variaron entre 100 y 180 cm. Como puede observarse en la Figura 3.4, los reactores anudados dan una mejor respuesta analítica como consecuencia de la contribución de los flujos toroidales secundarios [53], los cuales mejoran la mezcla radial entre segmentos además de reducir la dispersión axial del azul de metileno generado.

Considerando las rápidas cinéticas de las reacciones involucradas en el método de Fischer, un reactor anudado de 122 cm de largo, el cual se corresponde con los tamaños de las zonas inyectadas, fue elegido para los subsiguientes ensayos.

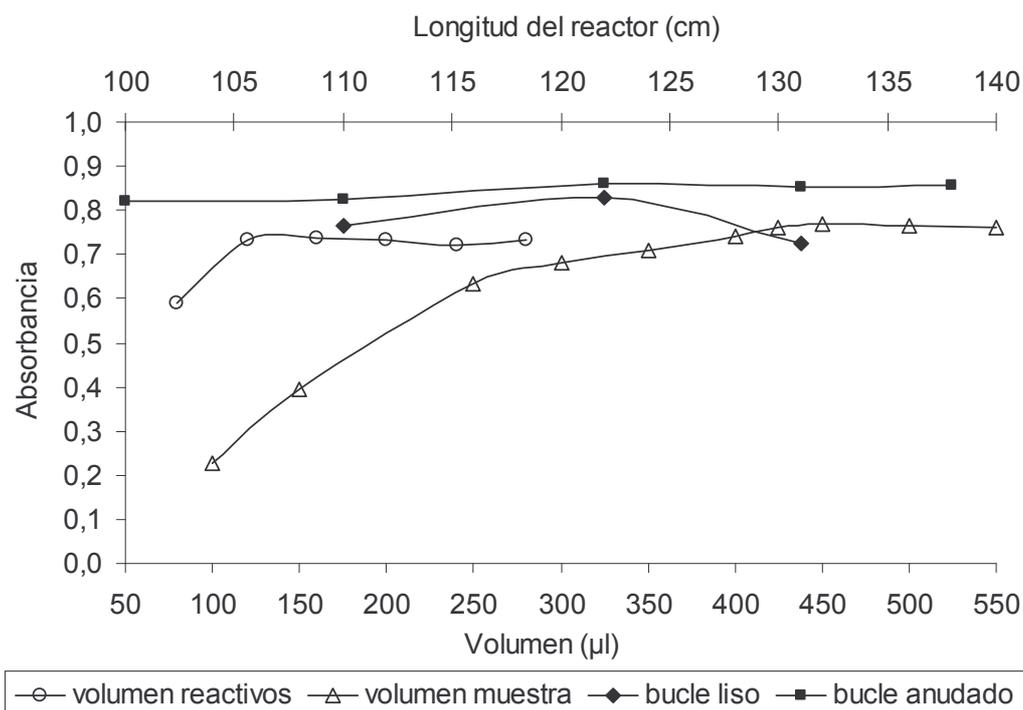


Figura 3.4. Influencia de los volúmenes de muestra y reactivos y configuraciones del bucle de reacción (liso y anudado), sobre la señal analítica. Condiciones de trabajo: $1,6 \text{ mg l}^{-1}$ de sulfuro, DMPD 50 mM en HCl 1,5 M y Fe(III) 60 mM en HCl 1,8 M.

3.3.3.1 Inyección sándwich

Dos ventajas especiales pueden obtenerse de la aplicación de la técnica de inyección sándwich multiconmutada descrita en la sección experimental de este capítulo, con respecto a la inyección simple de muestra y reactivos para un volumen determinado de muestra (450 µl). Por un lado, se garantiza una mejor interdispersión entre las zonas, por otro lado puede realizarse un ahorro de reactivos de más de 2 veces al utilizado en la inyección simple (de 360 a 160 µl) mientras se alcanza un incremento del 15% en la altura de pico.

Además, se optimizaron los volúmenes de los segmentos de muestra de la inyección tipo sándwich. Como puede observarse en la Tabla 3.3, la

disminución del tamaño del segmento de muestra del borde causa una disminución de la señal analítica. Este resultado indica que los segmentos de muestra de los bordes son interdispersados corriente abajo con los reactivos, mejorando así la mezcla. Con el propósito de garantizar la mayor altura de pico y el menor consumo de muestra se seleccionó el esquema 125-200-125 μl de muestra. Además, otra característica destacable que puede observarse en la Tabla 3.3 es que las mejores señales analíticas se obtuvieron en todos los casos usando un reactor anudado.

Cabe destacar, que la sensibilidad alcanzada por la aplicación de la técnica de inyección sándwich multiconmutada es mayor que las citadas en trabajos previos sobre técnicas de flujo que involucran al método del azul de metileno (ver Tabla 3.7).

Tabla 3.3. Influencia de la modalidad de inyección y de la configuración del bucle de reacción sobre la señal analítica. Concentración de sulfuro: 1,5 mg l^{-1} .

	Vol. segmentos muestra (μl)	Vol. total muestra (μl)	Vol. total reactivos (μl)	Bucle reacción anudado		Bucle reacción simple	
				Absorbancia	Reducción señal (%)	Absorbancia	Reducción señal (%)
M/M+R/M	200-200-200	600	160	0,512 \pm 0,007	0	0,444 \pm 0,013	13,2
	125-200-125	450	160	0,512 \pm 0,009	0	0,437 \pm 0,008	14,6
	60-200-60	320	160	0,477 \pm 0,007	6,8	0,418 \pm 0,010	18,4
M+R	0-200-0	200	160	0,429 \pm 0,011	16,1	0,395 \pm 0,016	22,9

Volumen total reactivos: volúmenes iguales de DMPD y Fe(III). M: muestra. R: reactivos.

3.2.3.3.2 Inyección múltiple multiconmutada

Dos ventajas pueden obtenerse de la aplicación de la técnica de inyección múltiple multiconmutada con respecto a la modalidad sándwich. Por un lado, se

alcanza una mayor frecuencia de inyección (de 45 a 80 inyecciones por hora), por otro lado se consigue un ahorro de más de 2 veces en el volumen de muestra (de 450 a 200 μl), aunque se produce una disminución del 60% en la sensibilidad. De modo que la modalidad de inyección múltiple sólo se recomienda si se requiere una alta frecuencia de muestreo.

3.3.4. Características analíticas del método optimizado

Las características analíticas relevantes de ambos procedimientos MSFIA optimizados con inyección multiconmutada están resumidas en la Tabla 3.4. El intervalo de trabajo lineal se halla dentro de un orden de magnitud, lo cual concuerda con resultados informados previamente [47,54]. El límite de detección fue calculado de acuerdo al criterio de la IUPAC [55,56] como 3 veces la desviación estándar del blanco ($n=10$) sobre la pendiente de la curva de calibración. La repetitividad se obtuvo de 10 medidas consecutivas e independientes (de tres inyecciones cada una) de una concentración de sulfuro de 1 mg l^{-1} (1,4% para ambas modalidades de inyección). La robustez de ambos métodos automatizados fue verificada a partir de curvas de calibrado construidas en diez días diferentes de trabajo con disoluciones frescas preparadas de la disolución madre de sulfuro ($n=10$). Así, los coeficientes de variación fueron del 3,0% para la modalidad sándwich y 1,1% para la modalidad de inyección múltiple.

Estos resultados, junto con la alta velocidad de análisis y la estabilidad de la línea de base, revelan la conveniencia del sistema diseñado para ser implementado en estaciones de muestreo. Además, cabe destacar que la sensibilidad de la técnica MSFIA sándwich, evaluando las pendientes de las curvas de calibración siguiendo el criterio de la IUPAC [55,56], es el doble de la descrita en métodos de análisis en flujo previos [46-52,54].

Tabla 3.4. Características analíticas del método MSFIA para determinación de sulfuro.

Parámetro analítico	Inyección sándwich	Inyección Múltiple
Límite de detección (mg l ⁻¹)	0,09	0,15
Pendiente curva calibración*	0,424 ± 0,013	0,178 ± 0,002
Coefficiente correlación* (r)	0,9991 ± 0,0005	0,9988 ± 0,0003
Rango lineal (mg l ⁻¹)	0,2 – 2,0	0,5 – 5,0
R.S.D. (%) (1 mg l ⁻¹) (n=10)	1,38	1,44
Frecuencia inyección / h ⁻¹	45	80
Frecuencia muestreo / h ⁻¹ **	13	27

*Promedio ± desviación estándar (n=10)

**La frecuencia de muestreo está calculada considerando tres réplicas por muestra y el enjuague del tubo de aspiración de muestra.

3.3.5. Evaluación de interferencias

Las especies evaluadas como posibles interferentes en la determinación de sulfuro bajo condiciones dinámicas son aquellas que se encuentran frecuentemente en ambientes acuáticos anóxicos, como por ejemplo formas reducidas tales como amonio, y aquellas que son típicas en aguas residuales. Adicionalmente, también se investigó la influencia de los electrolitos del agua de mar sobre la señal analítica. Una especie fue considerada interferente cuando su concentración afectó más del 10% las lecturas de absorbancia.

En la Tabla 3.5 pueden observarse las altas concentraciones toleradas de especies iónicas comúnmente encontradas en aguas naturales. Las interferencias más severas fueron obviamente causadas por iones metálicos capaces de formar sales insolubles o especies inorgánicas involucradas en reacciones redox. Sin embargo, la tolerancia a algunos oxidantes, como el nitrito, es 10 veces mejor para la configuración MSFIA propuesta que para un sistema FIA-reverso citado en la bibliografía [47].

Tabla 3.5. Investigación de potenciales interferentes del método MSFIA propuesto para una concentración de sulfuro de 1 mg l⁻¹.

Cociente Interferente /sulfuro	Especie estudiada
100*	Al ³⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , CO ₃ ²⁻ , EDTA, K ⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , Zn ²⁺
80	NH ₄ ⁺
10	NO ₂ ⁻
1	Mn ²⁺ , Pb ²⁺
0,5	Hg ²⁺
< 0,05	Cu ²⁺

* Máxima concentración ensayada

3.3.6. Análisis de muestras

La aplicabilidad del método automático optimizado fue evaluada mediante la determinación de la especie en estudio en distintos tipos de agua (mineral, de grifo, de pozo, marina y residual). La posible existencia de interferencias de matriz fue determinada por medio de la adición de 1 mg l⁻¹ de sulfuro a las muestras.

Las muestras fueron inmediatamente analizadas después de su toma para prevenir la oxidación del analito, mediante el método MSFIA propuesto y por el recomendado por APHA-Métodos normalizados [41].

Los ensayos de recuperación de las muestras analizadas mostraron resultados dentro del rango de 96 a 104%, indicando que no ocurren pérdidas significativas de sulfuro durante el análisis. Estos resultados también demuestran la inexistencia de interferencias de matriz, con lo cual el sistema MSFIA propuesto puede ser indicado para la monitorización de sulfuro incluso en muestras de matriz compleja como el agua residual.

Los resultados obtenidos a través del sistema MSFIA desarrollado y aquellos obtenidos mediante el método manual estandarizado, concordaron ampliamente cuando se analizó sulfuro en el conjunto de muestras.

Las muestras de agua residual, colectadas en la planta de tratamiento EDAR-1, Palma de Mallorca, tienen la siguiente composición química (expresada en mg l^{-1}): BOD₅ 291 y 77, COD 737 y 271, sólidos en suspensión 457 y 138 para la entrada (pH 7,7) y salida (pH 7,2) respectivamente. Los resultados del ensayo de recuperación del conjunto de muestras de agua analizada, se presentan en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Determinación de sulfuro mediante MSFIA en muestras de agua, ensayos de recuperación y determinación por método estandarizado.

Muestra	Adición (mg l^{-1})	MSFIA- técnica sándwich		Método estandarizado (APHA)	
		Sulfuro (mg l^{-1})	Recuperación (%)	Sulfuro (mg l^{-1})	Recuperación (%)
Agua Mineral	0	N.D.		N.D.	
	1	$0,981 \pm 0,009$	98	$1,003 \pm 0,007$	100
Agua de mar	0	N.D.		N.D.	
	1	$0,977 \pm 0,006$	97	$0,953 \pm 0,002$	95
Agua de grifo	0	N.D.		N.D.	
	1	$1,011 \pm 0,004$	101	$0,996 \pm 0,007$	100
Agua de pozo	0	N.D.		N.D.	
	1	$0,969 \pm 0,011$	96	$0,986 \pm 0,002$	98
Agua residual salida*	0	N.D.		N.D.	
	1	$1,043 \pm 0,006$	104	$1,010 \pm 0,008$	101
Agua residual clarificador ^a	0	$5,96 \pm 0,05$		$5,60 \pm 0,11$	
	1	$6,938 \pm 0,009$	97	$6,62 \pm 0,14$	102

Los resultados están expresados como la media de cuatro replicas \pm desviación estándar.

N.D.: No detectable.

* Agua residual floculada.

^a La muestra fue diluida 5 veces antes del análisis.

3.3.7. Comparación de las características analíticas con las de otros métodos en flujo publicados

En esta sección, el sistema MSFIA propuesto es comparado con diferentes técnicas de flujo descritas en la literatura, tales como el análisis por inyección en flujo (FIA), el análisis por inyección en flujo reverso (r-FIA), el análisis en flujo monosegmentado (MSFA) y el análisis por inyección secuencial (SIA). Las características analíticas relevantes de cada método están resumidas en la Tabla 3.7.

Como puede verse, ambas modalidades de inyección del método MSFIA proporcionan bajos coeficientes de variación debido a la exactitud con la que son dispensados los volúmenes de muestra y reactivos por la multijeringa, y por la estabilidad de la fuente de luz. Además, la técnica MSFIA sándwich da la mejor sensibilidad en comparación con otros métodos de inyección en flujo. Y, a pesar del necesario llenado periódico de las jeringas con disoluciones, la velocidad de análisis es comparable (o aún mejor) que la informada para otros sistemas de inyección en flujo. La velocidad de análisis es mejorada mediante la modalidad de inyección múltiple del método MSFIA propuesto en este estudio.

El volumen de inyección presentado en la Tabla 3.7 se refiere a una inyección simple sin considerar el volumen de muestra requerido para llenar el bucle de carga o para comenzar la adquisición de datos. De modo que es importante destacar que, mientras los métodos FIA y r-FIA usan un flujo continuo de muestra, las técnicas SIA y MSFIA sólo dispensan muestra cuando es necesario. La inyección de zonas bien definidas de muestra y reactivos mediante la activación de las válvulas solenoides, garantiza una mínima generación de desechos (3,6 veces menos que con los sistemas de inyección en flujo típicos) y, del mismo modo que en un procedimiento SIA, se consigue un ahorro de más de 10 veces en reactivos agresivos.

La configuración sencilla de ambas modalidades de inyección y el detector óptico utilizado son también características que merecen ser destacadas.

Tabla 3.7. Comparación de las características analíticas de diferentes técnicas de flujo con determinación espectrofotométrica de sulfuro, con formación de azul de metileno.

Método	Pendiente	R.S.D. (%)	Frecuencia inyección (h ⁻¹)	Rango lineal (mg l ⁻¹)	Límite Detección (mg l ⁻¹)	Portador HCl (mg/ inyección)	HCl en reactivos (mg/ inyección)	Volumen muestra inyectado (ml)	Desechos (ml h ⁻¹)	Ref.
FIA	0,005	---	210	1 – 45	<1	---	1110	0,065	435	[46]
FIA	---	2,10	30	0 – 2,88	0,001*	---	197	12,0	108	[42]
FIA-reverso	0,189	0,71	48	0,5 – 5	<0,5	---	666	2,63	---	[47]
SIA	0,136	4,00	60	0,05 – 2	0,04	535	48	0,15	213	[57]
SI -MSFA	0,132	5,20	38	0,17 – 1	0,04	254	34	0,12	129	[54]
MSFIA-sándwich	0,424	1,38	45	0,2 – 2	0,09	191	29	0,45	121	Este trabajo
MSFIA-inyección múltiple	0,167	1,44	80	0,5 – 5	0,15	69	29	0,20	115	Este trabajo

* Con pre-concentración.

3.4. Conclusiones

En el presente capítulo se han demostrado las posibilidades de la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa en combinación con esquemas de multiconmutación, y se han aplicado a la determinación de sulfuro en muestras ambientales y aguas residuales. Se ha desarrollado un sistema automatizado totalmente controlado por ordenador, robusto y fiable, características que han sido evaluadas mediante la aplicación del método de la adición de estándar y las mediciones de la reproducibilidad. Como consecuencia de la gran versatilidad tanto del sistema MSFIA como del programa utilizado, puede establecerse un método automatizado con alta sensibilidad y con una alta velocidad de análisis. Las recuperaciones obtenidas, dentro del rango 96 a 104 %, indican que no hay pérdidas significativas de sulfuro durante el análisis automático.

El sistema óptico miniaturizado basado en LED's permite la realización de esquemas de análisis en tiempo real. Además, el MSFIA proporciona ventajas adicionales respecto a otras técnicas de flujo, tales como la compactibilidad, gran versatilidad y bajo consumo de muestra y reactivos, lo que implica una mínima generación de residuos.

4

MÉTODO MSFIA DE SEPARACIÓN EN LÍNEA PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE SULFURO EN AGUAS RESIDUALES*

4.1. Introducción

En aguas residuales el sulfuro de hidrógeno puede ser originado tanto por la descomposición de materia orgánica, como por la reducción del sulfato debido a la acción bacteriana, siendo una especie importante para monitorizar debido a su toxicidad. Además, cabe considerar que el agua residual tratada puede tener dos destinos principales, como ocurre en Mallorca, y que altos niveles de sulfuro podrían afectar al medio receptor. Uno es la reutilización del agua para riego y, el otro, en caso de hallarse en exceso y superar los volúmenes a ser reutilizados, es el vertido del excedente al mar a través de un emisario submarino.

Los métodos clásicos para monitorear sulfuro en matrices complejas, tal como la del agua residual, son lentos y requieren procedimientos preliminares

* G. de Armas, L. Ferrer, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 524 (2004) 89. (Ver Anexo)

para el tratamiento de la muestra (por ejemplo, la floculación de los sólidos en suspensión) para garantizar resultados exactos [41].

Las técnicas de separación juegan un papel crucial en la aplicación de los métodos analíticos con el objeto de aumentar la sensibilidad y eliminar los compuestos interferentes. En el contexto de las técnicas basadas en la separación por membrana, la difusión gaseosa en combinación con sistemas de flujo puede verse como una metodología bien establecida para el análisis automático de compuestos volátiles [6,58]. Ésta se basa en el transporte por difusión del analito volátil, o un producto volátil de reacción, desde una corriente donante hacia una corriente aceptora conectada con el detector. Las dos corrientes se hallan físicamente separadas por una membrana hidrofóbica, cuya propiedad de repeler el agua, impide el intercambio de líquidos y de iones solvatados. Como consecuencia del aislamiento en línea de la especie de interés en el canal aceptor, la implementación del módulo de difusión gaseosa dentro de un sistema en flujo ha atraído el interés no sólo por ser un medio efectivo para mejorar la selectividad, sino también para pre-concentrar al analito [59]. La separación por difusión gaseosa en línea puede ser usada con todo su potencial en combinación con la nueva y versátil técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA), la cual ha sido diseñada para ser una poderosa herramienta para la manipulación automática de fluidos.

El objetivo de este trabajo es demostrar las potencialidades del análisis por inyección en flujo multijeringa acoplado a la difusión gaseosa (MSFIA-DG) para la determinación directa en matrices complejas (por ejemplo, el agua residual) sin ningún requerimiento manual adicional de tratamiento preliminar de la muestra. El método se basa en la liberación del analito como sulfuro de hidrógeno desde la muestra no tratada, hacia el interior del canal aceptor del módulo de difusión gaseosa, donde reacciona con N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) en presencia de Fe(III) – reacción de Fischer [40] – para formar azul de metileno. Se estudió tanto el efecto de las variables experimentales sobre la transferencia gaseosa a través de la membrana, como la preconcentración en el canal aceptor a través de flujo reverso iterativo. El rendimiento analítico de la metodología MSFIA-DG fue comparado con el obtenido por un sistema de

separación por diálisis en línea, usando membranas hidrofílicas semipermeables.

4.2. Parte experimental

4.2.1 Reactivos y disoluciones

Una disolución de trabajo 25 mM de DMPD fue preparada por debida dilución de la disolución madre con HCl 1,5 M.

Una disolución de trabajo 60 mM de Fe(III) fue preparada por dilución de la disolución madre con HCl 1,8 M.

El *carrier* o corriente portadora fue una disolución de HCl 1,65 M preparada por dilución a partir de ácido clorhídrico concentrado (Scharlau).

Los patrones de sulfuro (0,5–20 mg l⁻¹) fueron preparados por dilución de la disolución madre con NaOH 25 mM.

4.2.2 Sistema de flujo y detector óptico

El sistema de inyección en flujo multijeringa con el módulo de difusión gaseosa para la determinación espectrofotométrica de sulfuro se muestra en la Figura 4.1. La bureta multijeringa (Crison) fue equipada con cuatro jeringas S1–S4 (Hamilton, Suiza) de 5; 2,5; 2,5 y 5 ml, respectivamente. El sistema propuesto comprende tres válvulas solenoides adicionales (Takasago, Japón), V5–V7. La válvula V5 dirige la muestra aspirada desde el muestreador (Crison) a un bucle de carga, mientras que la válvula V7 se usó para desviar las disoluciones de limpieza del bucle de carga, de modo que no atraviesen la celda de difusión gaseosa, alargando su vida útil. La válvula V6 permite que los segmentos de muestra y reactivos sean impulsados por los canales aceptor y donante del módulo de difusión a través de los puntos de confluencia PC1 y PC2, respectivamente.

Los bucles y la tubería fueron de PTFE de 0,8 mm de diámetro interno. Los bucles de reacción BR2 y BR4 fueron necesarios para efectuar el flujo invertido. Todos los bucles de reacción fueron anudados, con las siguientes longitudes BR1: 50 cm; BR2: 310 cm; BR3: 25 cm; BR4: 310 cm.

Una membrana Durapore (Millipore, MA, USA) de PVDF (polifluoruro de vinilideno), con un tamaño de poro de 0,22 μm y 125 μm de espesor, fue usada durante todos los experimentos a menos que se indique lo contrario. La membrana hidrofóbica se coloca entre los dos bloques de la unidad de difusión gaseosa (ver Capítulo 2).

El detector óptico miniaturizado está formado por un espectrofotómetro CCD (*Coupled Charge Device*) conectado al ordenador a una tarjeta PC 2000 A/D (Ocean Optics, Dunedin, FL) insertada en una ranura del ordenador. Esta tarjeta está conectada a una celda de flujo de vidrio (10 mm de camino óptico y 36 μl de volumen) a través de una fibra óptica con un núcleo de 400 μm de diámetro. Como fuente de luz se utilizó un LED, diodo emisor de luz (diodo rojo, 15 mA de intensidad máxima, banda espectral entre 600 y 700 nm, Sciware, Palma de Mallorca, España) con una fuente de intensidad constante ajustable (Sciware). Las siguientes condiciones de trabajo se utilizaron para configurar la adquisición de datos con AutoAnalysis 5.0: λ 666 nm, 30 milisegundos de tiempo de integración, 2 lecturas para promediar, ventana de suavizado de 12 puntos y una frecuencia de lectura de 1 segundo.

- 1- Inicialmente las jeringas se llenan con las disoluciones de sus respectivos depósitos a un caudal de 5 ml min^{-1} (para S1) con las válvulas 1-Off 2-Off 3-Off 4-Off 5-Off 6-Off 7-Off.
- 2- La activación simultánea de las válvulas 1 y 5 asegura la carga del bucle de carga con 1 ml de muestra.
- 3- Se lleva a cabo el procedimiento de multiconmutación detallado en la Tabla 4.1. Este paso comprende la inyección simultánea de $75 \mu\text{l}$ DMPD y $75 \mu\text{l}$ de Fe(III), los cuales son conducidos al canal aceptor del módulo de difusión. Un volumen de $700 \mu\text{l}$ de muestra es mezclado con $700 \mu\text{l}$ de disolución ácida, y luego conducidos al canal donante del módulo de separación. En este paso, el sulfuro de hidrógeno formado es transferido desde la disolución donante, y atrapado en la disolución aceptora compuesta por los reactivos cromogénicos.
- 4- La zona enriquecida es luego conducida hacia el detector mediante S4 a $0,9 \text{ ml min}^{-1}$ (para S1) con las válvulas 1-Off 2-Off 3-Off 4-On 5-Off 6-On 7-Off. El espectrofotómetro comienza la adquisición de datos a 666 nm y 1 Hz para registrar la señal analítica causada por el azul de metileno generado.
- 5- Un volumen de $1,5 \text{ ml}$ de *carrier* ácido es finalmente dispensado a 5 ml min^{-1} con las válvulas 1-Off 2-Off 3-Off 4-On 5-Off 6-Off 7-Off con el objetivo de lavar el canal aceptor, dejando así el sistema listo para la próxima inyección.
- 6- La secuencia operativa se repite 3 veces desde el paso 2.

Tabla 4.1. Protocolo de multiconmutación para la separación de sulfuro en línea por difusión gaseosa (DG).

Paso	Válvulas solenoides							Muestra (μl)	Reactivos (μl)		Portador (μl)	Caudal total (ml min^{-1})
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7		Fe(III)	DMPD		
Inyección de reactivos	Off	On	On	Off	Off	Off	Off	--	75	75	--	0,92
Flujo de reactivos (canal aceptor del módulo DG)	Off	Off	Off	On	Off	On	Off	--	--	--	200	0,92
Inyección de muestra hasta PC2	On	Off	Off	Off	Off	Off	Off	150	--	--	--	0,92
Mezcla de muestra con disolución ácida	On	Off	Off	On	Off	Off	Off	700	--	--	700	1,84

PC2: punto confluencia #2.

4.3. Resultados y discusión

Se estudiaron las variables químicas y físicas que afectan al rendimiento de la técnica propuesta de separación en línea por membrana.

4.3.1 Composición química de las corrientes dadora y aceptora

Un requerimiento esencial para el apropiado funcionamiento del sistema MSFIA-DG, es la mezcla del segmento de muestra con una disolución ácida (por ejemplo, ácido clorhídrico diluido) antes de entrar al módulo de difusión, con el objetivo de transformar al analito en un compuesto volátil, en este caso sulfuro de hidrógeno, a través de un cambio de pH. La concentración de HCl se varió dentro del rango 0,5–3,0 M, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 4.2. Un incremento de la altura del pico se observó al incrementarse la concentración de ácido, alcanzando un máximo a una

concentración de HCl 1,5 M, concentración que se adoptó para las siguientes experiencias.

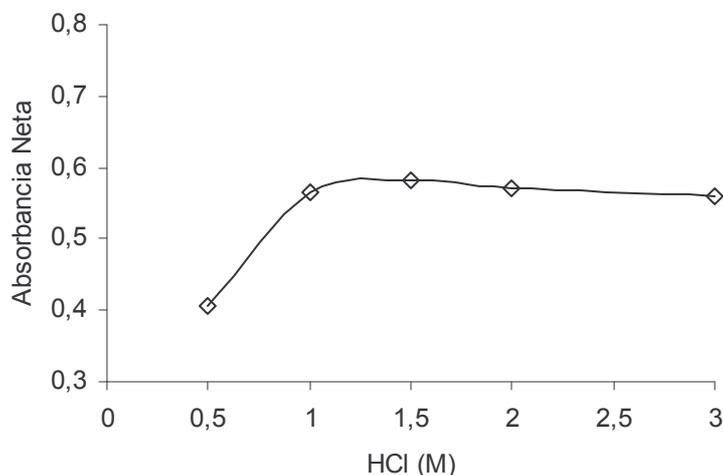


Figura 4.2. Efecto de la concentración de ácido para realizar el ajuste de pH en-línea de la muestra.

Las concentraciones de los reactivos cromogénicos (DMPD y Fe(III) en medio ácido) fueron investigadas en orden de garantizar las condiciones óptimas para el desarrollo del color del azul de metileno, luego de aislar el sulfuro de hidrógeno en la disolución aceptora. La influencia de la concentración de DMPD sobre la sensibilidad se evaluó dentro del rango 6,0 – 50 mM DMPD en un medio de HCl 1,5 M, manteniendo la concentración de Fe(III) en 60mM. Como puede verse en la Figura 4.3a, un incremento en la señal de 28% se logra por un aumento de la concentración de la amina de 6,0 a 25 mM, de modo que una concentración de DMPD 25mM fue finalmente seleccionada.

El efecto del agente oxidante (preparado en HCl 1,8 M) sobre la señal analítica fue estudiado dentro del rango 10–75 mM Fe(III), usando la concentración óptima de amina. Como se observa en la Figura 4.3b, la absorbancia permanece prácticamente constante por encima de Fe(III) 50 mM.

Se recomienda una concentración máxima de Fe(III) 60 mM para el sistema propuesto, con el objeto de evitar el deterioro de la señal analítica como consecuencia de una fuerte contribución del efecto Schlieren [48-52]. En este contexto, cabe mencionar que el punto débil de los procedimientos espectrofotométricos basados en LED's que involucran mediciones en fase líquida, es la incapacidad para compensar las interferencias Schlieren por detección multi-longitud de onda [48,49]. Por este motivo, la concentración de ácido de la corriente portadora (*carrier*) conducida a través del canal aceptor del módulo de difusión fue igualada a la de la zona que contiene el azul de metileno, es decir 1,65 M HCl. Como resultado, los cambios en el índice de refracción detectados por el espectrofotómetro en el borde de la señal analítica fueron insignificantes.

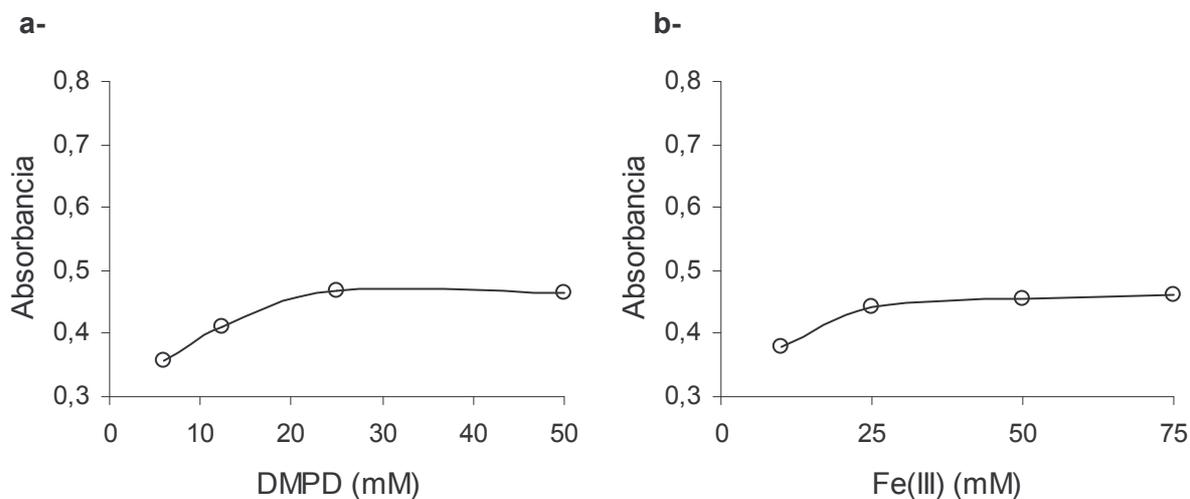


Figura 4.3. Influencia de la concentración de reactivos sobre la señal analítica, para una concentración de sulfuro de 10 mg l^{-1} . a- DMPD b- Fe(III).

4.3.2 Parámetros de flujo

Los parámetros hidrodinámicos, que pueden influir en los resultados analíticos, son los volúmenes de muestra y reactivos, los caudales y la longitud del bucle de reacción BR3, que conecta el canal aceptor con la celda de flujo. Una variable crítica a tener en cuenta para mejorar la sensibilidad de la metodología es la longitud del segmento de muestra liberado hacia el módulo de difusión. De acuerdo con la Figura 4.4a, se obtuvo un aumento en la altura de pico al incrementar el volumen del segmento de muestra desde 400 a 700 μl debido al enriquecimiento de los reactivos con el analito difundido a través de la membrana PVDF. La señal analítica permaneció constante por encima de los 700 μl , lo que fue atribuido a la dispersión del analito pre-concentrado a lo largo del volumen de aceptor. Con el objetivo de evitar un excesivo consumo de muestra sin disminuir el rango del método, se seleccionó un volumen de muestra de 700 μl .

La influencia del tamaño de los segmentos de reactivos inyectados dentro de la corriente aceptorera fue estudiada desde 75 a 300 μl para un segmento de muestra determinado (700 μl). Los resultados se muestran en la Figura 4.4b. Puesto que el analito es transferido a un volumen diminuto del canal aceptor sólo 75 μl de DMPD + 75 μl de reactivo oxidante fueron requeridos para obtener la sensibilidad máxima, consiguiendo un importante ahorro de reactivos en comparación con métodos convencionales de inyección en flujo con difusión gaseosa.

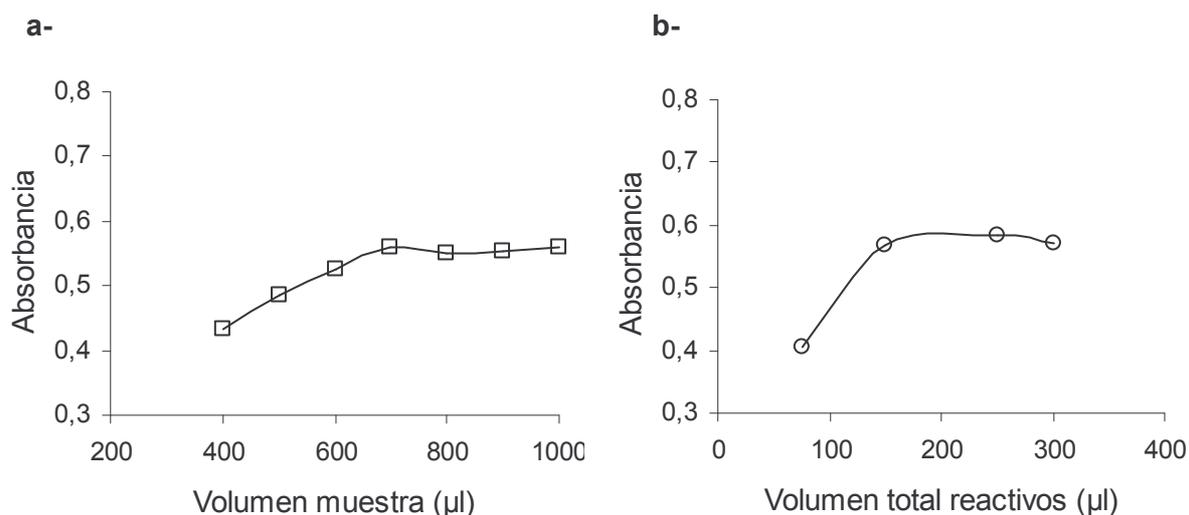


Figura 4.4. Efecto de los volúmenes de muestra y reactivos sobre la señal de absorbancia. a- Volumen de muestra. b- Volumen total de reactivos (iguales cantidades de DMPD y Fe(III)). Condiciones experimentales: concentración de sulfuro 10 mg l^{-1} , DMPD 25 mM y Fe(III) 60 mM .

Cabe destacar que la operación discontinua de la técnica MSFIA se ajusta muy bien a los procedimientos de difusión gaseosa que dependen de estrategias de flujo detenido, como se ha comprobado en el presente trabajo para aumentar la concentración de sulfuro de hidrógeno en la corriente aceptora detenida. El efecto del caudal de la corriente dadora sobre la eficiencia de transferencia de masa, fue evaluado desde $0,9 \text{ ml min}^{-1}$ (es decir, el mínimo caudal permitido con el conjunto de jeringas usadas en el sistema MSFIA) a $2,5 \text{ ml min}^{-1}$. De acuerdo con los requerimientos cinéticos de los procesos dinámicos de difusión gaseosa, el caudal de la corriente dadora más bajo, es decir, el tiempo de exposición del analito más grande, provee la mayor eficiencia de transferencia. Una disminución de las señales de absorbancia, de por lo menos 3 veces, como puede verse en la Figura 4.5, se observó para el máximo caudal ensayado. Por lo tanto, un caudal de $0,9 \text{ ml min}^{-1}$ fue seleccionado para la corriente dadora.

La influencia de la longitud del bucle de reacción BR3 sobre las reacciones de derivatización que ocurren previas a la detección, fue estudiada dentro del rango 25–50 cm. Como consecuencia de la rápida cinética de las reacciones involucradas y el flujo detenido del segmento de reactivos en el canal aceptor durante el paso de la muestra a través de la membrana, un bucle de reacción de 25 cm da un tiempo de residencia suficiente para el desarrollo de las reacciones formadoras del color.

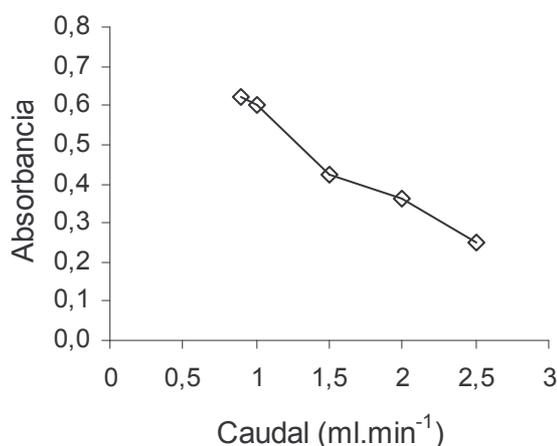


Figura 4.5. Influencia del caudal de la corriente donante sobre la señal analítica de 10 mg l⁻¹ de sulfuro.

4.3.3 Características analíticas del método MSFIA-DG

Las características analíticas del sistema MSFIA-DG optimizado, el cual involucra el aislamiento del analito en una disolución aceptorá detenida, se hallan resumidas en la Tabla 4.2. El rango lineal de trabajo se halla comprendido dentro de un orden de magnitud, lo cual es usual en sistemas de flujo con detección espectrofotométrica para la determinación de sulfuro [47,54]. La sensibilidad del método propuesto fue calculada como la media de las pendientes obtenidas de 10 curvas de calibración independientes

(realizadas en distintos días) [56,56]. El coeficiente de variación (RSD) de las pendientes de las curvas de calibración (n=10) fue menor del 5%.

El límite de detección se calculó como tres veces la desviación estándar del pico de absorbancia del blanco (n=10) sobre la pendiente de la curva de calibración [55,56]. La repetitividad fue evaluada sobre 10 mediciones consecutivas de una disolución estándar de 10 mg l⁻¹. La reproducibilidad del método automático se calculó como el coeficiente de variación de la determinación de un mismo patrón con diferentes membranas.

La capacidad de procesamiento se calculó de acuerdo a dos criterios, la frecuencia de inyección y la frecuencia de muestreo, incluyendo en esta última el tiempo consumido para enjuagar el tubo de muestreo entre muestras consecutivas.

La eficiencia de la transferencia de masa durante el procedimiento de difusión gaseosa, calculada como el cociente entre la concentración de sulfuro a la salida de la corriente aceptora y la concentración inicial de la muestra, fue del 10 % (estimada para tres concentraciones de sulfuro).

Tabla 4.2. Características analíticas del sistema MSFIA-DG para la determinación de sulfuro, usando un flujo hacia delante.

Parámetro Analítico	Valor
Límite de Detección (mg l ⁻¹)	0,03
Límite de cuantificación (mg l ⁻¹)	0,34
Sensibilidad (l mg ⁻¹)	0,043 ± 0,002
Coeficiente correlación (r) (n=6)	0,9994 ± 0,0009
Rango lineal (mg l ⁻¹)	0,5-20
Repetitividad (%) (10 mg l ⁻¹) (n=10)	0,72
Reproducibilidad (%) (20 mg l ⁻¹) (n=5)	1,76
Frecuencia de inyección / h ⁻¹	13
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹ *	4

*La frecuencia de muestreo está calculada considerando tres réplicas por muestra y el enjuague del tubo de aspiración de muestra.

Una de las principales ventajas de la técnica MSFIA es su inherente capacidad para manipular las disoluciones como se ha demostrado mediante la aplicación del flujo detenido en el canal aceptor para mejorar el rendimiento de la transferencia. La sensibilidad de la metodología puede ser mejorada por medio de la realización de un método de inversión de flujo del segmento de muestra, basado en un movimiento consecutivo hacia delante y atrás de la zona de muestra en el canal dador del módulo de difusión gaseosa. El efecto del número de inversiones de flujo, los cuales determinan el tiempo efectivo para liberar el analito, fue determinado usando un flujo detenido de los reactivos en el canal aceptor. Como puede verse en la Figura 4.6, una mejora en la sensibilidad del orden de 4 veces se alcanzó realizando una inversión de flujo (adelante-atrás-adelante) en vez de un simple desplazamiento hacia delante, debido al mayor tiempo de exposición del analito, y a la renovación de la capa de difusión. Sin embargo, cabe destacar que un gran número de inversiones de flujo influye negativamente sobre la frecuencia de muestreo. De este modo, la realización de cuatro cambios direccionales consecutivos (es decir, dos dobles inversiones de flujo) conduce a un aumento de sensibilidad de 5,4 veces respecto a un simple desplazamiento hacia delante, con el concomitante deterioro de la frecuencia de inyección a 5 h^{-1} . El rango lineal de trabajo fue similar tanto para uno como para dos inversiones de flujo, 0,25 - 5,0 y 0,25 - 4,0 mg l^{-1} de sulfuro, respectivamente. El límite de determinación no mejoró por el uso de dos inversiones de flujo debido a la dispersión de la muestra dentro de la disolución portadora.

Otro parámetro crítico a considerar para la propia preconcentración del analito en el segmento aceptor detenido, es la longitud del desplazamiento adelante-atrás a lo largo del canal dador. Los resultados experimentales, Figura 4.7, revelaron que, para una inversión de flujo, el volumen óptimo de desplazamiento para asegurar la máxima exposición de sulfuro de hidrógeno en la superficie de separación, fue de 2 ml. Desplazamientos más grandes pueden causar una marcada caída en la sensibilidad, como consecuencia de una excesiva dilución del segmento de muestra por interdispersión dentro de la corriente portadora.

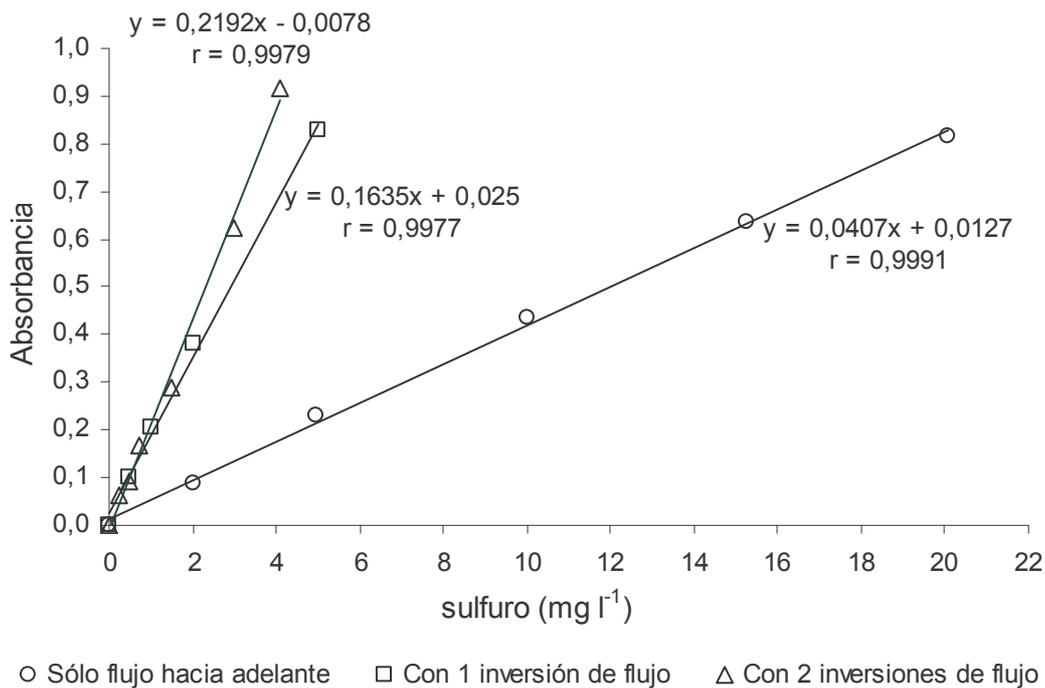


Figura 4.6. Dependencia de la sensibilidad del sistema MSFIA-DG sobre el número de inversiones de flujo en la corriente dadora. Volumen de muestra: 700 μ l. Volumen total de reactivos: 150 μ l.

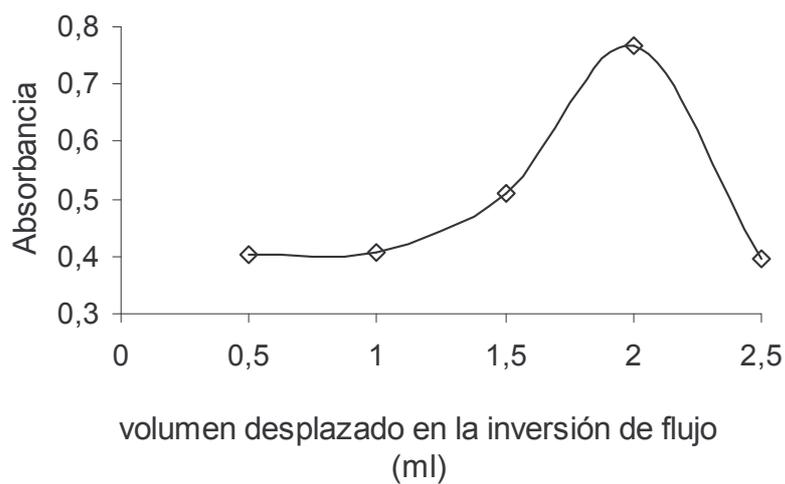


Figura 4.7. Efecto del volumen del segmento desplazado en la inversión de flujo del canal dador sobre la señal analítica.

4.3.4 Comparación de los sistemas MSFIA-DG y MSFIA-diálisis

El procedimiento de separación en línea con membrana de difusión gaseosa, fue también aplicado usando una membrana de diálisis de celulosa regenerada hidrofílica semi-permeable con un paso de 15-25 kDa de masa molecular y un espesor de 15 μm . Algunas variables hidrodinámicas, tales como el volumen, el caudal de la corriente dadora y el número de flujos reversos, fueron evaluadas dentro del mismo intervalo ensayado para la separación por difusión gaseosa, usando también un flujo detenido en la corriente aceptora. La influencia de la composición de la muestra sobre el rendimiento de la diálisis fue también investigada. De acuerdo con observaciones previas [60,61], la presencia de compuestos en la matriz de la muestra pueden alterar la eficiencia de la diálisis de la especie de interés. Sin embargo, la inyección de la misma disolución estándar de sulfuro preparada en varios medios (agua destilada y varias concentraciones de cloruro de potasio que variaron entre 0,01 y 0,3 M), no presentó variaciones en la señal analítica. Estos resultados son atribuidos a la naturaleza sin carga del analito en la corriente dadora bajo las condiciones experimentales de la difusión gaseosa, de modo que se hizo innecesario el uso de un modificador de la fuerza iónica, el cual es requerido en los procedimientos de flujo continuo o de inyección en flujo que involucran la diálisis de especies iónicas para prevenir las interferencias de matriz [61]. La eficiencia de transferencia obtenida con MSFIA-diálisis fue, en todos los casos, inferior a la mitad de la que se obtuvo por MSFIA-DG, lo cual concuerda con datos experimentales citados en la literatura [53]. Por ello se descartó el uso de las membranas de diálisis.

4.3.5 Aplicación analítica

Una de las ventajas más destacadas del método propuesto con la separación en línea por difusión gaseosa es la posibilidad de analizar muestras complejas, aunque contengan material particulado en suspensión, sin requerir ningún tratamiento manual previo, tal como floculación o filtración. Por lo tanto, el procedimiento MSFIA-DG simplifica en gran medida los métodos

convencionales de determinación de sulfuros en matrices complejas que son muy lentos.

La robustez, precisión y exactitud del método fueron investigadas determinando el contenido de sulfuro en aguas residuales urbanas (EDAR-1, Palma de Mallorca). Los resultados obtenidos, resumidos en la Tabla 4.3, fueron comparados con los obtenidos con el método manual estándar propuesto por APHA–Métodos Normalizados [41], el cual requiere la eliminación previa de los sólidos en suspensión mediante floculación química. Considerando las desviaciones estándar estimadas del procedimiento MSFIA-DG ($s=0,6$) y aquellas estimadas del método oficial estándar ($s=2$), se observa que el método propuesto con inyección directa de la muestra es más preciso que el método manual de referencia, sin embargo, a pesar de las diferencias entre las desviaciones estándar de ambos métodos la prueba t no mostró diferencias significativas al 95% de confianza. Los resultados experimentales obtenidos por MSFIA-DG mediante análisis directo de la muestra o después de la floculación fueron también estadísticamente comparables con un nivel de significación del 0,05, lo cual denota la utilidad del sistema automatizado para manipular las muestras conteniendo niveles altos de materia orgánica suspendida.

Con respecto a las muestras de agua residual, cabe señalar que las sales de Fe(III) son comúnmente adicionadas al agua residual de la planta depuradora durante su tratamiento para flocular los sólidos en suspensión. De aquí que, el contenido de sulfuro en las muestras 3 y 4, pertenecientes a la salida del clarificador y a la salida (de la planta depuradora), estuviera por debajo del límite de cuantificación del método MSFIA-DG propuesto. En orden de determinar la existencia de interferencias debidas a la matriz, fue necesaria la adición de EDTA como agente complejante de las especies oxidantes. Los resultados del ensayo de recuperación de las muestras analizadas se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Determinación de sulfuro en aguas residuales mediante el procedimiento MSFIA-DG y el método de referencia de APHA.

Muestra	MSFIA-DG			Método estándar (APHA)		
	Adición (mg l ⁻¹)	Encontrado (mg l ⁻¹)	Recuperación (%)	Adición (mg l ⁻¹)	Encontrado (mg l ⁻¹)	Recuperación (%)
1- Entrada ^a	0	20,2 ± 0,5	---	0	**	---
1- Entrada (floculada)	0	19,1 ± 0,6	---	0	19 ± 2	---
	5	24,4 ± 0,4	101	5	22 ± 2	92
2- Entrada clarificador ^a	0	16,1 ± 0,2	---	0	**	---
3- Salida clarificador (floculada)	0	< 0,34*	---	0	< 1,07*	---
	10	10,4 ± 0,3	104	1	1,38 ± 0,06	104
4- Salida (floculada)	0	< 0,34*	---	0	< 1,07*	---
	10	11,34 ± 0,12	113	1	1,35 ± 0,03	105

Los resultados están expresados como la media de tres réplicas ± la desviación estándar.

^a Sin tratamiento previo.

* Límite de cuantificación.

** El método de referencia no se puede aplicar a muestras no floculadas.

4.4. Conclusiones

Un sistema basado en el análisis por inyección en flujo multijeringa acoplado con un procedimiento de separación en línea por membrana, se propone para la determinación espectrofotométrica de sulfuro en muestras complejas, tales como las aguas residuales, las cuales contienen sólidos en suspensión, sin ningún tratamiento previo.

En comparación con otros métodos de análisis en flujo, se alcanzan similares sensibilidades, ya que la pérdida de sensibilidad que genera la difusión gaseosa es compensada por la inversión de flujo del MSFIA-DG, que hace posible un aumento mayor de 5 veces, con respecto al método sin inversiones de flujo. Además, con el método propuesto se logra una alta selectividad debida al uso de la membrana de difusión gaseosa.

El uso de un espectrofotómetro miniaturizado con fibra óptica equipado con un diodo emisor de luz (LED) garantiza la aplicabilidad del sistema automatizado para realizar análisis de campo y en tiempo real. Además, el MSFIA proporciona ventajas adicionales, que otras técnicas de flujo no pueden ofrecer, tales como compactibilidad, versatilidad y bajos consumos de muestra y reactivos, lo cual conduce a una mínima generación de desechos. La implementación de un módulo de difusión gaseosa en el sistema de análisis en flujo, asegura un mejoramiento tanto de la selectividad como de la sensibilidad mediante el aislamiento del analito y la realización de inversiones de flujo iterativas y procedimientos de flujo detenido, respectivamente. De este modo, la sensibilidad del método MSFIA-DG puede ser fácilmente adaptada a los requerimientos del análisis, lo cual es un punto sumamente importante para las muestras de agua residual teniendo en cuenta la gran variación del contenido de sulfuro en los varios pasos de una planta depuradora y la modificación del tiempo residencia del agua dependiendo de la estación del año.

Finalmente, es importante destacar que la facilidad de operación y un remarcable ahorro tiempo, son logrados en comparación con otros métodos analíticos manuales y basados en flujo. Una parte significativa del tiempo ahorrado se debe a la viabilidad de realizar análisis directos de agua residual sin tratamiento previo de la muestra. Además, dado que no es necesaria la manipulación de la muestra, se evita la contaminación de la misma o la pérdida del analito.

5

SENSOR DE FIBRA ÓPTICA EN FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN AUTOMÁTICA DE SULFURO EN AGUAS MEDIANTE MSFIA USANDO REFLECTOMETRÍA DE FASE SÓLIDA*

5.1. Introducción

Con el objetivo de determinar niveles traza de sulfuro, del orden de los $\mu\text{g l}^{-1}$, tanto en muestras ambientales como en aguas residuales tratadas, se desarrolló un sistema MSFIA, al cual se le acopló un procedimiento de pre-concentración en línea. Si bien el sulfuro es en la actualidad controlado como un parámetro de interés para determinar la calidad ambiental de un sistema dado, las metodologías espectrofotométricas clásicas manuales [41] presentan varios inconvenientes. Entre ellos, caben destacarse una excesiva manipulación de la muestra, poca sensibilidad, y un elevado consumo de muestra y reactivos, por lo que se requieren nuevos métodos capaces de monitorear concentraciones traza de sulfuro de un modo automatizado.

* L. Ferrer, G. de Armas, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, *Analyst* 130 (2005) 644.

(Ver Anexo)

La extracción en fase sólida ha demostrado ser una técnica adecuada en el pre-tratamiento de muestra para eliminar la matriz y pre-concentrar el analito [62]. Sin embargo, el concepto tradicional de extracción en adsorbentes, con posterior elución de las especies retenidas para realizar la detección óptica sobre la fase eluida, sufre una pérdida parcial de las capacidades de pre-concentración alcanzadas durante el paso de adsorción. En este sentido, el principio del optosensor sobre superficies sólidas alcanza un mayor rendimiento en la pre-concentración. El optrodo involucra la medición directa de la atenuación de la luz de la superficie reactiva a continuación de la pre-concentración del analito adecuadamente derivatizado [63,64]. En el campo de los sensores ópticos, la miniaturización se alcanza a través del acoplamiento de fibras ópticas a las microzonas. Los sensores químicos de fibra óptica han atraído un interés creciente desde que combinan las ventajas de las fibras ópticas con la selectividad y especificidad de los sistemas químicos. Estos sensores presentan algunas características a destacar, como su flexibilidad, fácil miniaturización, bajos costos y una construcción robusta [65]. Además, son electrónicamente pasivos, resistentes a la corrosión y capaces de realizar un monitoreo en tiempo real. Aunque estos sensores son comúnmente utilizados en procedimientos manuales, todas sus ventajas pueden ser aprovechadas en su implementación en sistemas de análisis en flujo automatizados [7], y en este caso en particular con un sistema basado en MSFIA.

En este capítulo se presenta el desarrollo y la optimización de una metodología analítica basada en un sistema MSFIA con pre-concentración en fase sólida que utiliza un optosensor de reflectancia difusa sobre disco de membrana para la determinación de trazas de sulfuro en muestras ambientales de agua y agua residual procesada. Una celda de flujo fabricada en el laboratorio ha sido satisfactoriamente utilizada para mejorar la sensibilidad del método basado en la reacción de Fischer [40], en el cual los iones sulfuro son transformados químicamente en azul de metileno. Varias membranas de adsorción con diferentes grupos funcionales han sido críticamente comparadas respecto a las características de adsorción del azul de metileno.

La interconexión del optrodo basado en la extracción sobre membrana con un espectrofotómetro CCD miniaturizado con conexión USB y un diodo

emisor de luz (LED) permite obtener un analizador en flujo compacto, portátil y fácilmente adaptable a las mediciones en campo.

5.2. Parte experimental

5.2.1 Reactivos y membranas

Una disolución de trabajo 3 mM de DMPD fue preparada por debida dilución de la disolución madre con HCl 0,5 M.

Una disolución de trabajo 3 mM de Fe(III) fue preparada por dilución de la disolución madre con HCl 0,5 M.

El *carrier* o corriente portadora fue una disolución de HCl 0,14 M preparada por dilución a partir de ácido clorhídrico concentrado (Scharlau).

Dos disoluciones fueron utilizadas como eluyentes, metanol 80% (v/v) - HCl 0,01 M y metanol 80% (v/v), que también permitieron un apropiado acondicionamiento de la membrana. Previamente a su uso, estas disoluciones fueron desgasificadas en un baño de ultrasonidos.

Las disoluciones estándar de sulfuro ($20\text{--}200\ \mu\text{g l}^{-1}$) fueron preparadas por dilución de la disolución madre con NaOH 25 mM.

Los discos de membrana Empore® de 3M (St. Paul, MN, USA), de grupos octadecilos (C_{18}) unidos a sílica gel, de co-polímero poli-estirendivinilbenceno (SDB-XC) y de intercambio catiónico, de 0,5 mm de espesor fueron cortados en pequeños discos con un diámetro de 9 mm para ser investigados en la celda de flujo optródica construida en el laboratorio.

5.2.2 Sistema de flujo y detector óptico

El sistema en flujo por inyección multijeringa ideado para la determinación de sulfuro mediante un optosensor con extracción en disco, se muestra en la Figura 5.1. Dos módulos multijeringa (Crison, Barcelona, España) fueron usados para la manipulación automática de líquidos. Uno de ellos fue equipado con cuatro jeringas (Hamilton, Suiza) S1-S4 de 1, 1, 5 y 5 ml, mientras que el otro módulo de multijeringa fue equipado con dos jeringas S5 y S6, ambas de 10 ml. El sistema también incluyó dos válvulas solenoides adicionales, V7 y V8 (Takasago, Japón), las cuales permitieron el desarrollo completo del protocolo analítico. La válvula V7 dirigió la muestra aspirada desde el muestreador (Crison) a un conector de PMMA de cinco vías fabricado en el laboratorio (ver Figura 5.1 para más detalles), mientras que la válvula V8 dispensó los segmentos de muestra y reactivos a través del disco de extracción sólo en el momento de la pre-concentración. Además, V8 permitió realizar las operaciones de inicialización del sistema y el lavado de las líneas de flujo sin dispensar disoluciones a través de la membrana. La longitud del bucle de carga y del reactor anudado fue de 6 m y 180 cm, respectivamente.

El detector óptico miniaturizado estuvo formado por un espectrofotómetro CCD USB 2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL) y un diodo emisor de luz láser (diodo rojo, 75 mA de intensidad máxima, banda espectral de 620-700 nm, Sciware, Palma de Mallorca, España) con una fuente de suministro de energía de intensidad ajustable (Sciware). La fuente de luz fue conectada a la celda de flujo optródica construida para tal fin (ver Figura 2.6 para más detalles) mediante uno de los brazos de la fibra óptica bifurcada (Ocean Optics) de 400 μm de diámetro. La radiación reflejada fue devuelta al detector a través del otro brazo de la fibra óptica (400 μm de diámetro). La longitud de onda seleccionada para determinar el azul de metileno fue de 666 nm. El control instrumental, la adquisición y el procesamiento de los datos fueron realizados con el programa AutoAnalysis 5.0.

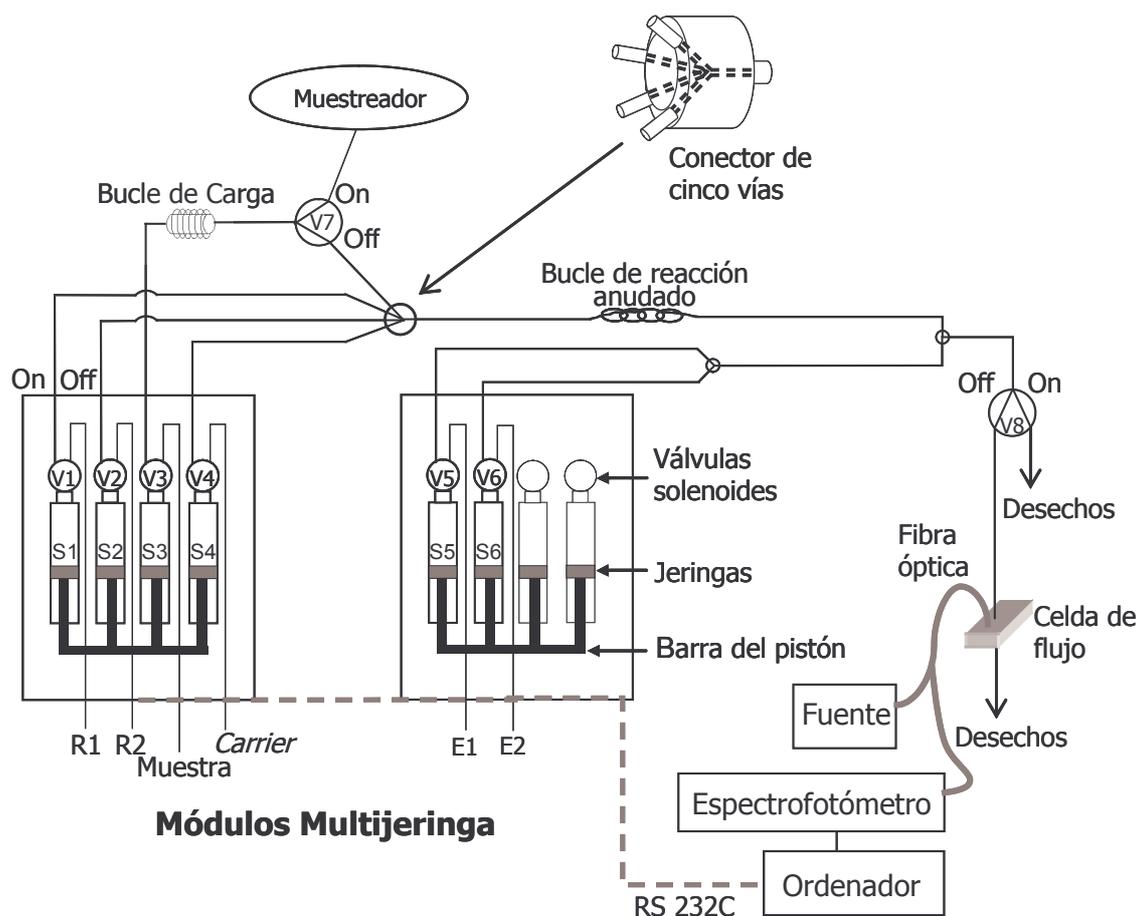


Figura 5.1. Representación esquemática del sistema MSFIA – optrodo diseñado para la determinación de sulfuro. R1: Fe(III) 3 mM; R2: DMPD 3 mM; E1: metanol 80% (v/v); E2: metanol 80% (v/v) – HCl 0,01 M.

5.2.2 Protocolo para la determinación automática de sulfuro mediante un sistema MSFIA provisto de optosensor

El protocolo automatizado para la determinación de sulfuro mediante el sistema MSFIA provisto de optrodo, utilizando un modo de mezcla simultáneo puede resumirse de la siguiente manera:

- 1- Inicialmente las jeringas se llenan con las disoluciones de sus respectivos depósitos a un caudal de 1 ml min^{-1} (para S1) con las válvulas de las jeringas 1-Off 2-Off 3-Off 4-Off 5-Off 6-Off y las válvulas adicionales 7-Off 8-Off.
- 2- La activación simultánea de las válvulas 3 y 7 (1-Off 2-Off 3-On 4-Off 5-Off 6-Off 7-On 8-Off) permite la carga del bucle de carga con 3 ml de muestra.
- 3- El espectrofotómetro comienza la adquisición de datos a 666nm y 1 Hz para registrar la señal analítica.
- 4- Seguidamente, S1 y S2 dispensan 0,58 ml ($0,18 \text{ ml min}^{-1}$) cada una, mientras que S3 dispensa 2,9 ml ($0,92 \text{ ml min}^{-1}$) con las válvulas 1-On 2-On 3-On 4-Off 5-Off 6-Off 7-Off 8-Off. En este paso, los segmentos de muestra y reactivos se mezclan simultáneamente dentro del bucle de reacción durante un único desplazamiento de la barra del pistón.
- 5- Con el objeto de registrar la señal analítica, un volumen de 1 ml de *carrier* ácido es dispensado a $0,92 \text{ ml min}^{-1}$ con las válvulas 1-Off 2-Off 3-Off 4-On 5-Off 6-Off 7-Off 8-Off. De este modo, los diferentes segmentos son mezclados en la corriente de flujo, teniendo lugar la reacción de Fischer antes de entrar a la celda del optosensor.
- 6- El azul de metileno formado en-línea es pre-concentrado sobre el disco de extracción C_{18} , alcanzando un valor mínimo de reflectancia difusa (máximo de absorbancia aparente – meseta) cuando el segmento entero de muestra y reactivos haya fluido a través de la membrana.
- 7- Luego de registrarse el máximo de absorbancia aparente, las disoluciones de elución (0,5 ml de metanol 80% (v/v) – HCl 0,01 M y 0,5 ml de metanol 80% v/v) fueron secuencialmente inyectadas para la desorción del producto de reacción y el acondicionamiento del disco de extracción antes de comenzar un nuevo ciclo analítico. La diferencia entre la línea de base y la meseta es tomada como la señal analítica (Figura 5.2).
- 8- La secuencia operativa se repite 3 veces desde el paso 2.

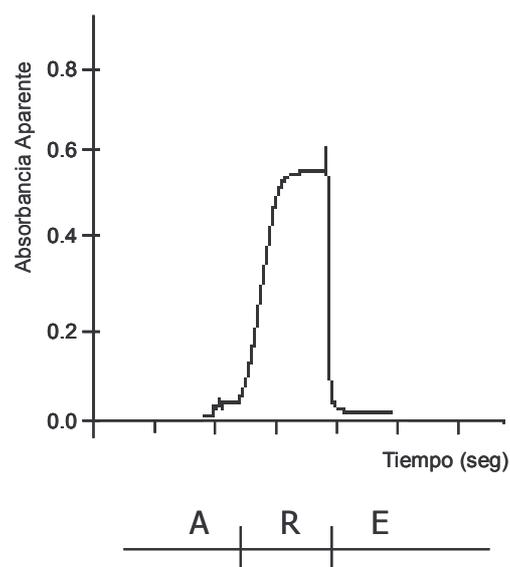


Figura 5.2. Señal analítica para $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de sulfuro, mostrando los diferentes pasos analíticos involucrados en la determinación mediante la metodología MSFIA – optrodo. A: acondicionamiento de la membrana; R: retención y pre-concentración del azul de metileno; E: elución del azul de metileno.

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1 Selección de la membrana

Los materiales sobre los cuales se realizó la pre-concentración en el sistema optródico fueron membranas de extracción disponibles comercialmente con partículas adsorbentes de 8-10 μm . Dado que el sílica gel químicamente modificado o los gránulos poliméricos están fuertemente unidos dentro de un soporte inerte de PTFE, el grado de expansión y contracción debido a cambios de disolventes o de polaridad de las disoluciones es insignificante. A su vez, también quedan garantizados una buena estabilidad mecánica, un empaquetamiento uniforme y un material químicamente inerte [64]. Así, discos de membrana de octadecilos unidos a sílica gel (C_{18}), de co-polímero poli-

estirendivinilbenceno (SDB-XC) y de intercambio catiónico-SR, de Empore® 3M fueron evaluados como superficies de adsorción. De acuerdo con los resultados experimentales compilados en la Tabla 5.1, puede notarse que la señal del blanco fue baja y comparable para las membranas C₁₈ y polimérica, mientras que fue extremadamente alta para la de intercambio catiónico. Esto es debido a las interacciones electrostáticas entre los grupos sulfonatos de la membrana y la amina oxidada, la cual está cargada positivamente. Si bien las sensibilidades obtenidas usando discos C₁₈ o poliméricos no fueron significativamente diferentes, las membranas con grupos octadecilos fueron seleccionadas como superficie optródica dado que su acondicionamiento / regeneración fue más fácil de llevar a cabo. El mismo fue fácilmente realizado en-línea empleando metanol, mientras que los discos poliméricos, siguiendo las recomendaciones del fabricante, requirieron el uso consecutivo de acetona, 2-propanol y metanol como disolventes. Además, los valores de repetitividad para los ensayos optródicos con membrana C₁₈ fueron mejores que aquellos obtenidos con discos poliméricos.

Tabla 5.1. Comparación entre diferentes materiales implementados en el sistema optródico de extracción en fase sólida. Sulfuro: 100 µg l⁻¹. Los resultados se expresan como la media de tres réplicas ± la desviación estándar.

	Tipo de membrana		
	C ₁₈	Polimérica	Intercambio Catiónico
Señal de blanco	0,0545 ± 0,0002	0,057 ± 0,002	0,282 ± 0,002
Absorbancia Aparente	0,3405 ± 0,0004	0,363 ± 0,005	0,353 ± 0,004
Absorbancia Aparente Neta	0,2860 ± 0,0002	0,306 ± 0,003	0,071 ± 0,003

5.3.2 Investigación de las variables químicas

Las condiciones óptimas para el desarrollo del azul de metileno fueron estudiadas. En primer lugar, se examinó el efecto de la concentración de DMPD sobre la señal analítica dentro del rango 1 a 7 mM en medio ácido (HCl 1,5 M), manteniendo la concentración de Fe(III) constante en 3 mM. Los resultados experimentales se muestran en la Figura 5.3. La máxima absorbancia aparente neta fue registrada a una concentración de 3 mM, mientras que concentraciones más altas mostraron un incremento de la señal del blanco debido a la concomitante adsorción de la amina sobre la superficie reactiva, lo cual deteriora el funcionamiento del optrodo. El efecto del reactivo oxidante (preparado en HCl 1,8 M) sobre la formación del azul de metileno fue estudiado en el rango 1 a 5 mM, fijando la concentración de DMPD en 3 mM. El perfil de la optimización fue similar al del reactivo DMPD, como puede verse en la Figura 5.3. El marcado decrecimiento en la sensibilidad a las altas concentraciones ensayadas fue atribuido a la modificación de la transparencia óptica de la membrana por el color del reactivo, obteniéndose pobres relaciones señal – ruido. La señal analítica máxima se obtuvo a 3 mM de Fe(III), de modo que una estequiometría Fe: DMPD fue seleccionada para futuros estudios, la cual concuerda con previas observaciones (Capítulo 3).

Se investigó también la dependencia de la acidez de las disoluciones sobre la reacción de Fischer. Los experimentos se llevaron a cabo dentro del intervalo 0,01 – 2 M de HCl para ambos reactivos. Como puede observarse en la Figura 5.4, la máxima absorbancia aparente neta fue registrada en un medio de HCl 0,5 M para ambos reactivos. De modo que la composición final de los agentes cromogénicos fue fijada en 3 mM de DMPD en HCl 0,5 M y 3 mM de Fe(III) en HCl 0,5 M para el resto del trabajo. Cabe destacar que la concentración de ácido clorhídrico usada en el presente trabajo es mucho menor que aquella empleada en trabajos previos de flujo o métodos manuales, en los cuales la acidez del medio estuvo comprendida entre 1 a 6 M [42,47,66]. Se recomienda que el *carrier* sea de HCl 0,14 M, para igualar la concentración de ácido del segmento de azul de metileno formado, y de este modo no alterar el pH en la fase de retención.

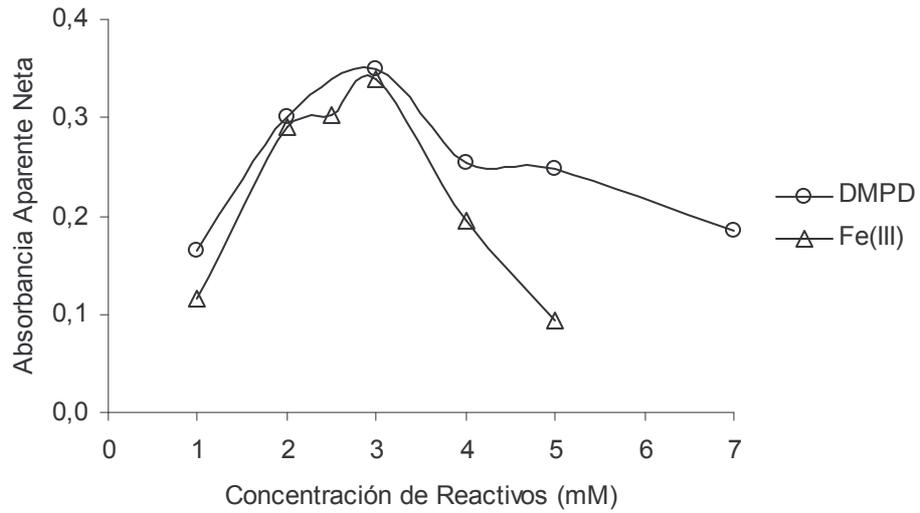


Figura 5.3. Influencia de la concentración de reactivos sobre la señal analítica.
Sulfuro: $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

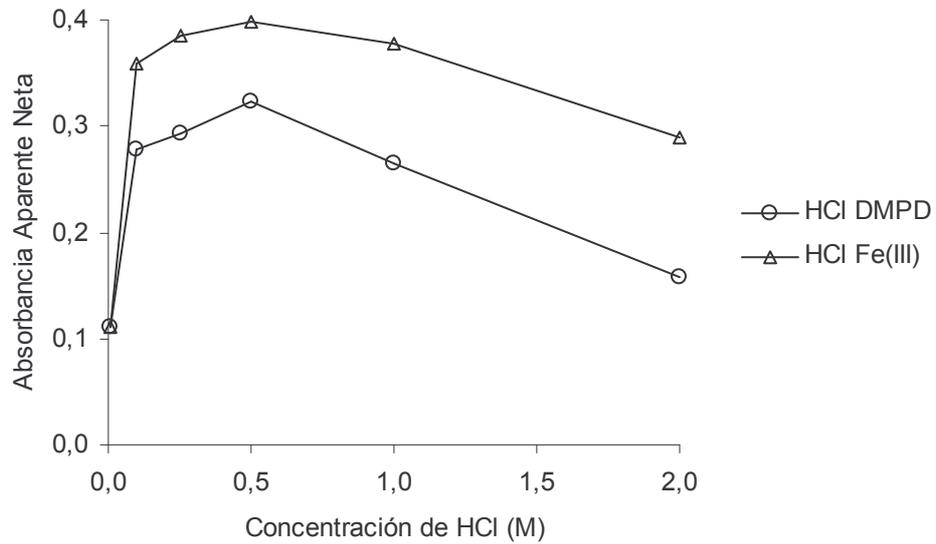


Figura 5.4. Efecto de la acidez de los reactivos cromogénicos sobre la señal analítica.
Sulfuro: $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

5.3.3 Investigación de los parámetros de flujo

Bajo las condiciones químicas optimizadas previamente, se determinó el efecto de los parámetros de inyección en flujo sobre el funcionamiento de la metodología MSFIA-optrodo, tales como los volúmenes de muestra y de reactivos y los caudales, utilizando una concentración de sulfuro de $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

Un parámetro crítico a considerar en el diseño propuesto es la longitud del segmento de muestra a pre-concentrar. Volúmenes de muestra mayores a 3 ml no causaron diferencias significativas en la sensibilidad (Figura 5.5). Esto ocurre como resultado de la retención de especies coloreadas por debajo del espesor de la membrana sondaada por el haz de luz. Con el objeto de evitar un excesivo consumo de muestra sin empeorar el rango de trabajo lineal o el límite de detección, un volumen de muestra de 2,9 ml fue seleccionado para el procedimiento opródico basado en la extracción en fase sólida. El bucle de carga se llena con un exceso de volumen de muestra (0,1 ml) con el objeto de minimizar la dispersión del segmento de analito que es conducido al módulo de pre-concentración.

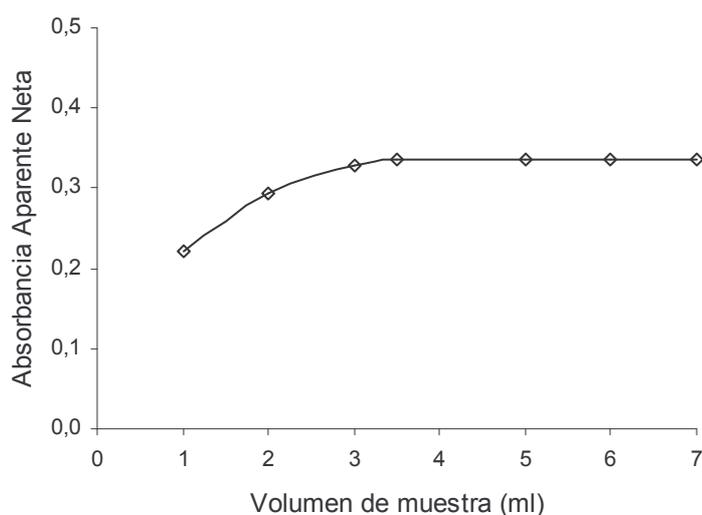


Figura 5.5. Efecto del volumen de muestra en la señal analítica. Sulfuro: $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

Se optimizaron dos caudales, el caudal de mezcla de muestra y reactivos y el de retención en la membrana. La influencia del caudal total de la generación en-línea de azul de metileno y de la pre-concentración sobre la membrana del optrodo fue estudiado dentro del rango $1,29 - 3,05 \text{ ml min}^{-1}$. El caudal óptimo para la máxima señal fue de $1,29 \text{ ml min}^{-1}$ (es decir, la velocidad mínima permitida con el conjunto de jeringas utilizado en este sistema MSFIA). El efecto del caudal en la retención sobre la membrana de disco fue investigado sobre el rango $0,92 - 2,50 \text{ ml min}^{-1}$. Se obtuvo un comportamiento similar al del caudal de formación de azul de metileno, como puede verse en la Figura 5.6. De manera que, los caudales de mezcla y retención fueron ajustados en $1,29$ y $0,92 \text{ ml min}^{-1}$, respectivamente, para asegurar una señal analítica óptima y prevenir la deformación del disco y la incompleta adsorción del producto derivatizado sobre la zona de observación. Los caudales de retención recomendados en sistemas basados en optosensor, donde procesos de adsorción / elución están involucrados, suelen ser menores de 2 ml min^{-1} [43].

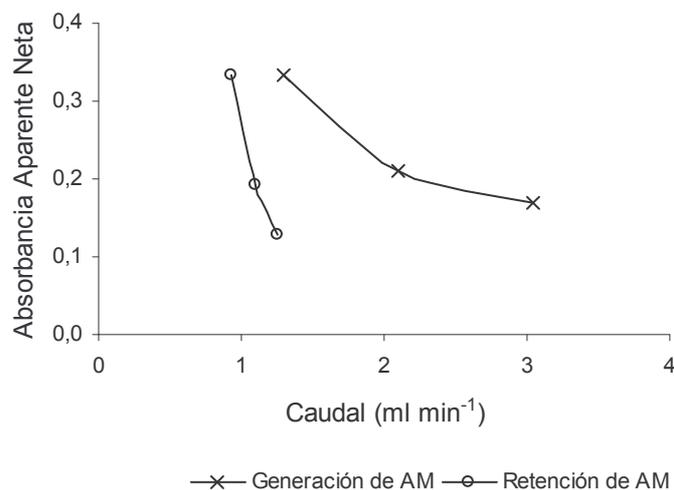


Figura 5.6. Influencia del caudal de generación de AM (azul de metileno) y del caudal de retención del AM sobre la señal analítica. Sulfuro: $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

Dado que el caudal de elución no es un parámetro crítico en un sistema optróptico en fase sólida debido a que la señal analítica es registrada durante el proceso de retención, el caudal de elución fue fijado en $1,8 \text{ ml min}^{-1}$.

Los reactores anudados fueron preferidos sobre los de tubería lisa a consecuencia de la mayor contribución de los flujos secundarios toroidales [53], como ha sido demostrado en anteriores sistemas MSFIA (Capítulo 3). Con el objetivo de mejorar la eficiencia de reacción bajo estas condiciones dinámicas, la longitud del bucle de reacción se varió desde 120 a 260 cm. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 5.7. Las longitudes más cortas proporcionaron un tiempo de contacto insuficiente entre los segmentos, mientras que los reactores más largos que 180 cm contribuyeron excesivamente a la dilución de la especie derivatizada. De modo que, un reactor anudado de 180 cm fue finalmente seleccionado para los futuros ensayos.

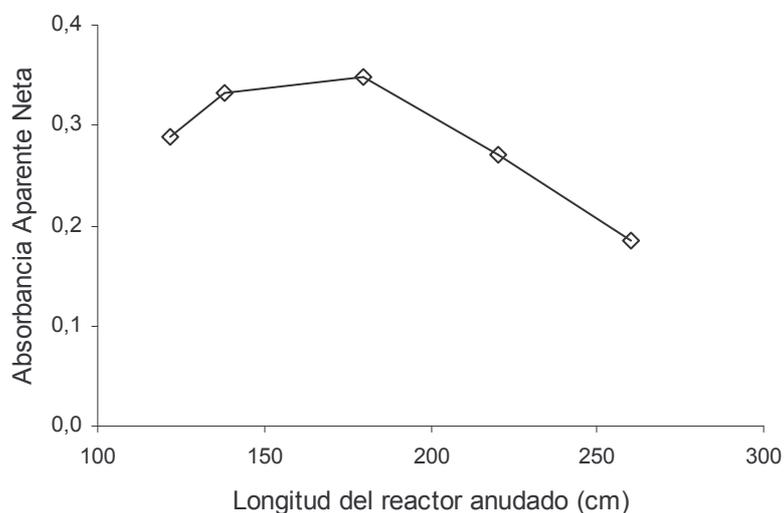


Figura 5.7. Influencia de la longitud del bucle de reacción anudado sobre la señal analítica. Sulfuro: $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

5.3.4 Elución

La elución del azul de metileno retenido en las membranas C₁₈ fue examinada utilizando disoluciones de metanol – agua que variaron dentro del rango 40 a 100 % (v/v). Una eliminación incompleta del azul de metileno adsorbido fue observada a proporciones menores a 70 % de metanol (Figura 5.8). Por otro lado, disoluciones de regeneración de membrana que contengan más de 80 % de metanol no fueron factibles de utilizar, a causa de la generación de burbujas dentro de la celda de flujo optródica. De modo que, una disolución de metanol 80 % (v/v) fue seleccionada para garantizar una elución rápida sin empeorar la relación señal – ruido en futuros ensayos. A pesar de que la disolución seleccionada eluye al azul de metileno de la membrana, se realizó una regeneración adicional con una disolución de metanol 80 % (v/v) – HCl 0,01 M con el fin de minimizar el ruido de fondo, para asegurar el concomitante mejoramiento de los límites de detección y determinación. Si bien las membranas C₁₈ son estables entre pH 2–12, este rango puede ser extendido acortando los períodos de contacto con disoluciones ácidas, de modo que la adición de ácido clorhídrico en el eluyente no causó detracciones sobre la operación a largo plazo del sistema de adsorción.

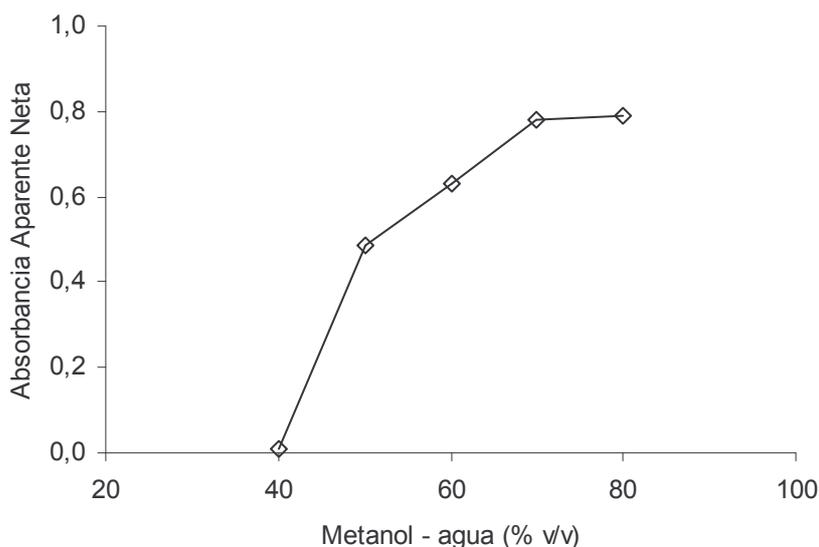


Figura 5.8. Estudio de la influencia de la disolución eluyente del azul de metileno sobre la señal analítica. Sulfuro: 200 $\mu\text{g l}^{-1}$.

5.3.5 Características analíticas del método optimizado

Las características analíticas del método MSFIA – optrodo optimizado basado en detección reflectométrica sobre fase sólida están listadas en la Tabla 5.2. El rango de trabajo lineal obtenido varió en un orden de magnitud, entre 20 y 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ de sulfuro. A pesar de que las mediciones de reflectancia difusa sólo alcanzan un rango lineal muy estrecho, lo cual es inherente a la función de Kubelka-Munk [67], el intervalo de calibración en el presente sistema optródico fue particularmente amplio y comparable con el de ensayos espectrofotométricos (Capítulo 3). Esto puede ser explicado por el hecho de que las señales analíticas fueron tratadas como absorbancia aparente [67], dado que la ley de Lambert-Beer fue satisfactoriamente aplicada a las bajas concentraciones de sulfuro ensayadas.

Los límites de detección y determinación fueron calculados a partir de tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar de la señal del blanco ($n=10$), sobre la pendiente de la curva de calibración [55,56]. El límite de detección obtenido fue de 2,9 $\mu\text{g l}^{-1}$, el cual es 3,5 veces más bajo que el de FIA-EAA [68], más de 100 veces más bajo que en un FIA-espectrometría gaseosa molecular [69], 170 veces más bajo que en un FIA-espectrofotometría [47], 14 veces más bajo que un SIA-MSFA-espectrofotometría [54] y 7,5 veces más bajo que en un sistema FIA-electrodo de grafito [70].

La repetitividad fue determinada a partir de 10 mediciones independientes y consecutivas de un patrón de 50 $\mu\text{g l}^{-1}$. La robustez del método automático fue evaluada calculando el coeficiente de variación de la determinación de un mismo patrón con diferentes discos de extracción.

Estos resultados junto a la línea de base registrada, la cual es extremadamente estable, revelan la capacidad del sistema diseñado para ser implementado en estaciones de monitoreo.

Tabla 5.2. Características analíticas del sistema MSFIA–optrodo para la determinación de sulfuro mediante pre-concentración en fase sólida basada en membranas.

Parámetro Analítico	Valor
Límite de detección ($\mu\text{g l}^{-1}$)	2,9
Límite de determinación ($\mu\text{g l}^{-1}$)	10,6
Sensibilidad ($\text{l } \mu\text{g}^{-1}$) (n=7)	$0,0033 \pm 0,0003$
Coeficiente correlación (r) (n=7)	$0,9973 \pm 0,0008$
Rango Lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	20-200
Repetitividad ($50 \mu\text{g l}^{-1}$) (%) (n=10)	0,73
Reproducibilidad ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) (%) (n=5)	4,5
Frecuencia de Inyección / h^{-1}	8
Frecuencia de muestreo / h^{-1} *	2,5

* La frecuencia de muestreo está calculada considerando tres réplicas por muestra y el enjuague de la tubería de aspiración de la muestra.

5.3.6 Análisis de muestras

El optrodo de fase sólida basado en membrana fue aplicado a la determinación de niveles traza de sulfuro en agua dulce (de pozo), agua salobre (de laguna costera) y en agua marina (costera del Mar Mediterráneo), así como en agua residual (salida de la planta depuradora EDAR-1, Palma de Mallorca). Las muestras fueron inmediatamente analizadas después de su recolección para prevenir la oxidación del analito. La fiabilidad del método fue determinada mediante ensayos de recuperación con concentraciones de 25, 50 y $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de sulfuro. Las recuperaciones, las cuales se encontraron dentro

del rango 94 a 112 % para el conjunto de muestras analizadas, indican que no ocurre una oxidación apreciable a sulfato durante el análisis, como consecuencia del ambiente completamente cerrado suministrado por el analizador en flujo. Estos resultados también indican que no existen interferencias de matriz, de modo que posibilita al analizador MSFIA el monitoreo de concentraciones traza de sulfuro, aún en muestras de matriz altamente compleja, tal como el agua residual. Los resultados de los ensayos de recuperación se presentan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Determinación de sulfuro en muestras de agua y ensayos de recuperación mediante el sistema MSFIA – optrodo.

Muestra	S²⁻ Adicionado (µg l⁻¹)	S²⁻ Encontrado (µg l⁻¹)	Recuperación (%)
Agua de mar	0	< LD	---
	25	23,7 ± 0,7	95
	50	48,5 ± 0,3	97
	100	97,0 ± 0,5	97
Agua de pozo	0	< LD	---
	25	23,7 ± 0,6	95
	50	51,8 ± 0,7	104
	100	102,2 ± 0,5	102
Agua de albufera	0	24,7 ± 0,5	---
	25	52,5 ± 0,2	106
	50	83,9 ± 0,5	112
	100	133,0 ± 0,5	107
Agua residual ^a	0	68,4 ± 0,4	---
	25	89,3 ± 0,2	96
	50	124,4 ± 0,2	105
	100	168,1 ± 0,8	100

Los resultados están expresados como la media de tres réplicas ± la desviación estándar.

^a Salida de la planta depuradora, muestra floculada.

5.3.7 Comparación del MSFIA-optrodo con otros métodos previos de pre-concentración con detección espectrofotométrica

En esta sección, las características analíticas del sistema MSFIA – optrodo son críticamente comparadas con las de trabajos basados en métodos de pre-concentración con detección final espectrofotométrica o reflectométrica. Las características analíticas de cada método están resumidas en la Tabla 5.4. Ésta compila los pocos trabajos publicados que combinan análisis en flujo con extracción en fase sólida [42,45], y un procedimiento manual recientemente publicado [66]. Como puede verse, el método MSFIA – optrodo da el mejor coeficiente de variación debido a la exactitud de las buretas multijeringa usadas como conductores automáticos de líquido, así como a la estabilidad a largo plazo de la fuente de luz y a las características hidrodinámicas óptimas de la membrana de extracción.

El volumen de muestra detallado en la Tabla 5.4 para los métodos FIA se refiere solamente al volumen de inyección para cada pico, sin considerar la pérdida de muestra tanto durante el ciclo de análisis completo como en el tiempo de inducción. En el sistema MSFIA propuesto, la inyección automática de pequeños segmentos de reactivos mediante la activación de las válvulas solenoides conducen a un consumo mínimo de reactivos agresivos (en nuestro caso, 32 veces menos de HCl en comparación con los típicos sistemas FIA) y reactivos cromogénicos (50 veces menos). La cantidad de desechos generados es también mucho menor que la de otros métodos de pre-concentración (más de 2 veces menos).

Con respecto a los métodos de espectrofotometría en fase sólida, sólo hay un trabajo que hace referencia a la determinación de sulfuro [45]. El trabajo mencionado presenta algunas ventajas en comparación con el sistema optródico, tales como un límite de detección más bajo y una elevada frecuencia de inyección. Sin embargo, su más importante desventaja deriva del uso de resina C₁₈, la cual es empaquetada dentro de la celda de flujo. Esta operación es laboriosa, consume tiempo, requiere habilidad por parte del usuario para empaquetar el material y también para igualar el nivel dentro del campo de

observación. Además, el progresivo compactamiento del material dificulta su aplicabilidad a largo plazo. Todas estas desventajas son realmente soslayadas por el uso de optodos basados en membranas, los cuales aseguran análisis sencillos, expeditivos y fiables como queda demostrado por los bajos valores de RSD obtenidos. Deben destacarse otras ventajas adicionales del método MSFIA, tales como una reducción de 4 veces en la generación de desechos, así como reducciones de 88 y 47 veces en el consumo de ácido y reactivos cromogénicos, respectivamente. La sencilla configuración del sistema MSFIA – optosensor propuesto y del detector óptico son también características a resaltar.

Comparando con procedimientos de extracción publicados para la determinación de sulfuro, el sistema optródico totalmente automatizado controlado por ordenador, basado en extracción en fase sólida basada en membranas, ofrece robustez, baja resistencia al flujo, una operación simple y bajos coeficientes de variación junto con una sensibilidad comparable, pero usando cantidades menores de material adsorbente y un camino óptico menor, dado que la penetración del haz luminoso dentro de la membrana es de sólo unos pocos micrómetros.

Tabla 5.4. Comparación de las características analíticas de diferentes técnicas de flujo y procedimientos manuales publicados para la pre-concentración de sulfuro usando detección espectrofotométrica/reflectométrica.

Método	Material Adsorbente	Espectro-fotometría en fase sólida	Límite Detección ($\mu\text{g l}^{-1}$)	R.S.D. (%)	Frecuencia Inyección (h^{-1})	Rango lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Volumen muestra (ml)	Reactivos (mg/inyección)				Desechos (ml h^{-1})	Ref.	
								HCl	H_2SO_4	DMPD	Fe(III) Metanol			
Manual	Cartuchos C_{18}	No	---	1,9	---	120-1500	50	878	---	0,24	4,97	2370	207*	[66]
FIA	Membrana de Silicona	No	0,1	5	5	1-10	12	788	35	7,20	3,23	---	108	[42]
FIA	Resina C_{18}	Columna	1,7	4	12	5-50	0,5	77	2208	3,75	15,00	1422	197	[45]
MSFIA-Optrodo	C_{18} atrapada en fibras PTFE	Membrana	2,9	0,7	8	20-200	3	26	---	0,30	0,10	632	48	Este trabajo

*Valor calculado asumiendo el uso de un cartucho por hora, consumiendo 20 min en la pre-concentración.

5.4. Conclusiones

En este capítulo, el potencial de la técnica de inyección en flujo multijeringa unido al de un sensor de fibra óptica de reflectancia difusa para la implementación de esquemas de pre-concentración en fase sólida basada en discos de membrana, ha sido demostrado y aplicado a la determinación de trazas de sulfuro en muestras de agua ambientales y agua residual.

El sistema óptico miniaturizado basado en LEDs, con capacidad de pre-concentrar, es especialmente apropiado para realizar análisis a campo y monitoreos en tiempo real de sulfuro. Además, este sistema MSFIA es capaz de realizar una multitud de operaciones analíticas, tales como la carga de muestra, mezcla de reactivos/muestra y enjuague del sistema de flujo, con sólo dos válvulas solenoides auxiliares, las cuales adicionalmente evitan que las disoluciones de lavado sean bombeadas a través de la zona de adsorción.

Además, y opuestamente a las técnicas de flujo precedentes, el MSFIA proporciona algunas ventajas adicionales, tales como compactibilidad, versatilidad, bajo consumo de muestra y reactivos, lo cual conduce a una mínima generación de desechos.

6

SISTEMA MSFIA AUTOMÁTICO CON SEPARACIÓN EN-LÍNEA POR DIFUSIÓN GASEOSA ACOPLADO A UN OPTRODO DE MEMBRANA*

6.1. Introducción

La combinación de técnicas de análisis en flujo, de separación, de pre-concentración y de detección ha abierto nuevos caminos en química analítica para el desarrollo de sistemas totalmente automatizados adaptables a la monitorización en tiempo real.

Las técnicas de separación juegan un papel crucial en la aplicación de métodos analíticos, cuyos principales objetivos son la separación del analito y la eliminación de compuestos interferentes. En este sentido, la difusión gaseosa (DG) en combinación con sistemas de flujo facilita la determinación selectiva de compuestos volátiles en sistemas totalmente aislados [6,58,71].

El aislamiento, con el concomitante enriquecimiento de la especie de interés, se logra aplicando procedimientos de extracción en fase sólida que han

* L. Ferrer, G. De Armas, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, Talanta 68 (2005) 343.

(Ver Anexo)

demostrado ser valiosas herramientas para el pre-tratamiento de muestras [62]. La detección directa realizada con optrodo sobre una fase sólida alcanza un mayor factor de enriquecimiento que la extracción tradicional, la cual involucra la elución de la especie retenida para realizar la detección óptica en la fase eluida y la pérdida parcial de la capacidad de pre-concentración ganada durante la etapa de retención. La detección optródica se basa en la medición directa de la atenuación de la luz por una superficie reactiva después de la pre-concentración por adsorción del analito, adecuadamente transformado si ello fuera necesario [63,64,72,73]. Sin embargo, hasta el momento no se conoce dato alguno referente a sistemas de análisis en flujo, en los cuales se acoplen un módulo de DG y un optrodo basado en discos de membrana para la pre-concentración y detección de especies químicas.

La combinación de las técnicas presentada en este capítulo permite la determinación selectiva, sensible y totalmente automatizada de especies volátiles mediante previa transformación química. El sulfuro ha sido seleccionado como modelo de analito para establecer el potencial del sistema MSFIA – DG – optrodo.

Los métodos clásicos para la determinación de sulfuro en muestras con matrices complejas, tales como agua de mar o agua residual, además de ser lentos y tediosos, requieren procedimientos preliminares de tratamiento de la muestra (por ejemplo, la floculación de los sólidos suspendidos) para garantizar la exactitud de los resultados [41].

El objetivo de este trabajo es demostrar las capacidades de un sistema MSFIA con separación en-línea por DG acoplado a un optosensor basado en la reflectancia difusa para determinar concentraciones trazas de sulfuro en muestras ambientales de matriz compleja, aunque contengan sólidos en suspensión sin requerir ningún tratamiento previo de la muestra. El método combinado se basa en la liberación del analito como sulfuro de hidrógeno desde una muestra no tratada al canalceptor del módulo de DG, la transformación del analito en azul de metileno de acuerdo a la reacción de Fischer [40], la pre-concentración y detección del azul de metileno formado, utilizando un optrodo de membrana construido en el laboratorio.

6.2. Parte experimental

6.2.1 Reactivos y membranas

Una disolución de trabajo 3 mM de DMPD fue preparada por debida dilución de la disolución madre con HCl 0,5 M.

Una disolución de trabajo 3 mM de Fe(III) fue preparada por dilución de la disolución madre con HCl 0,5 M.

El *carrier* o corriente portadora fue una disolución de HCl 0,14 M preparada por dilución a partir de ácido clorhídrico concentrado (Scharlau).

La corriente aceptora del módulo de DG fue una disolución NaOH 10^{-3} M.

Dos disoluciones se utilizaron como eluyentes, metanol 80% (v/v) - HCl 0,01 M y metanol 80% (v/v), las cuales también permitieron un apropiado acondicionamiento de la membrana. Estas disoluciones fueron desgasificadas antes de ser utilizadas, mediante un baño de ultrasonido.

Las disoluciones estándar de sulfuro ($20\text{--}200 \mu\text{g l}^{-1}$) fueron preparadas por dilución de la disolución madre con NaOH 25 mM.

Una membrana Durapore (Millipore, Bedford, MA, USA) de PVDF (polifluoruro de vinilideno), con un tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$ y $125 \mu\text{m}$ de espesor, fue usada como barrera hidrofóbica para la separación física de las corrientes dadora y aceptora del módulo de DG.

Los discos de membrana Empore® (3M, St. Paul, MN, USA), de sílica gel químicamente modificada con grupos octadecilos (C_{18}) de $0,5 \text{ mm}$ de espesor fueron cortados en pequeños discos con un diámetro de 9 mm para ser usados en la celda de flujo optródica construida en el laboratorio.

6.2.2 Sistema de flujo y detector óptico

El sistema de inyección en flujo multijeringa acoplado a una unidad de DG y a un sensor de fibra óptica de reflectancia difusa se muestra en la Figura 6.1. Se utilizaron dos módulos multijeringa (Crison, Barcelona, España) para la impulsión de líquidos. Uno de ellos fue equipado con cuatro jeringas (Hamilton,

Suiza) S1-S4 de 1, 1, 5 y 5 ml, respectivamente, mientras que el otro módulo multijeringa fue equipado con cuatro jeringas S5-S8 de 1, 10, 10 y 5 ml, respectivamente. El sistema también incluyó dos válvulas solenoides adicionales, V9 y V10 (Takasago, Japón), las cuales permitieron el desarrollo completo del protocolo analítico. La válvula V9 dirigió la zona aspirada desde el muestreador (Crison) al bucle de carga, después de lo cual el flujo fue invertido y el segmento aspirado fue conducido al módulo de DG. La válvula V10 dispensa los segmentos de muestra y reactivos, a través del disco de extracción, sólo cuando la etapa de pre-concentración se está realizando. Además, V10 permitió realizar las operaciones de inicialización del sistema y el lavado de las líneas de flujo sin dispensar disoluciones a través de la membrana.

Los bucles y la tubería fueron hechos de tubos de 0,8 mm de diámetro interno, excepto el bucle de carga, el cual fue de 1,5 mm de diámetro interno. La longitud del bucle de carga (BC) fue de 400 cm y de los bucles de reacción anudados (BR-1, 2 y 3) fue de 130, 200 y 200 cm, respectivamente.

El sensor óptico utilizado para la realización de este trabajo se encuentra descrito detalladamente en el Capítulo 2.

El detector óptico miniaturizado esta formado por un espectrofotómetro CCD USB 2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL) y un diodo emisor de luz láser (diodo rojo, 75 mA de intensidad máxima, banda espectral de 620-700 nm, Sciware, Palma de Mallorca, España) con una fuente de suministro de energía de intensidad ajustable (Sciware). La fuente de luz fue conectada a la celda de flujo optróptica mediante uno de los brazos de la fibra óptica bifurcada (Ocean Optics) de 400 μm de diámetro. La radiación reflejada fue devuelta al detector a través del otro brazo de la fibra óptica (400 μm de diámetro). La longitud de onda seleccionada para determinar el azul de metileno fue de 666 nm. El control instrumental, la adquisición y el procesamiento de los datos de reflectancia difusa fueron realizados con el programa AutoAnalysis 5.0.

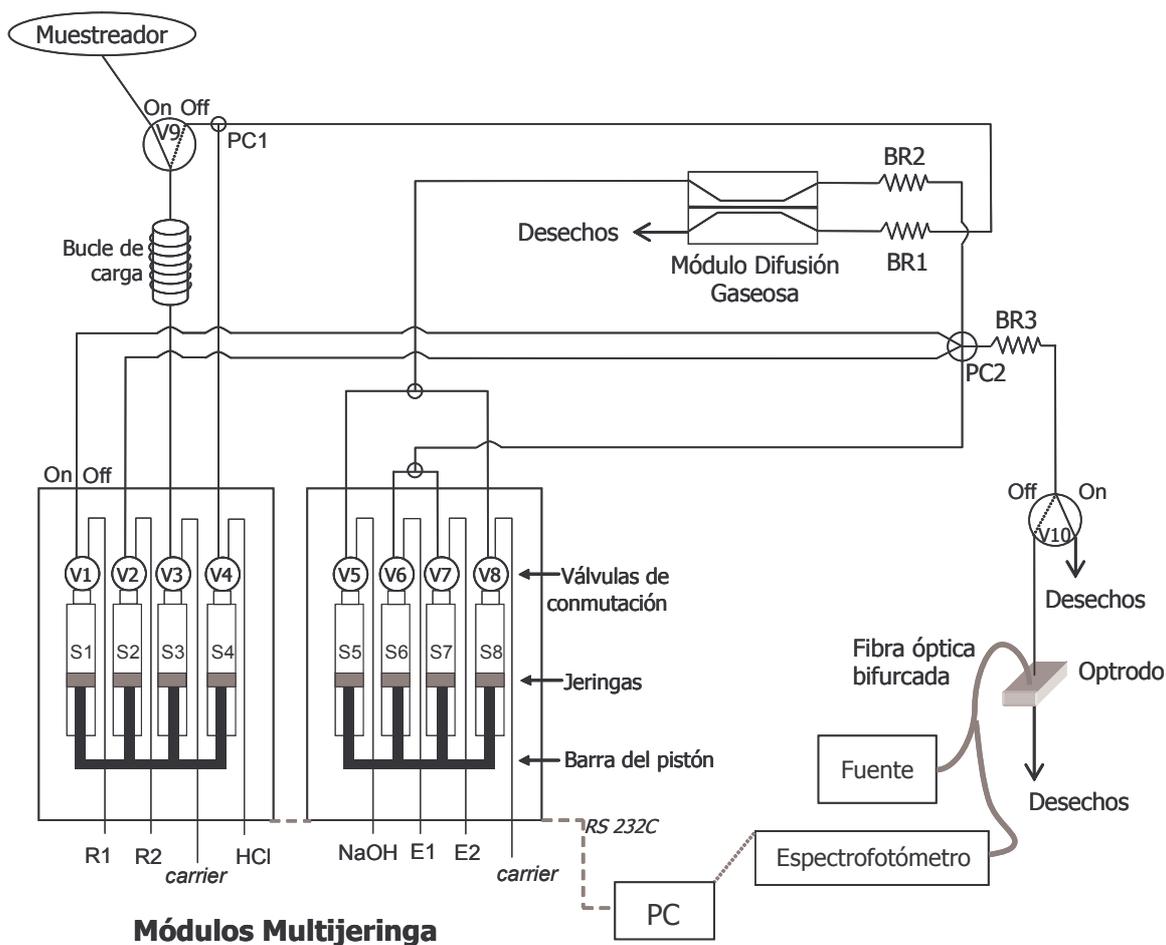


Figura 6.1. Esquema del sistema MSFIA–DG–optrodo diseñado para la determinación de sulfuro. R1: Fe(III) 3 mM; R2: DMPD 3 mM; E1: metanol 80% (v/v); E2: metanol 80% (v/v)–HCl 0,01 M.

6.2.3 Procedimiento

El procedimiento automatizado para la determinación de sulfuro mediante el sistema MSFIA–DG–optrodo de membrana, se detalla en la Tabla 6.1, y se resume a continuación:

- 1- Inicialmente las jeringas se llenan con las disoluciones de sus respectivos depósitos a un caudal de 1 ml min^{-1} (para S1) con las válvulas de las jeringas 1-Off 2-Off 3-On 4-Off 5-Off 6-Off 7-Off 8-Off y las válvulas adicionales 9-On 10-Off. El bucle de carga se llena con 5ml de muestra mediante la activación simultánea de V3 y V9.
- 2- Para inicializar el sistema, los segmentos de muestra y disolución ácida son conducidas hasta el punto de confluencia PC1 (pasos 1 y 2 en la Tabla 6.1).
- 3- Después de conducir las disoluciones hasta las entradas del módulo de DG (pasos 3 y 4) los segmentos de aceptor y dador son simultáneamente dispensados en contracorriente a un caudal total de 0,18 y 1,8 ml min^{-1} , para aceptor y dador, respectivamente (paso 5). En este paso, el sulfuro de hidrógeno formado es desplazado de la corriente dadora y atrapado en la aceptora en forma de sulfuro. El segmento enriquecido es colocado en el bucle de reacción BR2.
- 4- El espectrofotómetro comienza la adquisición de datos a 666nm y 1 Hz para registrar la señal analítica.
- 5- Seguidamente, los segmentos de disolución aceptora enriquecida y de los reactivos se mezclan simultáneamente en el BR3, teniendo lugar las reacciones de Fischer antes de alcanzar la celda optródica (paso 6).
- 6- Con el objeto de registrar la señal analítica, un segmento de *carrier* ácido es dispensado en el BR3 (paso 7).
- 7- El azul de metileno formado en-línea es pre-concentrado sobre el disco de extracción C_{18} , alcanzando un valor mínimo de reflectancia difusa (máximo de absorbancia aparente – meseta) cuando el segmento entero de muestra y reactivos haya fluido a través de la membrana.
- 8- Luego de registrarse el máximo de absorbancia aparente, las disoluciones de elución fueron secuencialmente inyectadas para la desorción del producto de reacción y el acondicionamiento del disco de extracción antes de comenzar un nuevo ciclo analítico. La diferencia entre la línea de base y la meseta es tomada como la señal analítica. Un registro de esta señal se muestra en la Figura 6.2.
- 9- La secuencia de operaciones se repite 3 veces desde el paso 3.

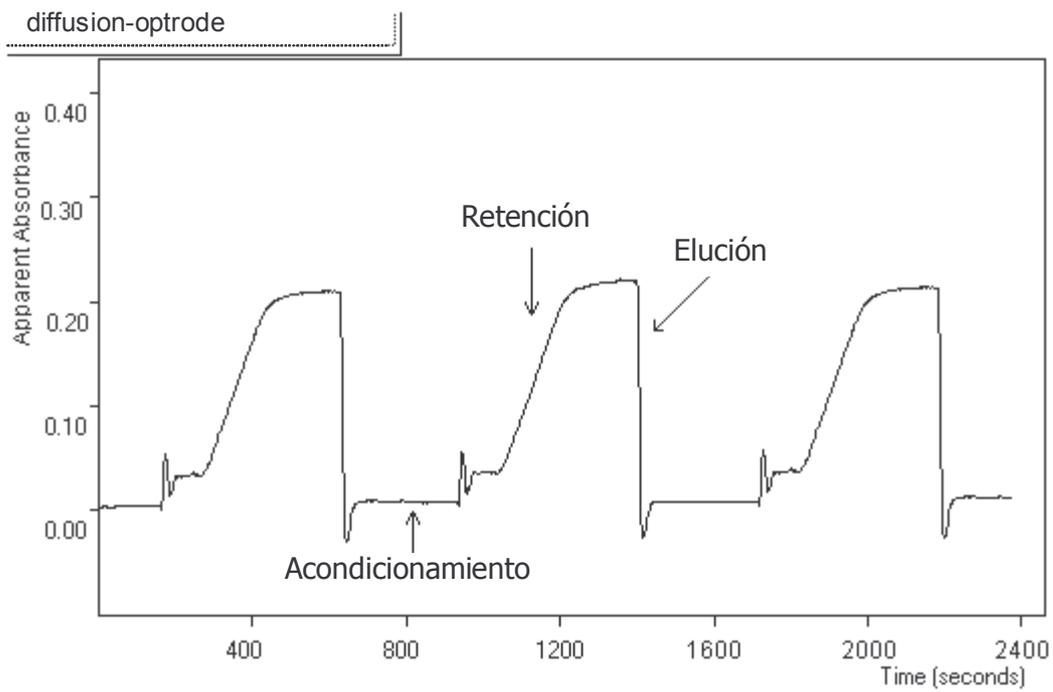


Figura 6.2. Registro de la señal analítica para una pre-concentración de sulfuro de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ mostrando las etapas analíticas en la detección óptica.

Tabla 6.1. Protocolo de multiconmutación para la separación en-línea por difusión gaseosa (DG) y pre-concentración en optrodo de sulfuro mediante análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA).

Pasos	Válvulas Solenoides										Corriente dadora			Reactivos			Eluyente		Caudal para S1 (ml min ⁻¹)
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	Muestra (ml)	HCl 1,5 M (ml)	Corriente aceptora (ml)	DMPD (ml)	Fe(III) (ml)	Carrier (ml)	MeOH 80% (ml)	MeOH 80% - HCl 0,01 M (ml)	
Inicialización del sistema	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	Off	Off	On	0,045	--	--	--	--	--	--	--	2
2-HCl 1,5 M hasta PC1*	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	Off	On	--	0,100	--	--	--	--	--	--	2
3-Mezcla de muestra con ácido*	Off	Off	On	On	Off	Off	Off	Off	Off	On	0,330	0,330	--	--	--	--	--	--	0,50
4-Disolución aceptora hasta modulo DG	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	On	--	--	0,230	--	--	--	--	--	0,50
5-Separación en-línea por DG	Off	Off	On	On	On	Off	Off	Off	Off	On	4,625	4,625	0,925	--	--	--	--	--	0,18
6-Desarrollo de reacción de Fischer	On	On	Off	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	--	--	--	0,200	0,200	1	--	--	0,18
7-Registro de la señal analítica	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	--	--	--	--	--	2	--	--	0,18
8-Desorción del producto de reacción y acondicionamiento del disco de extracción*	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	Off	--	--	--	--	--	--	1	--	0,50
Elución y regeneración	Off	Off	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	--	--	--	--	--	--	--	1	0,50

PC1: Punto de Confluencia #1. S1: Jeringa #1 (1 ml). * Paso multiconmutado.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1 Potencial del sistema combinado MSFIA – DG – optrodo

La difusión gaseosa y la pervaporación son técnicas basadas en membranas que se hallan bien consolidadas en la actualidad, las cuales se utilizan en sistemas de análisis en flujo para la separación de compuestos volátiles y especies que se desprenden en forma de gas desde matrices sólidas y líquidas [1,74]. Su principal ventaja es la de incrementar la selectividad de las metodologías analíticas al evitar que los componentes de la muestra interfieran al alcanzar el detector: los compuestos iónicos son totalmente excluidos y las muestras coloreadas y turbias pueden ser analizadas incluso con métodos espectrofotométricos, lo que facilita el monitoreo por inyección o aspiración directa desde el sitio de muestreo.

Además, también se ha reconocido la capacidad de pre-concentración de los sistemas de DG mediante la implementación de esquemas de flujo detenido o de re-circulación en una configuración cerrada [59,75]. Sin embargo, un factor de enriquecimiento moderado y un frecuente mantenimiento -propio de las recalibraciones periódicas de los sistemas de flujo- detractan su uso. Ambas desventajas pueden ser soslayadas utilizando sistemas en flujo basados en MSFIA, gracias a su robustez y versatilidad. De este modo se garantizan la manipulación exacta y reproducible de los líquidos en las tuberías del sistema y la selección de caudales adecuados para las corrientes dadora y aceptora de la celda de DG. El rendimiento de la separación en-línea puede aumentarse en un sistema acoplado MSFIA–DG por estrategias de flujo detenido, contracorriente o por inversión del flujo.

Una mejora en la eficiencia de DG se logra aplicando procedimientos de difusión exhaustiva realizando una detención de la corriente dadora mientras se bombea continuamente la corriente aceptora. Obviamente, esta corriente aceptora “móvil” aumentará la dilución, que puede ser compensada por la pre-concentración del segmento enriquecido. De hecho, las trampas sólidas como el material adsorbente contenido en los micro-cartuchos, son un componente esencial de la denominada extracción con membrana con una interfase adsorbente (MESI), comúnmente utilizados para retener compuestos orgánicos

volátiles previamente a las determinaciones por cromatografía gaseosa capilar [76].

En este capítulo, se describe por primera vez un sistema que integra la pre-concentración y detección de analitos que pueden separarse de su matriz al formar especies químicas volátiles, basado en mediciones mediante un optrodo de membrana. La ausencia de sobre-presiones en secuencias operacionales largas, y el ajuste sencillo de la fibra óptica a la zona a examinar, hacen a esta alternativa particularmente atractiva para el análisis. Como se discutirá más adelante, la combinación de MSFIA–DG–sensor óptico también admite el flujo continuo y sincrónico de segmentos de muestra y reactivos a ambos lados de la membrana sin deteriorar la sensibilidad analítica, aunque las corrientes dadora y aceptora sean dispensadas a través del módulo de separación a caudales significativamente diferentes.

6.3.2 Configuración del sistema combinado MSFIA – DG – optrodo

De las dos maneras posibles de llevar a cabo la separación por DG, es decir, flujo detenido o flujo continuo, este último fue seleccionado para establecer el potencial del método MSFIA propuesto. A pesar de la transformación del analito en una forma que no puede difundir en la corriente aceptora, la modalidad de inyección en flujo contra-corriente produjo una mejora de la señal analítica de un 64 % respecto a la de circulación de ambas corrientes en el mismo sentido.

La primera disolución aceptora que se probó fue la mezcla de reactivos cromogénicos, DMPD y Fe(III) en medio ácido, a una concentración de 25 mM y 60 mM, respectivamente, ya que ésta fue satisfactoriamente empleada en el sistema presentado en el Capítulo 4, usando detección espectrofotométrica en una celda de flujo. Sin embargo, esta disolución aceptora resultó inapropiada para la detección mediante optosensor, debido a que las altas concentraciones de reactivos saturaban la membrana de pre-concentración. Por lo tanto, se disminuyeron las concentraciones hasta alcanzar aquellas que no provocaran la saturación, pero éstas no fueron las apropiadas para obtener un rendimiento adecuado en el proceso de difusión. De manera que, el módulo de difusión

gaseosa fue trasladado de lugar en el *manifold*, situándose antes de la mezcla del analito con los reactivos. Así, en la nueva configuración se utilizó una disolución alcalina como corriente aceptora.

El tipo de membrana para realizar la pre-concentración en fase sólida fue seleccionada previamente en el Capítulo 5. Las membranas C₁₈ fueron seleccionadas debido a que presentaron las señales de blanco más bajas y por la facilidad para llevar a cabo el acondicionamiento y la regeneración de las mismas. Además, los valores de repetitividad de los ensayos con las membranas C₁₈ fueron mejores que los obtenidos para las otras membranas.

6.3.3 Investigación de las variables químicas

Una condición indispensable para realizar la separación en-línea del sulfuro es la transformación del analito en un compuesto volátil por una disminución del pH. El ajuste de pH fue llevado a cabo en-línea usando ácido clorhídrico diluido. La concentración de HCl se estudió entre 0,5 y 3 M, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 6.3. La liberación de sulfuro de hidrógeno aumentó con el aumento de la concentración de ácido, hasta 1,5 M, concentración que fue adoptada para los siguientes experimentos.

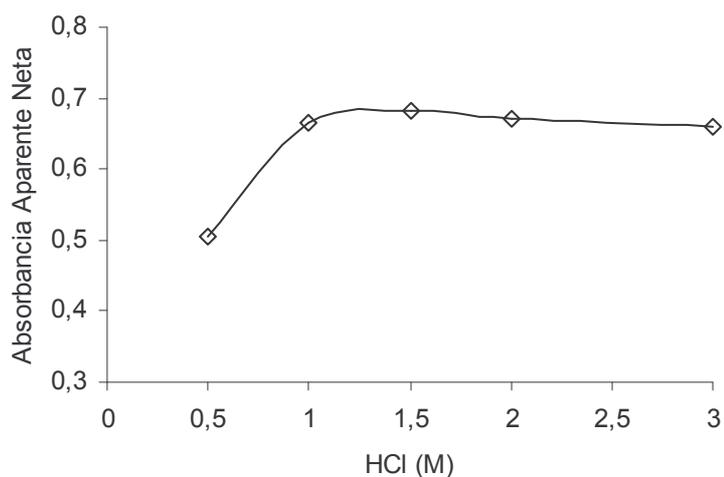


Figura 6.3. Efecto de la concentración de ácido para realizar el ajuste en-línea del pH de la muestra.

El efecto de la concentración de la disolución aceptora se evaluó dentro del rango 10^{-5} – 10^{-1} M de NaOH. Como puede verse en la Figura 6.4 entre las concentraciones 10^{-3} y 10^{-2} M se alcanzaron las señales más altas, disminuyendo éstas por encima y por debajo de dicho intervalo, la concentración más baja se seleccionó para continuar el estudio.

La influencia de algunas variables químicas (concentraciones de reactivos y acidez de los reactivos) que afectan a la señal obtenida por reflectancia difusa se estudiaron en el Capítulo 5. De acuerdo con los resultados, la composición final de los reactivos cromogénicos fue establecida para la DMPD en 3 mM en HCl 0,5 M y para el Fe(III) en 3 mM en HCl 0,5 M. Puede destacarse que la concentración de ácido usada en este trabajo es mucho menor que la utilizada en trabajos previos de análisis en flujo o en métodos manuales, en los cuales la acidez del medio varió entre 1 y 6 M de HCl [42,47,66].

Una disolución de HCl 0,14 M fue empleada como corriente portadora, cuya concentración iguala la concentración del ácido en el segmento de azul de metileno. La línea de base se mantuvo constante a través del ciclo entero de análisis.

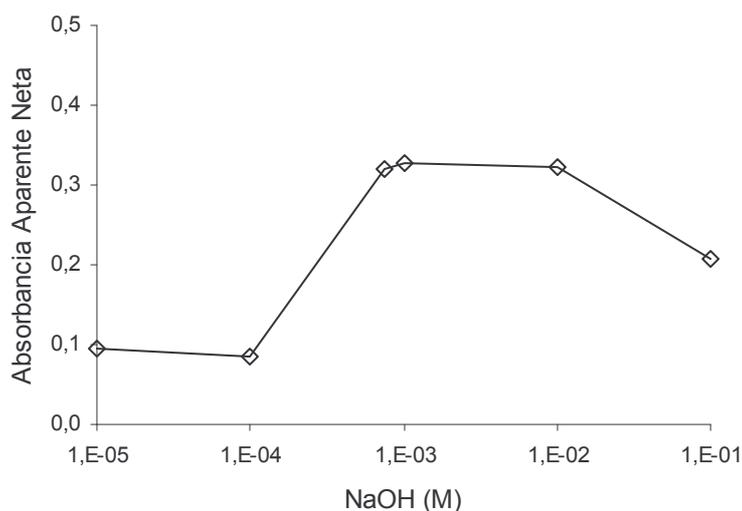


Figura 6.4. Estudio de la concentración de la disolución alcalina aceptora del módulo de DG. Concentración de sulfuro: $250 \mu\text{g l}^{-1}$.

El proceso de elución del azul de metileno de la membrana C₁₈ también se estudió con anterioridad (Capítulo 5). Dos disoluciones de metanol 80 % (v/v) – HCl 0,01 M y metanol 80 % (v/v) – agua fueron utilizadas para la elución y regeneración de la membrana. La adición de ácido está limitada por una relación de compromiso, ya que la presencia del mismo en el eluyente minimiza el ruido de fondo, permitiendo alcanzar mejores límites de detección, pero su excesivo uso disminuye la durabilidad de la membrana, cuyo pH óptimo de funcionamiento a largo plazo se encuentra entre 2 y 12 unidades de pH.

6.3.4 Investigación de los parámetros de inyección en flujo

Se estudiaron los parámetros hidrodinámicos que pudieran influenciar la señal analítica, tales como los volúmenes de muestra y de reactivos, los caudales, y el tipo y longitud de los reactores.

El volumen de muestra dispensado al módulo de DG fue evaluado entre 1 y 7 ml. Volúmenes de muestra por encima de 5 ml no causaron diferencias significativas en la señal. Con el objeto de evitar un consumo excesivo de muestra, sin disminuir el rango lineal ni empeorar el límite de detección, se seleccionó un segmento de muestra de 5ml para el procedimiento de DG. En la modalidad de inyección en flujo continuo aplicada, este volumen de disolución dadora define, a partir de la relación entre los caudales de las corrientes aceptora y dadora, la longitud del segmento de la disolución aceptora a ser pre-concentrada.

El efecto del caudal de ambas corrientes – dadora y aceptora – sobre la eficiencia en la transferencia de masa, fue evaluado para este conjunto particular de jeringas. Con el fin de reducir el espesor de la capa de difusión para la especie de interés, pero al mismo tiempo cumplir con los requerimientos cinéticos del proceso dinámico de DG, la disolución dadora fue bombeada continuamente a un caudal 10 veces mayor que el de la corriente aceptora, es decir a 1,8 ml min⁻¹.

La influencia del tamaño de los segmentos de reactivos sobre el desarrollo de la reacción de transformación química del analito fue estudiado entre 100 y 300 µl para un volumen fijo de aceptor (1 ml). Debido a que los segmentos de

la disolución aceptora enriquecida y de los reactivos son inyectados simultáneamente desde el punto de confluencia CP2 (ver Figura 6.1), la señal más alta se obtuvo utilizando 200 μl de DMPD y 200 μl de reactivo oxidante, volúmenes requeridos para igualar la longitud del segmento enriquecido al caudal aplicado. Como resultado, se produce un ahorro importante de reactivos en comparación con los métodos de inyección en flujo convencionales basados en el flujo continuo de una corriente de reactivos.

Como se discutió en capítulos anteriores, los reactores anudados fueron seleccionados en vez de los de tubería recta, a causa de una mayor contribución de los flujos toroidales secundarios [53], los cuales mejoran la mezcla radial entre los segmentos a la vez que reducen la dispersión axial tanto del segmento que contiene al analito como al del azul de metileno formado.

Con el objeto de mejorar el rendimiento de la reacción en estas condiciones, se estudió la longitud del bucle de reacción RC3 entre 150 y 350 cm. Los reactores más cortos proporcionaron un tiempo de contacto insuficiente entre los segmentos, mientras que los más largos de 200 cm no produjeron un aumento significativo de la señal analítica debido a la rapidez de la reacción. Así, un reactor anudado de 200 cm fue elegido para el sistema propuesto, ya que se obtuvo un tiempo de residencia suficiente para el desarrollo de las reacciones.

El efecto del caudal sobre la generación en-línea del colorante azul de metileno fue estudiado sobre el intervalo 1,3–3,0 ml min^{-1} . El caudal al cual se obtuvo la máxima señal fue de 1,3 ml min^{-1} . El efecto del caudal del *carrier* en la etapa de carga de la membrana fue investigado en el rango 0,9–2,2 ml min^{-1} . Una tendencia similar se observó tanto para las reacciones de transformación química del analito como para la inmovilización del azul de metileno sobre la membrana. Así, los caudales de mezcla y pre-concentración fueron ajustados a 1,3 y 0,9 ml min^{-1} , respectivamente, asegurando una señal analítica óptima y previniendo un excesivo aplastamiento de la membrana y una adsorción incompleta del producto formado sobre la zona de observación. Estos caudales coinciden con aquellos recomendados en la literatura, $< 2,0 \text{ ml min}^{-1}$, para sistemas optródicos que involucren procesos de adsorción / elución [43].

Debido a que la señal analítica se registra durante el proceso de retención, el caudal de elución no es un parámetro crítico en las mediciones con optrodos de fase sólida. Así, el caudal de elución se fijó en 5 ml min^{-1} .

6.3.5 Características analíticas del método MSFIA – DG – optrodo

Las características analíticas del procedimiento MSFIA – DG – optrodo optimizado se reúnen en la Tabla 6.2. Se obtuvo un rango de trabajo lineal dentro de un orden de magnitud, entre 20 y $500 \mu\text{g l}^{-1}$ de sulfuro. Si bien las mediciones de reflectancia difusa se caracterizan por proporcionar rangos lineales extremadamente estrechos, lo cual es inherente a la aplicación de la función de Kubelka-Munk [67], el intervalo de calibración en el presente sistema optródico fue particularmente amplio y comparable a aquel obtenido en las determinaciones espectrofotométricas (Capítulo 3). Esto puede ser explicado por el hecho de que las señales analíticas fueron tratadas como absorbancia aparente [67] debido a que la ley de Lambert-Beer se cumplió satisfactoriamente para concentraciones bajas de sulfuro.

Los límites de detección y determinación fueron calculados a partir de tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar de la señal del blanco sobre la pendiente de la curva de calibración [55,56]. La repetitividad fue calculada de diez mediciones consecutivas e independientes de un patrón de sulfuro de $200 \mu\text{g l}^{-1}$.

La sensibilidad de la metodología propuesta se calculó como la media de las pendientes obtenidas a partir de diez curvas de calibración realizadas en diferentes días de trabajo [55,56].

Se evaluó la robustez del método automatizado calculando el coeficiente de variación de patrones de sulfuro ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) analizados en diez días de trabajo usando diferentes discos de extracción.

A pesar de la pequeña longitud de camino óptico atravesado por el rayo de luz a través de la membrana (sólo unos pocos micrómetros), la metodología de pre-concentración propuesta mejora el límite de detección (23 veces más bajo) y la sensibilidad (350 veces mayor) respecto al sistema MSFIA-DG

(basado en mediciones de absorbancia en celda de flujo) presentado en el Capítulo 4.

Tabla 6.2. Características analíticas del sistema MSFIA – DG – optosensor.

Parámetro Analítico	Valor
Límite de Detección ($\mu\text{g l}^{-1}$)	1,3
Límite de Determinación ($\mu\text{g l}^{-1}$)	4,5
Sensibilidad ($\text{l } \mu\text{g}^{-1}$)	$0,0160 \pm 0,0002$
Coefficiente correlación* (r)	$0,9987 \pm 0,0005$
Rango Lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	20 - 500
Repetitividad (%) ($200 \mu\text{g l}^{-1}$)*	2,2
Reproducibilidad (%) ($100 \mu\text{g l}^{-1}$)*	6,8
Frecuencia de Inyección / h^{-1}	5

*(n=10)

6.3.6 Ventajas de la metodología propuesta

Comparando la metodología propuesta con las diferentes técnicas de flujo descritas en la literatura, basadas en la pre-concentración de sulfuro usando detección espectrofotométrica o reflectométrica [42,45], el método MSFIA-DG-optrodo provee los mejores coeficientes de variación (2% vs. 4-5%). Esto es una consecuencia de la exactitud de las buretas multijeringa usadas como impulsoras de líquido, así como de la estabilidad de la fuente de luz y de las características hidrodinámicas del material adsorbente de la membrana.

Además, debido a que la técnica MSFIA dispensa muestra y reactivos sólo cuando son requeridos mediante la activación de las válvulas solenoides, se garantiza un consumo mínimo de muestra y reactivos agresivos. Así, se

logra un ahorro respecto de los sistemas FIA antes mencionados: entre 2,8 y 7,7 veces menos cantidad de HCl, entre 37 y 72 veces menos de DMPD y entre 108 y 500 veces menos de Fe(III) [42,45]. Concomitantemente la cantidad de desechos generada es mucho menor que para los otros métodos de pre-concentración, alcanzándose una disminución entre 1,5 y 2,6 veces.

Como se mencionó en el Capítulo 5, sólo se ha encontrado en la literatura un método en flujo para la determinación de sulfuro basado en espectrofotometría en fase sólida [45]. Este método FIA, presenta un límite de detección similar al método propuesto y una frecuencia de inyección más alta, aunque tiene una importante desventaja derivada del uso de resina C₁₈, la cual es empaquetada dentro de la celda de flujo. La operación de empaquetar el material es laboriosa, lenta, engorrosa y requiere habilidad por parte del usuario. Asimismo, la progresiva compactación del material dificulta su uso a largo plazo. Todas estas desventajas son soslayadas con el uso de optrodos de membranas, los cuales aseguran análisis simples, rápidos y fiables como queda demostrado por los bajos valores de RSD obtenidos.

6.3.7 Análisis de muestras

Una de las ventajas más destacadas del método propuesto es la posibilidad de analizar muestras ambientales complejas, aunque contengan material particulado en suspensión, sin necesitar floculación o filtración. El sistema MSFIA-DG-optrodo de membrana fue aplicado a la determinación de niveles traza de sulfuro en muestras de agua de pozo, agua de mar y aguas residuales correspondientes a la salida de una planta depuradora. Las muestras fueron inmediatamente analizadas después de su recolección para evitar la oxidación del analito. La fiabilidad del método fue establecida mediante estudios de recuperación a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg l⁻¹ de sulfuro, como se muestra en la Tabla 6.3. Las recuperaciones variaron dentro del rango 96-115 %, indicando que no ocurre una oxidación apreciable a sulfato durante los análisis.

Tabla 6.3. Determinación de sulfuro en muestras de agua de interés ambiental y agua residual, mediante el método MSFIA– DG –optrodo propuesto.

Muestra	Adicionado ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Recuperación (%)
Agua de mar	0	< LD	---
	50	51 ± 3	102
	200	191 ± 1	96
	400	392 ± 3	98
Agua de pozo	0	109 ± 5	---
	50	158 ± 1	98
	100	219 ± 9	110
	200	313 ± 4	102
Agua residual	0	275 ± 1	---
	50	333 ± 7	115
	100	381 ± 1	105
	200	480 ± 7	102

Los resultados están expresados como la media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

6.4. Conclusiones

El sistema MSFIA que combina la separación en línea por difusión gaseosa con un sensor de reflectancia difusa por fibra óptica, el cual implementa una pre-concentración en fase sólida sobre membrana, proporciona un método robusto, selectivo y sensible para el análisis de muestras con matrices complejas no tratadas.

El método propuesto fue satisfactoriamente aplicado a la determinación de sulfuro en muestras de agua y aguas residuales. El sistema óptico miniaturizado basado en LED's con capacidad de separación y pre-concentración, es adecuado para realizar determinaciones de campo y monitorizar sulfuro en tiempo real. Además, debido a que el sistema se basa en la técnica MSFIA, se obtienen ventajas tales como compactibilidad, versatilidad

y bajo consumo de muestra y reactivos, lo cual conduce a una mínima generación de desechos. Asimismo, este sistema MSFIA es capaz de realizar un gran número de operaciones analíticas (carga de muestra, mezcla de muestra y reactivos y lavado del sistema de flujo) con sólo dos válvulas solenoides adicionales, las cuales también evitan que las disoluciones de lavado sean dispensadas a través de la membrana de adsorción.

7

SISTEMA MSFIA INTELIGENTE PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS CON ALTA VARIABILIDAD EN LA CONCENTRACIÓN DE SULFURO*

7.1. Introducción

La química analítica moderna requiere el procesamiento rápido de datos asociado a metodologías analíticas simples y fiables, con el objeto de cubrir las necesidades presentes en el control y monitorización de parámetros ambientales [3]. El progreso de la instrumentación junto con el desarrollo de programas específicos, han permitido la completa automatización del análisis químico [6]. Un avance reciente en este campo es el desarrollo de sistemas inteligentes (*smart systems*), los cuales son capaces de elegir por si mismos la mejor estrategia para cuantificar un analito mediante respuestas binarias, tales como si/no, ausente/presente o menor/mayor que un valor umbral pre-establecido. Estos sistemas están definidos dentro del campo de la inteligencia artificial como programas de ordenador en los cuales el usuario introduce una habilidad específica a la aplicación, la cual es tenida en cuenta para

* L. Ferrer, J. M. Estela, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 573-574 (2006) 391.

(Ver Anexo)

implementar modificaciones eventuales en el transcurso de las subsiguientes etapas analíticas [77-79].

Los sistemas automatizados basados en metodologías de flujo permiten realizar análisis rápidos, minimizando la manipulación de la muestra y a la vez reduciendo el consumo de muestra y reactivos, con la concomitante reducción de desechos [1]. En los últimos años, los sistemas inteligentes basados en técnicas de análisis en flujo, tales como FIA o SIA, han sido desarrollados tanto para la determinación de parámetros ambientales [80-82], el control de procesos industriales [83], como para el control de alimentos [79,84]. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha desarrollado un sistema inteligente basado en la técnica MSFIA para la determinación y especiación de hierro [85].

Las técnicas de separación juegan un papel importante en la aplicación de métodos analíticos con el objeto de aislar al analito y eliminar los compuestos interferentes. Entre las técnicas de separación basadas en membranas, la difusión gaseosa (DG) en combinación con sistemas de flujo facilita la determinación selectiva y automatizada de compuestos volátiles [6,58]. Al aplicarse la técnica DG se logra el aislamiento en-línea de la especie de interés mejorando la selectividad del método analítico, y a su vez también se pre-concentra al analito [59].

Como se mencionó en el Capítulo 1, el sulfuro de hidrógeno se encuentra tanto en aguas naturales y residuales como resultado de la descomposición de la materia orgánica y de la reducción del sulfato mediada por bacterias. Además, es frecuentemente usado como reactivo o generado como sub-producto en procesos industriales. De modo que el ion sulfuro puede ser observado en un amplio intervalo de concentraciones – entre $\mu\text{g l}^{-1}$ y mg l^{-1} – dependiendo del tipo de muestra [37]. Asimismo, diferentes niveles de concentración pueden ser encontrados en el mismo tipo de muestra, tal como ocurre en las aguas residuales [30,37]. Si bien existen métodos para su determinación en muestras de matriz compleja, éstos requieren del pre-tratamiento de la muestra (por ejemplo, floculación de los sólidos en suspensión) [41], y además sólo cubren un estrecho rango de concentraciones.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un sistema inteligente para la monitorización de sulfuro, aplicable a un amplio rango de concentraciones en muestras de matriz compleja sin requerir ningún tratamiento preliminar manual

adicional. El sistema propuesto es capaz de elegir por si mismo el mejor procedimiento para cuantificar el analito, seleccionando la detección espectrofotométrica, la cual incluye tanto la determinación directa o mediante dilución en-línea, o la detección reflectométrica, que involucra una etapa de pre-concentración. El método se basa en la liberación del analito de la muestra no tratada como sulfuro de hidrógeno al canal que contiene al aceptor del módulo de DG y su posterior transformación química según la reacción de Fischer [40]. El colorante azul de metileno así generado es conducido a un optrodo provisto de una membrana C₁₈, registrándose simultáneamente las variaciones en la reflectancia de la membrana debidas a la pre-concentración del colorante, o a una celda de flujo en donde se obtienen las medidas espectrofométricas a altas concentraciones de sulfuro.

7.2. Parte experimental

7.2.1 Reactivos y membranas

Las disoluciones de trabajo de sulfuro se prepararon por adecuada dilución de la disolución madre con NaOH 25 mM. La disolución de trabajo del reactivo cromogénico, DMPD 30 mM, se preparó por adecuada dilución de la disolución madre con HCl 1,5 M. La disolución de trabajo del reactivo oxidante, Fe(III) 30 mM, se preparó por adecuada dilución de la disolución madre con HCl 1,5 M.

El *carrier* fue una disolución de HCl 0,25 M. La corriente aceptora alcalina del módulo de DG fue una disolución de NaOH 10⁻³ M.

Una disolución de metanol 80% (v/v) – HCl 0,01 M fue utilizada como eluyente, el cual a la vez aseguró el adecuado acondicionamiento de la membrana. Este reactivo fue previamente desgasificado en baño de ultrasonidos.

Una membrana Durapore (PVDF) con un tamaño de poro de 0,22 µm y 125 µm de espesor (Millipore, Bedford, MA, USA, Ref. GVHP29325) fue

utilizada para la separación física de las corrientes dadora y aceptora del módulo de DG.

Los discos de membrana Empore® (3M, St. Paul, MN, USA, Ref. 2215), de sílica gel químicamente modificada con grupos octadecilos (C₁₈) de 0,5 mm de espesor fueron cortados en pequeños discos con un diámetro de 9 mm para ser empleados en la celda de flujo optródica construida en el laboratorio (Capítulo 2).

7.2.2 Instrumentación

El sistema MSFIA utilizado para la determinación espectrofotométrica / reflectométrica de sulfuro se muestra en la Figura 7.1. Se utilizaron dos módulos multijeringa (Crison, Barcelona, España) para la impulsión de líquidos. Uno de ellos fue equipado con cuatro jeringas (Hamilton, Suiza) S1-S4 de 1, 1, 5 y 5 ml, respectivamente, mientras que el otro módulo multijeringa fue equipado con cuatro jeringas S5-S8 de 1, 10, 10 y 5 ml, respectivamente. El sistema incluyó cuatro válvulas solenoides adicionales (Takasago, Japón), V9-12, las cuales permitieron el desarrollo completo del protocolo analítico. La válvula V9 dirigió la zona aspirada desde el muestreador (Crison) al bucle de carga, después de lo cual el flujo fue invertido y el segmento aspirado fue conducido hacia el sistema. La válvula V10 permitió la dilución de la muestra. Por su parte, la válvula V11 permitió la dilución de los reactivos para ser usados en la determinación mediante optrodo, mientras que la válvula V12 permitió la desviación del azul de metileno formado hacia la celda de flujo o hacia el optrodo. Además, V12 permitió realizar las operaciones de inicialización del sistema y el lavado de las líneas de flujo sin dispensar disoluciones a través de la membrana del optrodo.

Los bucles y la tubería fueron hechos de tubos de 0,8 mm de diámetro interno, excepto el bucle de carga, el cual fue de 1,5 mm de diámetro interno. La longitud del bucle de carga (BC) fue de 400 cm, mientras que los bucles de reacción anudados (BR-1, 2, 3, 4, 5 y 6) fueron de 600, 200, 130, 50, 50 y 180 cm, respectivamente.

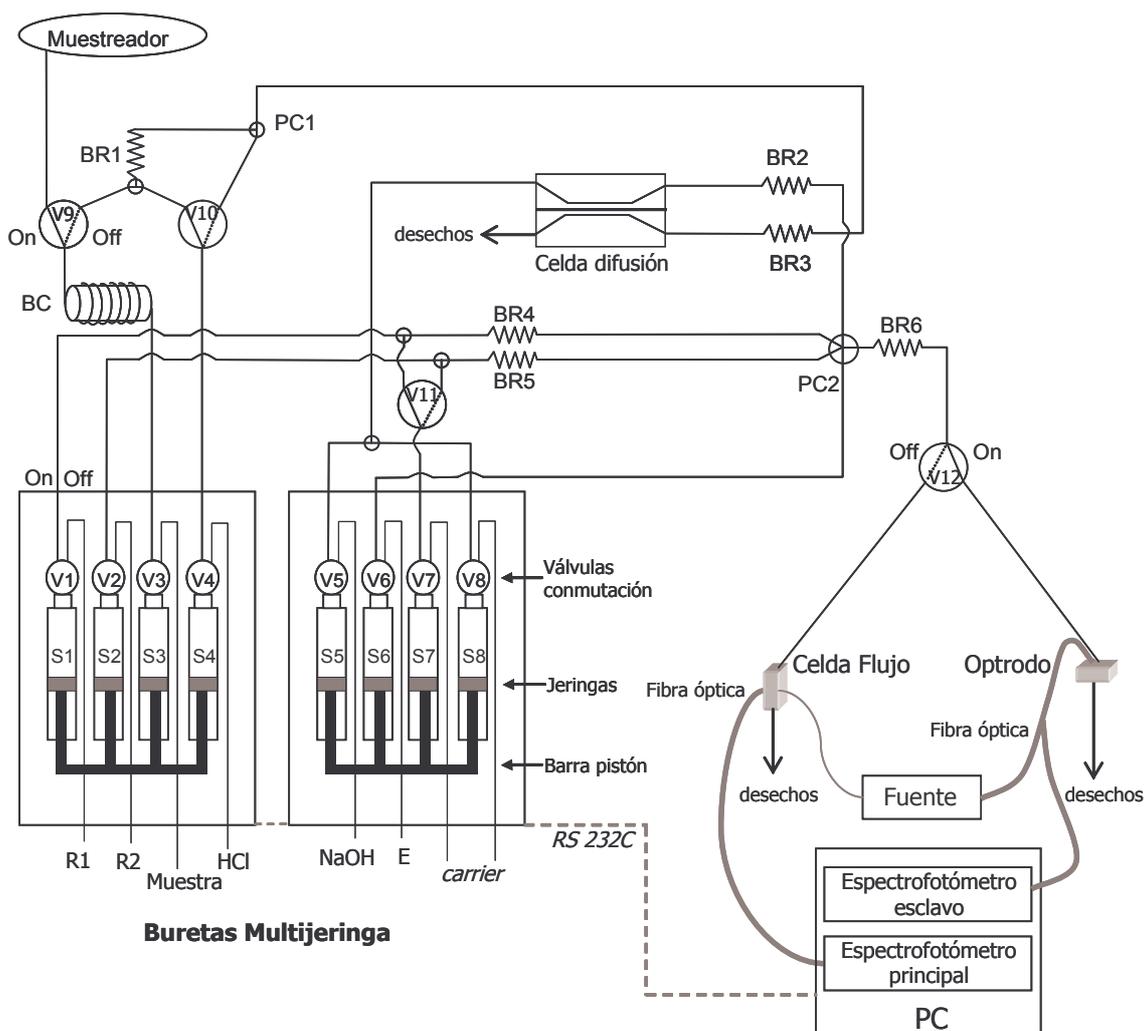


Figura 7.1. Esquema del sistema MSFIA inteligente para la determinación automatizada de sulfuro.

El módulo de DG y el optrodo utilizados para la realización de este trabajo se encuentran descritos detalladamente en el Capítulo 2.

El detector óptico miniaturizado está formado por dos espectrofotómetros CCD PC-plug-in, una tarjeta principal y una tarjeta esclava PC 2000 A/D (Ocean Optics, Dunedin, FL) insertadas en dos ranuras del ordenador. El espectrofotómetro principal se conectó a una celda de flujo de vidrio de 10 mm de camino óptico y 36 μl de volumen, mediante una fibra óptica simple (Ocean Optics) de 400 μm de diámetro.

El espectrofotómetro esclavo se conectó a una celda de flujo óptica (Sciware) a través de uno de los brazos de una fibra óptica bifurcada (Ocean Optics) de 400 μm de diámetro.

La fuente de luz estuvo constituida por un diodo emisor de luz (diodo rojo, 15 mA de intensidad máxima, banda espectral de 600 – 700 nm) y un diodo emisor de luz láser (diodo rojo, 75 mA de intensidad máxima, banda espectral de 620 – 700 nm) para la celda de flujo y el optrodo, respectivamente, junto con una fuente de suministro de energía de intensidad ajustable (Sciware). La longitud de onda seleccionada para determinar el azul de metileno fue de 666 nm.

El control instrumental, la adquisición y el procesamiento en línea de los datos de reflectancia difusa y absorbancia fueron realizados con el programa AutoAnalysis 5.0.

7.2.3 Procedimientos

Los procedimientos automatizados para el sistema desarrollado pueden resumirse como sigue (Tabla 7.1):

- ✓ Inicialización del sistema: se cargan las jeringas con las correspondientes disoluciones (paso1).

- ✓ Procedimiento directo: el BC se carga con 3ml de muestra mediante la activación de la válvula V9 (paso 2). Los segmentos de muestra y disolución ácida son impulsados hasta el PC1. Después de posicionar las disoluciones a las entradas del módulo DG, las corrientes dadora y aceptora son simultánea y continuamente impulsadas en contracorriente (paso 3) a un caudal total de 1,8 y 0,18 ml min^{-1} para la corriente dadora y aceptora, respectivamente. En este paso, el sulfuro de hidrógeno formado es desplazado de la corriente dadora y atrapado dentro de la aceptora como sulfuro. El segmento líquido aceptor así enriquecido se conduce hasta el BR2. El espectrofotómetro principal comienza la adquisición de datos a una frecuencia de lectura de 1 Hz. Seguidamente, el segmento enriquecido y los reactivos se mezclan en el BR6, teniendo lugar la

reacción de Fischer (paso 4). La válvula V12-Off dirige el azul de metileno formado hacia la celda de flujo. Por último, un volumen de *carrier* es dispensado con el objeto de registrar la señal analítica (paso 5).

✓ Procedimiento de dilución: de acuerdo con la dilución seleccionada, un volumen de muestra será cargado (paso 2) y será completado hasta 3ml con disolución ácida (paso 6). Las válvulas V9 y V10 permiten la dilución de la muestra, la cual es realizada por un procedimiento multiconmutado, intercalando pequeños segmentos de muestra y disolución ácida. El segmento de muestra diluida es colocado en el BR1. A continuación, este segmento sigue los mismos pasos que el procedimiento directo (pasos 3, 4 y 5).

✓ Procedimiento de pre-concentración: el BC se carga con 5 ml de muestra mediante la activación de la válvula V9 (paso 2). Luego, se realiza la separación en línea por DG (paso 3) y el segmento enriquecido se coloca en el BR2. La válvula V11 permite la dilución en línea de los reactivos (1:10) mediante la mezcla de los reactivos con el *carrier* mediante inyección simultánea (paso 7). Los segmentos de reactivos generados en línea son dispensados hasta el PC2. El espectrofotómetro esclavo comienza la adquisición de datos a una frecuencia de lectura de 1 Hz. Luego, el segmento enriquecido y los reactivos se mezclan en el BR6, tomando lugar la reacción de Fischer (paso 8). La válvula V12-On dirige el azul de metileno formado hacia la celda optródica. Por último, un volumen de *carrier* es dispensado en orden de registrar la señal analítica (paso 9). El azul de metileno formado es pre-concentrado sobre una membrana C₁₈ alcanzándose el valor mínimo de reflectancia difusa (máximo de absorbancia aparente – meseta) cuando el segmento entero haya pasado por la membrana. Luego de registrarse la meseta, la disolución eluyente es inyectada para des-adsorber el producto de reacción y acondicionar el disco de extracción antes de comenzar un nuevo ciclo analítico (paso 10).

7.3. Resultados y discusión

7.3.1 Sistema Inteligente

El sistema MSFIA diseñado es capaz de decidir por si mismo que procedimiento aplicar en orden de determinar la concentración de analito (Figura 7.1). Para aplicar el método, se introducen una serie de variables que corresponden a la altura de pico de las mediciones de absorbancia. El sistema ha sido desarrollado con el propósito de realizar el análisis de las muestras sin requerir la intervención del analista y economizar tiempo y reactivos. Es importante destacar que la introducción de los valores de absorbancia o de dilución, es rápida y fácil gracias al programa AutoAnalysis 5.0, el cual trabaja en un entorno *windows*. En este sentido, el método propuesto se basa en condicionales, cuyos valores pueden ser modificados por los usuarios de acuerdo con los requerimientos analíticos (por ejemplo, una dilución 1:10 en vez de una dilución 1:5).

Al inicio, se obtiene un pico mediante el procedimiento directo (Figura 7.2, H1). Si la altura del pico de absorbancia es $>0,95$ unidades de absorbancia (UA), la muestra tiene una alta concentración de sulfuro y el procedimiento por dilución será realizado (por ejemplo, se puede comenzar por una dilución 1:2). Se registra un pico de absorbancia obtenido con el procedimiento de dilución seleccionado (Figura 7.2, H2). Si la altura del pico no es $>0,95$ UA se obtienen más picos con esta dilución y se finalizará el método para esa muestra. En cambio, si la altura del pico de absorbancia es $>0,95$ UA la muestra tiene todavía una alta concentración de sulfuro y otro procedimiento de dilución será realizado (por ejemplo, una segunda dilución 1:5). En este punto cabe destacarse que varias diluciones pueden ser agregadas, tantas como el usuario considere necesarias para cubrir un rango específico de concentraciones. Así, otro pico de absorbancia se registra con la segunda dilución seleccionada (Figura 7.2, H3). En el caso que la altura de pico de absorbancia sea $<0,95$ UA, se obtendrán más picos con esta dilución y el método finalizará para esta muestra. En caso contrario, más diluciones podrían ser agregadas hasta que la determinación de la concentración de sulfuro pueda ser realizada.

En la Figura 7.3 puede verse un ejemplo de la determinación de sulfuro mediante el sistema MSFIA inteligente. Al inicio, se obtiene un pico de absorbancia con el procedimiento directo. Como el valor de absorbancia se halla comprendido entre 0,05 y 0,95 UA, el método procede a obtener dos picos más con el mismo procedimiento.

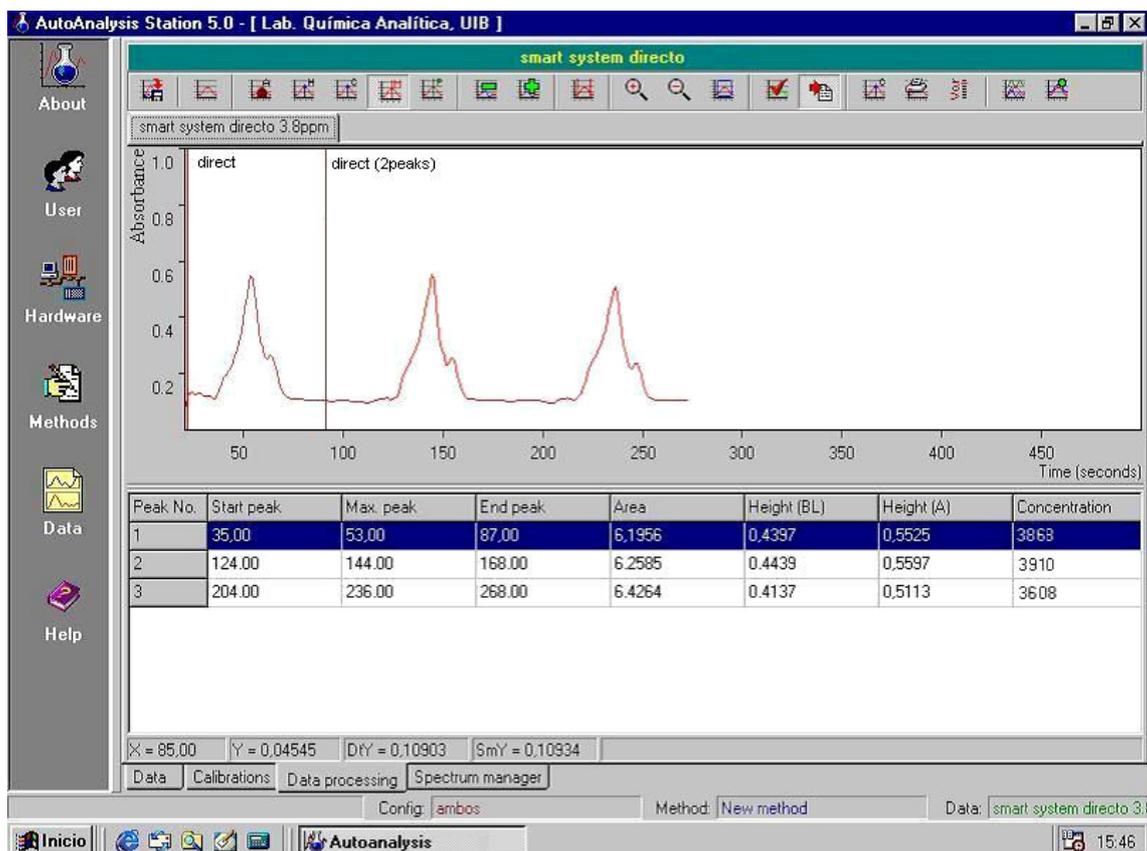


Figura 7.3. Ejemplo de determinación de sulfuro mediante el procedimiento directo. Sulfuro: 3800 µg l⁻¹.

En la Figura 7.4 se muestra otro ejemplo de la determinación de sulfuro mediante el sistema desarrollado. Al inicio, se obtiene un pico de absorbancia con el procedimiento directo. Como el valor de absorbancia es mayor que 0,95 UA, se procede a la obtención de un pico con una dilución 1:2. Se obtiene un pico de absorbancia con el procedimiento de dilución y como el valor de absorbancia se halla comprendido entre 0,05 y 0,95 UA, el método procede a obtener dos picos más con el mismo procedimiento para dar por finalizado el método para esa muestra.

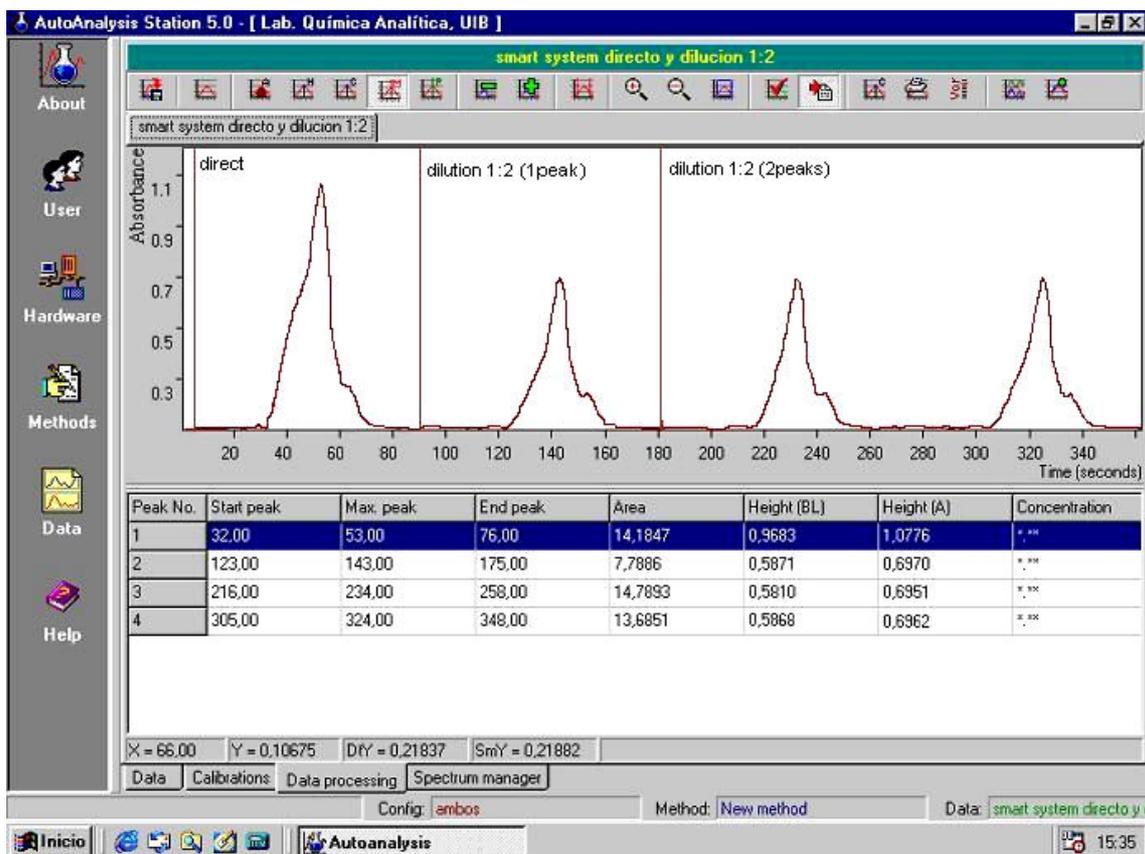


Figura 7.4. Ejemplo de determinación de sulfuro mediante el procedimiento de dilución. Sulfuro: $11500 \mu\text{g l}^{-1}$.

En la Figura 7.5 se puede observar un ejemplo de determinación de sulfuro mediante el procedimiento de pre-concentración del sistema inteligente. Al principio, se obtiene un pico de absorbancia con el procedimiento directo. Como el valor de absorbancia es menor que $0,05 \text{ UA}$ se procede a la obtención de un pico mediante pre-concentración. Como el valor de absorbancia es mayor de $0,05 \text{ UA}$, se obtienen 2 picos más con el mismo procedimiento y se da por finalizada la determinación para esa muestra.

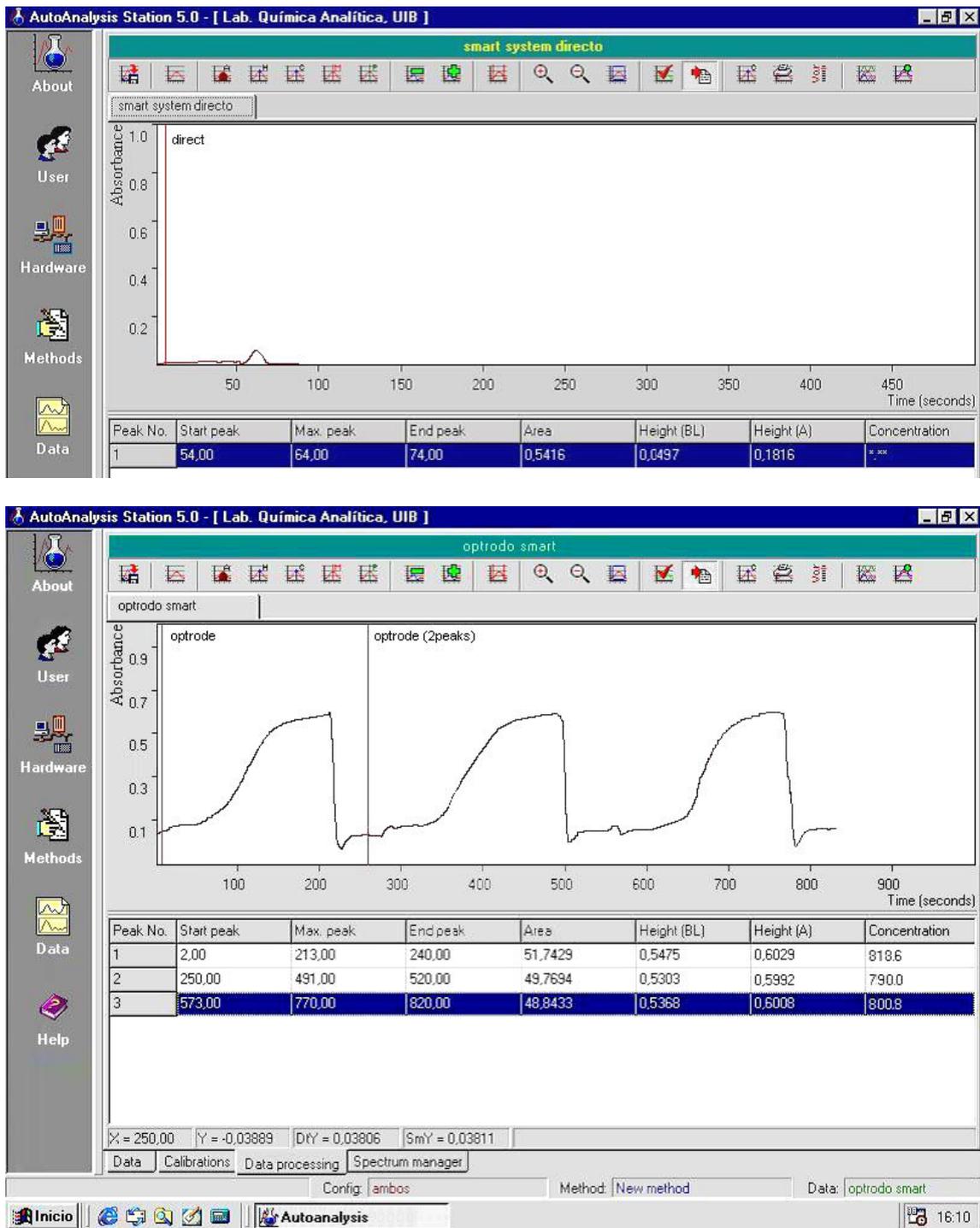


Figura 7.5. Ejemplo de determinación de sulfuro mediante el procedimiento de pre-concentración. La primera ventana corresponde a la determinación directa (espectrofotómetro principal) y la segunda a la determinación optródica (espectrofotómetro esclavo). Sulfuro: $800 \mu\text{g l}^{-1}$.

7.3.2 Optimización de variables experimentales

La influencia de algunas de las variables químicas y físicas que afectan al optrodo de reflectancia difusa (por ejemplo, la concentración de los reactivos y la acidez de los mismos, los volúmenes de muestra y de reactivos, los caudales y la longitud de los reactores) y aquellos que afectan la técnica de DG (por ejemplo, la concentración de ácido para ajustar el pH, la concentración de base de la corriente aceptora y los caudales) fueron estudiados en detalle en los Capítulos 5 y 6.

Sin embargo, algunas de estas variables tuvieron que ser optimizadas nuevamente para el procedimiento por espectrofotometría en celda de flujo, dado que el *manifold* es compartido por 3 procedimientos diferentes.

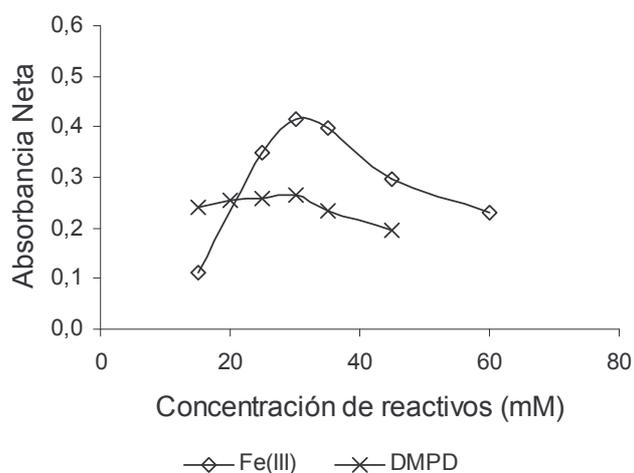
La ventaja de usar reactores anudados en vez de tubería simple ha sido bien establecida en el Capítulo 3. De hecho, los reactores anudados proporcionan mejores condiciones analíticas debido a los flujos secundarios toroidales [53], que mejoran la mezcla radial de los segmentos de reactivos, a la vez que reducen la dispersión axial del segmento de azul de metileno formado. Las longitudes de los bucles de reacción anudados están limitadas por el procedimiento que requiere los reactores más largos.

La bien conocida reacción de Fischer [37,41,42] consiste en el acoplamiento oxidativo de los iones sulfuro con la DMPD para formar el colorante azul de metileno en medio ácido y en presencia de Fe(III). La concentración de los reactivos y de su acidez, se investigaron para el procedimiento directo siguiendo un método univariante (Figura 7.6). El efecto de las concentraciones de DMPD y Fe(III) fue evaluado dentro de los rangos 15–45 mM y 15–60 mM, respectivamente. Una concentración de 30 mM para ambos reactivos logró obtener la mayor señal analítica. Respecto a la influencia de la acidez, no se encontraron diferencias significativas dentro del rango 1,4–3,0 M de HCl para ambos reactivos. De modo que se fijó la concentración de ácido en 1,5 M de HCl.

Debido a la incapacidad del sistema para corregir espectrofotométricamente las señales del efecto Schlieren, los efectos provocados por los cambios en el índice de refracción en la parte frontal del pico pudieron reducirse en gran medida con la elección adecuada de la

composición del *carrier*. Así, la corriente portadora o *carrier* debe tener una concentración de 0,25 M de HCl en orden de igualar el efecto sobre el índice de refracción de la concentración de ácido presente en el segmento de azul de metileno.

a)



b)

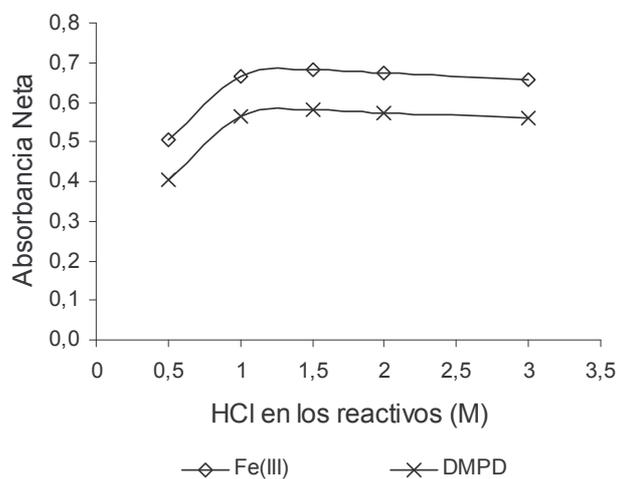


Figura 7.6. Optimización de las variables químicas para el procedimiento espectrofotométrico. a- Concentración de los reactivos. b- Concentración de HCl en los reactivos. Sulfuro: $5000 \mu\text{g l}^{-1}$.

Los volúmenes de muestra y reactivos usados en el procedimiento espectrofotométrico directo fueron ajustados con el fin de cubrir un rango de trabajo lineal por encima de los $1000 \mu\text{g l}^{-1}$. Por lo tanto, 3 ml de muestra y 0,24 ml de reactivo en total fueron necesarios para establecer dicho procedimiento.

El caudal de flujo de la etapa de generación del azul de metileno se estudió dentro del intervalo $2 - 6 \text{ ml min}^{-1}$ ($0,18 - 0,5 \text{ ml min}^{-1}$ para S1) (Figura 7.7). La señal analítica disminuyó significativamente con caudales por encima de 3 ml min^{-1} , de modo que el caudal se fijó a 3 ml min^{-1} ($0,25 \text{ ml min}^{-1}$ para S1).

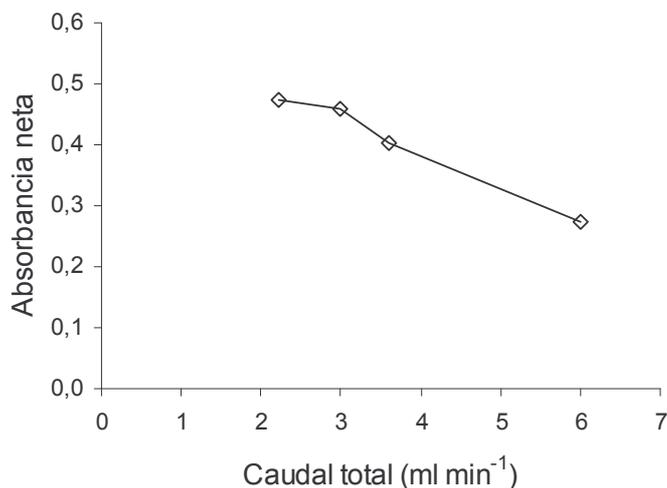


Figura 7.7. Efecto del caudal sobre la señal analítica del procedimiento directo. Volumen de muestra: 3 ml. Sulfuro: $5000 \mu\text{g l}^{-1}$.

7.3.3 Características analíticas del método MSFIA inteligente

Las características analíticas del método optimizado se hallan resumidas en la Tabla 7.2. El sistema desarrollado comprende dos rangos lineales de trabajo que varían entre 50 y $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ y entre 500 y $10000 \mu\text{g l}^{-1}$ de sulfuro para los procedimientos optróptico y espectrofotométrico, respectivamente. Si

bien las medidas de reflectancia difusa están caracterizadas por rangos lineales extremadamente estrechos, inherentes a la función de Kubelka-Munk [67], el intervalo de calibración del procedimiento optródico en este trabajo resultó particularmente amplio y comparable al de otros ensayos espectrofotométricos (Capítulo 3). Esto puede ser explicado por el hecho que las señales analíticas se trataron como absorbancia aparente [67] gracias a la aplicación satisfactoria de la ley de Lambert-Beer.

El límite de detección del sistema (LD: $4,6 \mu\text{g l}^{-1}$), correspondiente al procedimiento de pre-concentración, fue calculado como $3s_b/S$, donde s_b es la desviación estándar de diez medidas del blanco y S es la pendiente de la curva de calibración [55,56].

La repetitividad se calculó a partir de diez medidas independientes y consecutivas de patrones de sulfuro de 500 y $5000 \mu\text{g l}^{-1}$ para los procedimientos optródico y espectrofotométrico, respectivamente. La robustez fue evaluada como el coeficiente de variación obtenido de analizar medidas obtenidas en siete días de trabajo, de patrones de sulfuro de 500 y $5000 \mu\text{g l}^{-1}$ para los procedimientos optródico y espectrofotométrico, respectivamente.

Tabla 7.2. Características analíticas del sistema MSFIA inteligente.

Parámetro Analítico	Procedimiento optródico	Procedimiento espectrofotométrico
Límite de Detección ($\mu\text{g l}^{-1}$)	4,6	37,5
Sensibilidad ($\text{l } \mu\text{g}^{-1}$)	$6,0\text{e-}4 \pm 1,2\text{e-}5$	$9,0\text{e-}5 \pm 1,1\text{e-}6$
Coefficiente de Correlación (r) (n=7)	$0,9992 \pm 0,0001$	$0,9972 \pm 0,0010$
Rango Lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	50 - 1000	500-10000
Repetitividad (%) (n=10)	2,1 ^a	3,6 ^b
Reproducibilidad (%) (n=7)	2,2 ^a	4,5 ^b
Frecuencia de Inyección / h^{-1}	5	8

^a $500 \mu\text{g l}^{-1}$ sulfuro.

^b $5000 \mu\text{g l}^{-1}$ sulfuro.

7.3.4 Análisis de muestras

Con el objetivo de establecer las potencialidades del sistema experto se llevó a cabo la determinación de sulfuro en muestras con una elevada variabilidad en la concentración del analito. De modo que se analizaron muestras de agua residual de diferentes etapas de su tratamiento en la planta depuradora y muestras de agua de pozo. Los resultados se muestran en la Tabla 7.3.

La aplicación de los sistemas de flujo desarrollados hasta el momento a la monitorización de la calidad del agua, presenta algunas desventajas como la filtración previa de la muestra o el uso de calibraciones que involucran una relación no-lineal entre concentración y absorbancia para altas concentraciones [86]. Estos inconvenientes son soslayados por el método propuesto, ya que no se requiere pre-tratamiento de las muestras y las calibraciones son siempre dentro de un rango de trabajo lineal, aún a altas concentraciones.

La fiabilidad del método se evaluó mediante ensayos de recuperación. Las recuperaciones obtenidas para las muestras analizadas se hallaron entre 99 y 104 %, indicando que no se produce una significativa oxidación a sulfato durante el análisis debido al ambiente aislado del analizador. Estos resultados también demuestran que no existen interferencias multiplicativas de la matriz. En este sentido, el uso de la técnica de DG aumenta la selectividad de la metodología analítica debido a que los compuestos iónicos quedan completamente excluidos y las muestras coloreadas y turbias pueden ser analizadas directamente [1]. Con estos resultados se demuestra que el analizador MSFIA inteligente está capacitado para la monitorización de un amplio rango de concentraciones de sulfuro, aún en muestras de alta complejidad tales como las de agua residual.

Las muestras fueron inmediatamente analizadas después de su recolección para prevenir la oxidación del analito.

Tabla 7.3. Determinación de sulfuro en muestras con alta variabilidad en la concentración del analito, sin pre-tratamiento mediante el método MSFIA inteligente.

Muestra	Procedimiento	Adicionado ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Recuperación (%)
Agua residual (entrada)	Dilución en línea*	---	35222 ± 1109	---
	"	25000	59972 ± 524	99
Agua residual (tratamiento 2°)	Directo	---	8215 ± 246	---
	"	1000	9255 ± 231	104
Agua residual (salida)	Optrodo	---	280 ± 1	---
	"	200	486 ± 2	102
Agua de pozo #1	Directo	---	595 ± 17	---
	"	5000	5766 ± 62	103
Agua de pozo #2	Optrodo	---	111 ± 2	---
	"	200	313 ± 5	102

Los resultados están expresados como el promedio de tres réplicas \pm la desviación estándar.

*Factor de dilución 1:10.

7.3.5 Comparación con sistemas previos: ventajas del sistema MSFIA inteligente

Comparando el sistema propuesto con los diferentes sistemas de flujo descritos en la literatura para la determinación de sulfuro basadas en el método del azul de metileno utilizando detección espectrofotométrica o reflectométrica [42,45,47,54,57], incluyendo los sistemas previos MSFIA descritos en los Capítulos precedentes, pueden destacarse las siguientes características (Tabla 7.4):

- ✓ La ventaja más importante del sistema inteligente es su capacidad para seleccionar por sí mismo la mejor estrategia para determinar el analito sin ninguna intervención del analista, cubriendo un amplio rango de concentraciones de sulfuro en las muestras debido a que contempla procedimientos directo, de pre-concentración y de dilución (entre $4,6 \mu\text{g l}^{-1}$ y 100 mg l^{-1}). Las otras metodologías existentes basadas en el método del azul de metileno, sólo abarcan un estrecho rango de concentraciones, siendo por lo tanto, útiles sólo para un tipo específico de muestras.

- ✓ Debido al uso de la DG como técnica de separación en línea, el sistema desarrollado es capaz de analizar muestras de agua sin tratar aunque posean una matriz compleja y sin requerir ningún tratamiento previo adicional de la muestra, característica que presenta un sistema FIA, que involucra la separación por permeación [42]. Sin embargo, su rango lineal ($0\text{--}3000 \mu\text{g l}^{-1}$ sin pre-concentración y $1\text{--}10 \mu\text{g l}^{-1}$ con pre-concentración) es más estrecho que el del método propuesto y requiere de la intervención del analista para decidir el mejor procedimiento para cuantificar el analito.

- ✓ El método MSFIA propuesto evita el uso de reactivos agresivos, tal como H_2SO_4 9 M utilizado por el método FIA antes mencionado [42]. Además, el consumo de reactivos es más bajo respecto de éste y otros métodos FIA. Por ejemplo, el consumo de DMPD es entre 6 y 72 veces menor, el de Fe(III) es entre 16 y 500 veces menor, y el ahorro de HCl es de aproximadamente unas 2,8 veces [42,45]. En este sentido, cabe destacar que el sistema MSFIA, al igual que el SIA, sólo dispensa volúmenes de muestra y reactivos sólo cuando son necesarios, mientras los sistemas FIA y FIA-reverso usan una corriente continua (Tabla 7.4). Teniendo en cuenta el bajo consumo de reactivos alcanzado por las técnicas de multi-conmutación, éstas pueden ser consideradas como una alternativa más respetuosa con el medioambiente que el FIA convencional.

- ✓ Si se compara el procedimiento optróptico del sistema MSFIA inteligente con un método FIA basado en detección reflectométrica recientemente publicado [45], el MSFIA tiene la ventaja de usar membranas de extracción. El

uso de membranas en las celdas optródicas soslaya los inconvenientes derivados del uso de resinas empaquetadas y permite determinaciones fiables como se demuestra por los bajos valores de RSD obtenidos.

✓ Finalmente, comparando con los sistemas MSFIA previos, los cuales fueron orientados a analizar muestras específicas dentro de un determinado rango de concentraciones, el sistema aquí propuesto se beneficia de ellos, incorporando sus mejores características para desarrollar un analizador de sulfuro totalmente automatizado.

Tabla 7.4. Características analíticas de diferentes técnicas de flujo para la determinación de sulfuro usando el método del azul de metileno.

Método	Límite Detección ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Frecuencia Inyección (h^{-1})	R.S.D. (%)	Volumen muestra (ml)	Consumo de reactivos (mg/inyección)				Desechos (ml h^{-1})	Ref.	
						HCl	H_2SO_4	DMPD	Fe(III)			Metanol
FIA	0,1	1 – 10	5	5	12	788	35	7,2	3,2	---	144	[42]
FIA	1,7	5 – 50	12	4	0,5	77	2208	3,8	15,0	1422	197	[45]
FIA-reverso	500	500 – 5000	48	0,7	2,63	2,1	---	0,04	0,02	---	128	[47]
SIA	40	50 – 2000	60	4	0,15	146	---	0,1	0,2	---	228	[57]
SI-MSFA	40	170 – 1000	38	5,2	0,12	132	---	0,1	0,15	---	129	[54]
MSFIA - DG	30	500 – 20000	13	0,7	0,7	99,2	---	0,3	0,25	---	40	[Cap. 4]
MSFIA - Optrodo + DG	1,3	20-500	5	2,2	5	297	---	0,1	0,03	632	77	[Cap. 6]
Sistema MSFIA - Inteligente	4,6	50-1000	5	2,1	5	332	---	0,1	0,03	948	95	Este trabajo
	---	500- 10000	8	3,6	3	237	---	0,6	0,2	--	109	

7.4. Conclusiones

El sistema MSFIA inteligente totalmente automatizado ha sido desarrollado y aplicado para la determinación de sulfuro de manera directa, con dilución y con pre-concentración de la muestra, con resultados altamente satisfactorios. En este sentido, el sistema propuesto fue capaz de autoajustarse a las diferentes situaciones sin ninguna intervención del analista. Además, se ha comprobado que el método es aplicable a muestras con matriz compleja sin requerir pre-tratamiento adicional.

El sistema inteligente, que combina la separación en línea por DG con un sensor de fibra óptica basado en la pre-concentración en fase sólida sobre membrana y la detección en una celda espectrofotométrica de flujo, permite establecer un método analítico robusto, selectivo y sensible para analizar muestras sin tratar dentro de un amplio rango de concentraciones (entre $4,6 \mu\text{g l}^{-1}$ y 100mg l^{-1}).

8

ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFURO EN MATRICES ACUOSAS MEDIANTE ANÁLISIS EN FLUJO*

8.1. Introducción

La automatización de métodos analíticos basados en el análisis en flujo es en la actualidad un objetivo atractivo dentro del campo de la química analítica, ya que permite realizar de forma eficiente el procesamiento de las muestras [1,6]. Las características más importantes del análisis en flujo con respecto al análisis manual son: la rapidez, la robustez, la versatilidad y el mejoramiento de la selectividad y la sensibilidad de los métodos analíticos mediante el uso de esquemas cinéticos en condiciones químicas controladas [15]. Las ventajas adicionales son el ahorro de muestra y reactivos, utilizando volúmenes dentro del rango de μl a unos pocos ml, la concomitante reducción de la generación de desechos, el bajo coste por análisis y la minimización de la mano de obra requerida [3].

* L. Ferrer, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, TRAC-Trends Anal. Chem. 26 (2007) 413. (Ver Anexo)

Durante las últimas décadas, se han desarrollado diferentes generaciones de sistemas basados en análisis en flujo, tales como el análisis por inyección en flujo (FIA, *flow injection analysis*) [1], el análisis por inyección secuencial (SIA, *sequential injection analysis*) [11,13,16], y más recientemente, el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA, *multisyringe flow injection analysis*) [15,17], el análisis en flujo multiconmutado (MCFIA, *multicommutated flow injection analysis*) [87], el análisis en flujo multibomba (MPFS, *multipumping flow system*) [88] y el análisis lab-on-valve (LOV, *lab-on-valve*) [28,89]. Todas estas metodologías en flujo se acoplan fácilmente a diversos sistemas de detección, basados en la espectrofotometría, la fluorescencia, la espectrofotometría de absorción/emisión atómica, la potenciometría y la amperometría, con diferentes grados de sensibilidad, selectividad y precisión. Un mejor rendimiento analítico se obtiene mediante la implementación de procesos de separación en línea basados en membranas [53,71], tales como la difusión gaseosa, pervaporación o diálisis, así como de procedimientos en línea de pre-concentración [53,64] y de dilución [1], los cuales favorecen el procesamiento de muestras complejas con la mínima intervención del analista.

La determinación del ion sulfuro ha ganado importancia dentro de la comunidad analítica debido principalmente a la toxicidad del sulfuro de hidrógeno [90,91]. El sulfuro de hidrógeno generado tanto en aguas naturales como residuales, puede encontrarse en el ambiente en un amplio rango de concentraciones –entre $\mu\text{g l}^{-1}$ y mg l^{-1} – dependiendo del tipo de muestra. Más aún, pueden observarse diferentes niveles de concentración en la misma matriz de muestra, como por ejemplo en las aguas residuales. Éste es un punto a ser destacado, dado que la mayoría de los métodos en flujo propuestos han sido desarrollados para una matriz de muestra específica en un nivel definido de concentración, y por lo tanto no son directamente aplicables a otras matrices sin pasos manuales adicionales de dilución o pre-concentración. Sin embargo, cabe notar que una gran manipulación de la muestra debe evitarse en orden de minimizar las pérdidas del analito por oxidación o volatilización, y por lo tanto la total automatización de las metodologías en flujo debe ser ventajosamente explotada.

La determinación del sulfuro está descrita en la mayoría de las ramas de la química analítica, utilizando tanto los procedimientos clásicos como los electroquímicos, cromatográficos y combinaciones de ellos. Una revisión bibliográfica reciente describe diversas estrategias analíticas aplicadas a la determinación de sulfuro [37]. Aunque el artículo revisa varias técnicas, la mayoría realizadas manualmente, junto con una variedad de plataformas instrumentales, no presenta una evaluación desde el punto de vista del análisis en flujo automatizado.

En este capítulo se compilan los trabajos más relevantes concernientes a la automatización de la determinación de sulfuro mediante análisis en flujo, publicados desde principios de la década de los 80. El objetivo es discutir las ventajas y desventajas de las diferentes generaciones de análisis en flujo (FIA, SIA y MSFIA) acoplados a varios sistemas de detección, haciendo hincapié en los sistemas de flujo que incluyen tratamientos en línea de la muestra.

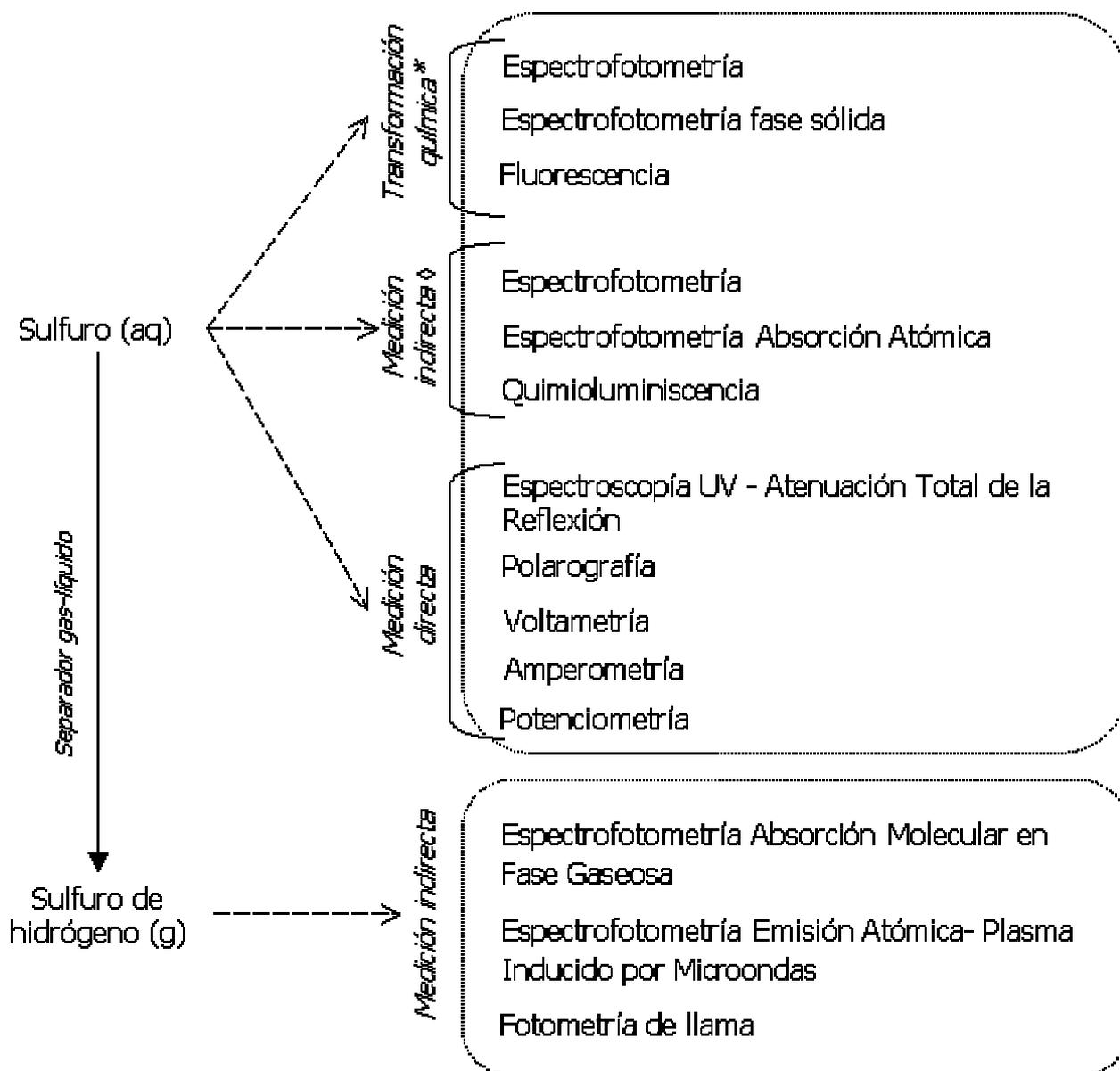
8.2. Sistemas de detección

Existen numerosos sistemas de detección aplicables a la determinación en línea de sulfuro, asequibles en la moderna instrumentación analítica. La mayoría de los sistemas de detección comúnmente utilizados se muestran en la Figura 8.1. Estos métodos en flujo pueden ser clasificados en dos grupos: aquellos que involucran la detección directa de sulfuro y aquellos que requieren la transformación de sulfuro en sulfuro de hidrógeno.

El estudio bibliográfico revela que la espectrofotometría es la técnica instrumental más popular para la detección en línea de sulfuro en muestras ambientales [42,45-47,54,57,92-105]. Sin embargo, los sistemas de flujo han sido también acoplados a otros sistemas de detección, tales como la espectrofotometría de absorción atómica [68], la espectrofotometría de absorción molecular en fase gaseosa [69,106], la espectrofotometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas [107], la fotometría de llama [108], la espectroscopía UV de reflectancia total atenuada [109], la fluorescencia [110,111], la polarografía [112], la amperometría [113-116], la

voltametría [117], la potenciometría [118-120], la valoración coulombimétrica [121] y la detección quimioluminiscente [122-124].

Las características analíticas de los sistemas en flujo discutidos en este capítulo se presentan en la Tabla 8.1. Las particularidades de cada uno de ellos son descritas con más detalle en las siguientes secciones.



*Azul de metileno, Pentacianonitrosilferrato alcalino, Compuestos orgánicos de mercurio, Verde Brillante, Naranja de metilo, Azul de etileno.

◊Detección del ion tri-ioduro o cromato, cadmio y emisión de luz, respectivamente.

Figura 8.1. Estrategias analíticas basadas en técnicas de análisis en flujo para la detección de sulfuro.

Tabla 8.1. Características analíticas de sistemas en flujo para la determinación de sulfuro.

Detección	Técnicas de flujo	Medio de reacción	Muestra / matriz	LD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Rango de trabajo ($\mu\text{g l}^{-1}$)		Separación por membrana	Frecuencia inyección (h^{-1})	Ref.
					inferior	superior			
SP	FIA	aq	NR	1×10^3	1×10^3	$4,5 \times 10^4$	no	210	[46]
SP	FIA	aq	Agua residual	500	500	5×10^3	no	48	[47]
SP	FIA	aq	NR	416	416	$3,2 \times 10^4$	no	~120	[92]
SP	FIA	aq	Industria petrolera	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5$	si	24	[93]
SP	FIA	aq	NR	320	320	---	no	90	[94]
SP	FIA	aq	Agua residual	<1 <0,1	1 1	$2,8 \times 10^3$ 10	si	10 6	[42]
SP	FIA	aq	Industria papelera	1×10^4	2×10^4	1×10^5	no	30	[95]
SP	FIA	aq	Agua de manantial	17	40	2×10^3	no	40	[96]
SP	SIA	aq	NR	180	200	5×10^3	no	~18	[97]
SP	FIA	aq	Industria papelera	680	1×10^3	$1,5 \times 10^4$	si	6	[98]
SP	FIA	aq	Agua residual de granja	$3,7 \times 10^3$	1×10^4	5×10^4	no	30	[99]
SP	FIA	aq	Agua marina termal	13	13	$1,4 \times 10^4$	no	~30	[100]
SPE-SP	FIA	aq	Agua potable	1,7	5	50	si	12	[45]
SP	SIA	aq	Agua dulce intersticial	40	50	2×10^3	no	60	[57]
SP	SI-MSFA	aq	Muestras ambientales	40	170	1×10^3	no	38	[54]
SP	MSFIA	aq	Muestras ambientales	150 90	500 200	5×10^3 2×10^3	no	80 45	[101]
SP	MSFIA	aq	Agua residual	30	500 250	2×10^4 5×10^3	si	13 5	[102]
SPE-SP	MSFIA	aq	Muestras ambientales	2,9	20	200	si	8	[103]
SPE-SP	MSFIA	aq	Muestras ambientales	1,3	20	500	si	5	[104]
SPE-SP	MSFIA	aq	Agua residual	4,6	50	1×10^4	si	8	[105]
AAS	FIA	aq	NR	10	400	$2,4 \times 10^3$	no	100	[68]
GMAS	FIA	gas	Agua residual	130	130	1×10^5	NRQ	90	[106]
GMAS	FIA	gas	Agua de manantial	300	300	1×10^5	NRQ	60	[69]
MIP-AES	FIA	gas	Agua residual	0,1	1	1×10^4	NRQ	~60	[107]
FP	FIA	gas	Muestras ambientales/ industriales	64	64	$1,6 \times 10^4$	NRQ	10	[108]
ATR-UV	FIA	aq	Industria papelera	5×10^5	5×10^5	8×10^6	no	30	[109]
FL	FIA	aq	Muestras ambientales	19	320	$1,6 \times 10^3$	no	24	[110]

FL	FIA	aq	Agua residual artificial	80	750	$1,5 \times 10^4$	no	12	[111]
POL	FIA	aq	Disolución amino-ácidos	59 11	100 18	2×10^3 400	si	1,2	[112]
AM	FIA	aq	NR	0,1 NR	0,2 1	1 1×10^3	si	9 20	[113]
AM	FIA	aq	Muestras ambientales	64	64	$9,6 \times 10^3$	no	42	[114]
AM	FIA	aq	Agua residual	544	640	$3,2 \times 10^4$	no	25	[115]
AM	FIA	aq	Agua termal	0,3	3,2	$3,2 \times 10^4$	no	33	[116]
VOL	FIA	aq	Agua marina	0,02	0,02	88	no	8	[117]
POT	FIA	aq	Agua residual	320	320	NR	no	80	[118]
POT	FIA	aq	NR	320	320	NR	no	60	[119]
POT	FIA	aq	NR	30	100	3×10^4	si	8	[120]
COUL	CFA	aq	Agua residual	64	64	$1,6 \times 10^4$	si	15	[121]
CL	FIA	aq	NR	0,05	0,1	1×10^5	no	30	[122]
CL	FIA	aq	Muestras ambientales	0,6	2	800	no	10	[123]
CL	FIA	aq	Agua de manantial	3,2 2,6	12,8 6,4	320 $3,2 \times 10^3$	no	60	[124]

SP: Espectrofotometría. SPE-SP: Extracción en fase sólida-Espectrofotometría. AAS: Espectrofotometría de Absorción Atómica. GMAS: Espectrofotometría de Absorción molecular en fase gaseosa. MIP-AES: Espectrofotometría de Emisión Atómica Plasma inducido por microondas. FP: fotometría de llama. ATR-UV: Espectroscopía UV – Reflectancia Total Atenuada. FL: Fluorescencia. POL: Polarografía. AM: Amperometría. VOL: Voltametría. POT: Potenciometría. COUL: Valoración Culombimétrica. CL: Quimioluminiscencia.

FIA: Análisis por inyección de flujo. SIA: Análisis por inyección secuencial. SI-MSFA: Análisis por inyección secuencial en flujo monosegmentado. MSFIA: Análisis por inyección en flujo multijeringa. CFA: Análisis en flujo continuo.

LD: Límite de Detección.

NR: No reportado.

NRQ: No requerido.

8.3. Métodos en flujo para la determinación de sulfuro

La mayor cantidad de publicaciones corresponde a sistemas FIA, alrededor del 80%, y el resto a las otras metodologías en flujo. Esto es consecuencia tanto de la sencillez de su implementación, en comparación con los métodos en flujo más recientemente desarrollados que requieren el control de la instrumentación mediante ordenadores, como a la relativa novedad de las otras metodologías en flujo. Además, el FIA ofrece una alta frecuencia de análisis. El envejecimiento y la corta duración de los tubos de las bombas

peristálticas, debido a la utilización de reactivos agresivos y disolventes orgánicos, junto con una baja versatilidad para diseñar sistemas multiparamétricos, son los inconvenientes que presentan los sistemas FIA [125].

Otra de las metodologías en flujo usadas para la determinación de sulfuro es el SIA, que es una técnica muy robusta ya que los reactivos sólo están en contacto con vidrio o tubos de PTFE y por lo tanto se evitan los problemas antes mencionados derivados del uso de tubos flexibles de Tygon®. Además, esta técnica presenta alta versatilidad y proporciona opciones verdaderamente multiparamétricas. Otra ventaja importante del SIA es la reducción drástica del consumo de reactivos. Sin embargo, una clara desventaja es la baja frecuencia de análisis, lo cual es inherente a su naturaleza secuencial.

Observando las nuevas generaciones de métodos en flujo, el MSFIA se presenta como un híbrido de las técnicas antes mencionadas, ya que compila las características más destacables de éstas en términos de frecuencia de análisis, robustez, versatilidad de operaciones y una apropiada interdispersión entre las zonas. Además, al igual que el SIA, pequeños volúmenes de disoluciones son dispensados al sistema solamente cuando son necesarios para el desarrollo de la metodología analítica.

Teniendo en cuenta el bajo consumo de reactivos alcanzado, las técnicas multiconmutadas pueden ser vistas como más respetuosas con el medio ambiente frente al FIA convencional.

En la Figura 8.2 se presentan sistemas típicos FIA, SIA y MSFIA para la determinación de sulfuro. Las características analíticas más relevantes de estos sistemas, utilizando detección espectrofotométrica directa (sin pre-concentración o separación en línea) se muestran en la Tabla 8.2.

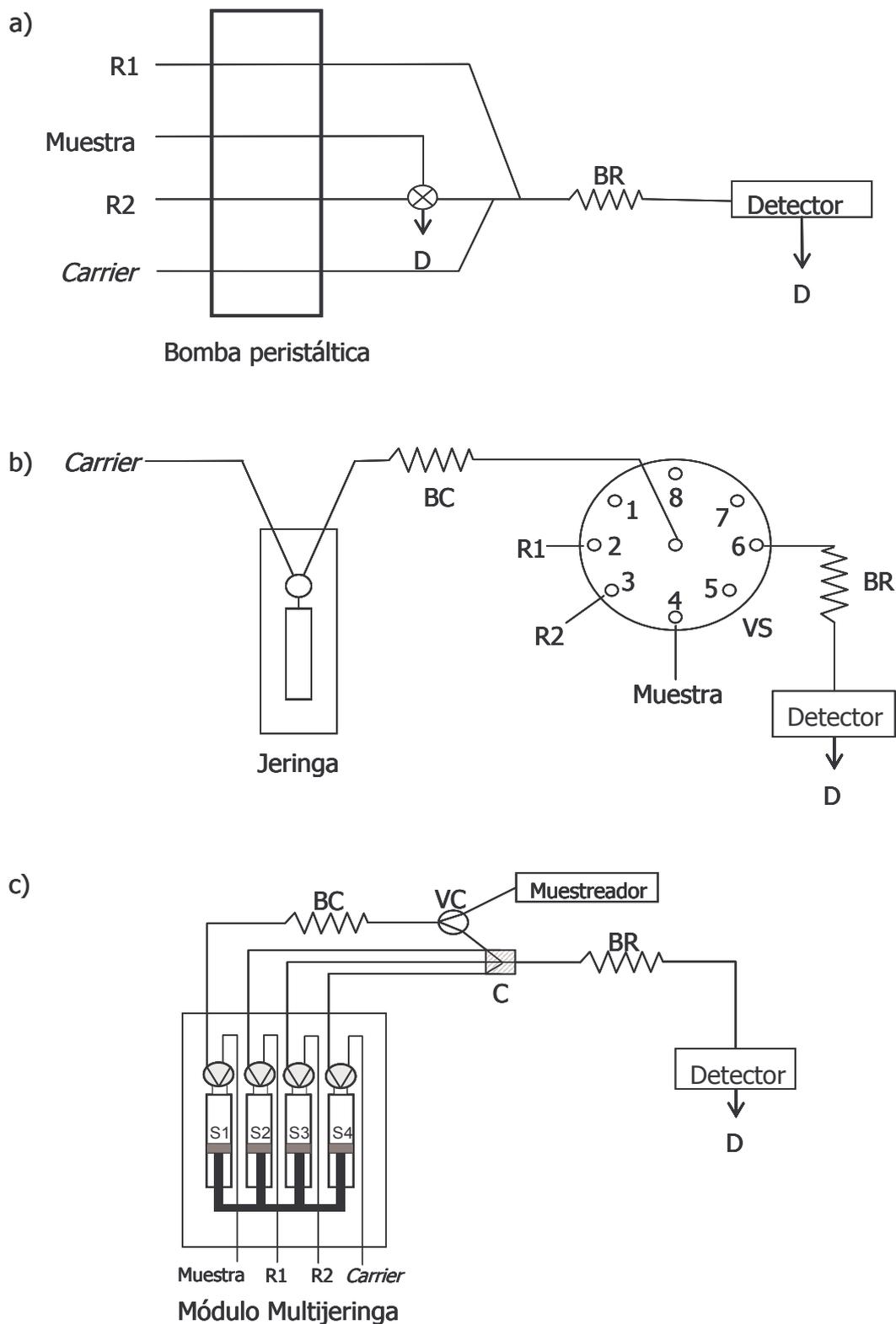


Figura 8.2. Sistemas típicos de análisis en flujo para la determinación de sulfuro. a) Sistema FIA. b) Sistema SIA. c) Sistema MSFIA. R1, R2: reactivos. BR: bucle de reacción. BC: bucle de carga. VS: válvula de selección. VC: válvula de conmutación. C: conector. D: desechos.

Tabla 8.2. Comparación de las características analíticas de diferentes técnicas en flujo para la determinación espectrofotométrica de sulfuro, usando el método de azul de metileno.

	FIA	SIA	MSFIA
Límite de detección (mg l^{-1})	1	0,04	0,15
R.S.D. (%)	3,9	4,0	1,4
Frecuencia de inyección (h^{-1})	210	60	80
HCl en reactivos y <i>carrier</i> (mg/inyección)	105	86	33
Volumen de muestra inyectada (ml)	0,065	0,15	0,20
Desechos (ml h^{-1})	434	228	101
Ref.	[46]	[57]	[101]

8.4. Separación en línea

La volatilidad del sulfuro de hidrógeno provee una manera simple para la separación del analito de matrices complejas [37,71]. Esta característica ha sido explotada en varios sistemas independientemente del detector utilizado, e involucra a los sistemas basados en la producción en línea de sulfuro de hidrógeno.

Una posibilidad es usar separadores gas-líquido, en los cuales la muestra se mezcla con ácido para generar sulfuro de hidrógeno, después de lo cual una corriente portadora de aire o gas introduce el producto gaseoso dentro de una celda de flujo [69,106-108]. Las limitaciones de los métodos manuales en términos de pérdida del analito por volatilización desde la matriz de la muestra, han sido superadas por el análisis en flujo. Realmente, la manipulación del sulfuro de hidrógeno, el cual es extremadamente reactivo, se evita si el análisis

completo se lleva a cabo en un sistema en flujo totalmente cerrado. Además, estos sistemas requieren mínimo tratamiento de la muestra y la mayoría de ellos presentan una frecuencia de inyección aceptable para análisis de rutina. Sin embargo, la sensibilidad de estos sistemas con separación en línea es baja, presentando límites de detección elevados (entre 64 y 300 $\mu\text{g l}^{-1}$). La sensibilidad se mejora significativamente mediante la espectrofotometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas, donde el límite de detección es inferior a 0,2 $\mu\text{g l}^{-1}$ [107].

Los sistemas en flujo son herramientas apropiadas para la implementación de métodos de separación y enriquecimiento basados en membranas, usando difusión gaseosa, pervaporación o diálisis previamente a la transformación química del analito. Aunque estos sistemas pierden la elevada frecuencia de análisis alcanzada por la detección directa (la cual pierde exactitud debido a los efectos interferentes) son capaces de mejorar la selectividad mediante el acoplamiento de métodos de pre-tratamiento en línea de la muestra, los cuales son más lentos (ver Tabla 8.1). La principal ventaja de estos sistemas es su completa automatización dado que no requieren tratamiento manual de la muestra previamente a la determinación [42,93,98,102,104,105,112,113,120,121]. Debido a que la sensibilidad de los métodos de separación por membrana es relativamente baja, la pre-concentración es el procedimiento utilizado para el procesamiento en línea de la muestra cada vez que deben ser determinadas concentraciones a niveles traza, como se discute más adelante.

8.5. Pre-concentración en línea

La extracción en fase sólida puede ser vista como una técnica valiosa de pre-tratamiento de muestra para eliminar la matriz y simultáneamente pre-concentrar al analito. Con el objetivo de determinar concentraciones de unos pocos $\mu\text{g l}^{-1}$ de sulfuro se han desarrollado metodologías en flujo basadas en espectrofotometría en fase sólida, o reflectometría [45,103]. Estos métodos están basados en un optosensor, en el cual se realiza la medición directa de la

atenuación de la luz sobre una superficie sólida después de pre-concentrar el analito previamente transformado, sin requerir de una elución posterior como lo demandan los protocolos de extracción en fase sólida convencional, mejorando así el factor de enriquecimiento [64]. Cabe destacar que aunque estos procedimientos son más lentos debido a los requerimientos de carga y descarga del optrodo, se pueden detectar concentraciones a niveles traza de sulfuro ($\sim 2 \mu\text{g l}^{-1}$) con volúmenes de muestra $< 3 \text{ ml}$.

La pre-concentración en fase sólida del analito difundido en una corriente aceptora ha sido propuesta con el objetivo de compensar la pérdida de sensibilidad de las técnicas de separación por membrana. De este modo, la separación en línea por difusión gaseosa ha sido recientemente acoplada con la pre-concentración con un optrodo, alcanzando un límite de detección de $1,3 \mu\text{g l}^{-1}$ para un volumen de muestra de 5 ml (Capítulo 6) [104].

En las técnicas de separación basadas en membranas, el tiempo de contacto efectivo entre el segmento de muestra y la membrana semi-permeable determina la eficacia en la separación del analito dentro de la corriente aceptora. Por lo tanto, algunos autores han explotado tanto las alternativas de flujo detenido, o de re-circulación o estrategias de flujo invertido [42,102,112,113]. Cabe destacar que el incremento del caudal de la corriente dadora reduce el espesor de la capa difusional, lo cual causa un abrupto gradiente de concentración. Es importante puntualizar que estos métodos acoplados logran la automatización completa y los bajos límites de detección alcanzados por el análisis en flujo con detección espectrofotométrica [42] y con detección amperométrica [113].

8.6. Detección espectrofotométrica

La detección espectrofotométrica basada en el método del azul de metileno es el método más comúnmente adoptado para la transformación química y la determinación en flujo de sulfuro [42,45-47,54,57,100-105] debido a su extrema simplicidad, selectividad y sensibilidad. La reacción involucra el acoplamiento de la NN-dimetil-p-fenilendiamina con sulfuro acuoso en

presencia de un reactivo oxidante como el Fe(III) dando el colorante heterocíclico tiazina. Los sistemas con protocolos de pre-concentración en línea aseguran una mejora en los límites de detección, dentro del rango de $\mu\text{g l}^{-1}$ [42,45,104], que son comparables con aquellos alcanzados por la instrumentación analítica moderna (por ej. espectrometría de emisión atómica de plasma inducido por microondas). La determinación de sulfuro disuelto en matriz acuosa puede verse alterada por los iones metálicos que forman compuestos insolubles [47,101] y su posterior liberación desde los sulfuros metálicos lábiles a ácidos, según el modificador de pH empleado en el sistema [42]. El nitrito ha sido citado como un interferente en la determinación de sulfuro mediante el método del azul de metileno en un sistema FIA-reverso [47], sin embargo la tolerancia a este interferente fue aumentada 10 veces por medio de un sistema MSFIA (Capítulo 3, [101]). Mientras que elevadas concentraciones de sulfito y tiosulfato sólo se han mencionado como débiles interferentes de este método [41,46].

En este sentido, un sistema basado en la separación en línea con membrana, seleccionando cuidadosamente las variables químicas, permitió la discriminación entre sulfuro, polisulfuro, sulfito, tiosulfato y sulfato [93].

Otras reacciones del analito con especies cromogénicas han sido estudiadas, pero ninguna de ellas ha alcanzado la amplia aplicación del método del azul de metileno, con el cual se obtienen los mejores límites de detección. Entre ellas, las siguientes reacciones han sido usadas en sistemas en flujo: pentaciano-nitrosilferrato(II) en medio alcalino [42,93], compuestos órgano-mercuriales en presencia de ditizona [94], ácido nitriloacético con Fe(III) en condiciones amoniacaes [95], verde brillante [96], naranja de metilo [97] y azul de etileno [98]. Estas reacciones están basadas en la transformación química en línea del analito o en los efectos catalíticos del analito sobre la decoloración de colorantes orgánicos.

Por otra parte, el sulfuro también puede ser monitorizado mediante ensayos indirectos. La reducción del yoduro por la azida catalizada por el sulfuro fue seguida espectrofotométricamente mediante la medición del decrecimiento de la señal del tri-yoduro [92]. Otro sistema en flujo utilizó un reactor de fase sólida de cromato Pb(II) donde una reacción de sustitución tiene lugar y se monitoriza espectrofotométricamente la liberación del cromato

[99]. La detección por espectrofotometría de absorción atómica ha sido utilizada para llevar a cabo la medición del exceso de Cd(II) después de realizar la precipitación en línea del sulfuro como sulfuro de cadmio [68]. Tanto el método de determinación indirecta de sulfuro basado en la azida como el del cadmio presentan bajos límites de detección y una elevada frecuencia de análisis.

Las metodologías en flujo basadas en la espectrometría de absorción molecular en fase gaseosa [69,106] pierden sensibilidad ya que sus límites de detección aumentan en un orden de magnitud respecto a la mayoría de los sistemas anteriores. Sin embargo, una característica destacable es la minimización de los potenciales efectos interferentes mediante la implementación de un separador gas-líquido dentro del sistema.

Otros sistemas de flujo que involucran la detección espectrofotométrica pueden destacarse debido a sus características analíticas, tales como el bajo límite de detección alcanzado por el método de espectrofotometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas [107] y la elevada selectividad lograda por la fotometría de llama acoplada a la emisión de llama aire-hidrógeno usando un separador gas-líquido [108], o por los métodos fluorimétricos [110,111].

8.7. Detección electroquímica

Las técnicas electroquímicas acopladas a análisis en flujo comprenden varias categorías: la polarografía, la amperometría, la voltametría y la potenciometría. La determinación polarográfica del sulfuro alcanza límites de detección comparables a aquellos logrados por la espectrofotometría de absorción atómica pero utiliza un elevado volumen de muestra (50 ml) [112].

El acoplamiento de la separación por difusión gaseosa a un procedimiento de pre-concentración con detección amperométrica, mejora la sensibilidad del método en dos órdenes de magnitud y sólo es propenso a la interferencia por cianuro [113].

Un sensor amperométrico basado en el mismo principio que el micro-sensor de oxígeno de Clark se desarrolló para la determinación de sulfuro. El sulfuro de hidrógeno atraviesa la membrana de silicona y es oxidado por el ferricianuro dando lugar a la formación de sulfuro elemental y ferrocianuro. Este último es electrónicamente re-oxidado en un electrodo de trabajo de platino, creando una corriente directamente proporcional a la concentración de sulfuro de hidrógeno. La determinación directa de sulfuro de hidrógeno disuelto permite una alta resolución para la monitorización espacio-temporal. El sensor amperométrico puede ser aplicado bajo condiciones ácidas y bajo condiciones moderadamente alcalinas ($\text{pH} < 8,5$) [114].

La electrocatálisis del sulfuro ha sido explotada mediante análisis en flujo usando una película de acetato de celulosa cubierta con 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI). El método se basa en la reacción redox entre el sulfuro y el DCPI cuando se aplica un potencial bajo. La estabilidad operacional del sensor fue del 88% luego de 10h de operación continua [115].

Un electrodo *screen-printed* estable químicamente modificado ha sido desarrollado recientemente. El método en flujo se basa en el efecto del sulfuro sobre el par redox ferricianuro-ferrocianuro, presentando una elevada sensibilidad y utilizando solamente 20 μl de muestra [116].

Un límite de detección muy bajo también puede lograrse mediante la voltametría. Las limitaciones que presenta el sistema manual debido al enmascaramiento del sulfuro por Hg(II) pueden ser parcialmente superadas mediante el análisis en flujo [117].

Las mediciones potenciométricas se realizaron usando un detector tubular conteniendo membranas homogéneas de sales de plata. Luego de 2 meses de uso o acondicionamiento con disolución *buffer* antioxidante de sulfuro, las curvas de calibración mostraron una desviación de la linealidad similar a los electrodos convencionales. Este efecto puede ser atribuido a la aparición de plata metálica en contacto con la membrana [118].

Un micro-detector diferencial potenciométrico con membranas sólidas intercambiables fue desarrollado para lograr mayor estabilidad, dado que utilizan dos membranas similares. El detector puede usarse por un largo período operacional (5-6 meses) sin requerir ninguna etapa de regeneración auxiliar [119].

El acoplamiento de la detección potenciométrica con un procedimiento de pervaporación en línea dio lugar a un método libre de interferentes con una aceptable frecuencia de inyección [120].

Por último, un sistema en flujo de valoración coulombimétrica acoplado a separación en línea por diálisis, en el cual el punto final se determinó por amperometría o quimioluminiscencia, permitió la determinación selectiva de sulfuro. El método no es muy sensible y posee una moderada frecuencia de análisis [121].

8.8. Detección quimioluminiscente

Los analizadores en flujo quimioluminiscentes proveen una manera económica y sensible para determinar sulfuro. Concentraciones traza de sulfuro pueden determinarse mediante la medición de la luz emitida por la oxidación del analito catalizada por peroxidasa [122]. Este método es altamente sensible y el efecto interferente del sulfito se redujo en gran medida por la adición de formaldehído como agente enmascarante.

Otra reacción quimioluminiscente muy sensible implementada en un sistema en flujo involucra el uso de luminol y peróxido de hidrógeno en disolución alcalina [123]. El efecto interferente causado por los iones metálicos de transición, por ej. Fe(III), Fe(II), Cr(III) y Co(II), fue eliminado acoplando procesos en línea de intercambio catiónico. Este método tiene un bajo límite de detección ($0,6 \mu\text{g l}^{-1}$) aunque la frecuencia de análisis es baja. El mecanismo de reacción implica la reducción del oxígeno disuelto al radical aniónico superóxido en disolución alcalina por el sulfuro y los compuestos con grupos tioles. En presencia de peróxido de hidrógeno, el radical aniónico superóxido producido genera el radical hidroxilo, el cual es usado como co-oxidante por el sistema peróxido de hidrógeno-luminol para generar quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia generada durante la reacción del sulfuro tanto con la N-bromosuccinimida como con la N-clorosuccinimida en medio alcalino constituye la base para la determinación rápida y sensible del analito. La intensidad de emisión es aumentada en ambos sistemas si la

diclorofluoresceína y la fluoresceína respectivamente son adicionadas al medio de reacción [124]. Los límites de detección fueron similares en ambos sistemas propuestos (ver Tabla 8.1) y los dos presentan una elevada frecuencia de inyección. La interferencia del sulfito y tiocianato se eliminaron por adición de formaldehído. El amonio también causa interferencias en estos métodos.

8.9. Sistemas inteligentes para la monitorización de sulfuro

Aunque el concepto de análisis en flujo involucra la automatización parcial o total de un sistema, el rango de concentraciones de aplicación es generalmente estrecho y sólo apropiado para un tipo de muestra determinado. Como consecuencia, un pre-tratamiento manual de la muestra es frecuentemente necesario en orden de adecuar el contenido de sulfuro al rango de trabajo lineal. Por ejemplo, un sistema totalmente automatizado acoplado a un detector espectrofotométrico UV de reflectancia total atenuada, aplicado a la monitorización en-línea para el control de procesos en la industria papelera, ha sido desarrollado sólo para la determinación de elevadas concentraciones de sulfuro [109].

Para solventar este problema, un sistema inteligente MSFIA totalmente automatizado capaz de elegir por si mismo la mejor estrategia analítica para cuantificar al analito de acuerdo al nivel de concentración en la muestra sin necesidad de intervención del analista ha sido recientemente desarrollado (Capítulo 6) [105]. El sistema propuesto permite la monitorización de sulfuro en un amplio rango de concentraciones, ya que implementa protocolos en línea de dilución o pre-concentración de la muestra acorde a los requerimientos de la misma. El método realizado en formato multiconmutado, combina la separación con membrana tanto con reflectancia difusa sobre superficies sólidas como con espectrofotometría convencional. El sistema inteligente está capacitado para evaluar la magnitud de las variables definidas por el usuario y tomar decisiones en base a ellas. Como resultado, grupos de muestras ambientales y de agua residual no tratadas con una amplia variabilidad en la concentración de sulfuro ($4,6 \mu\text{g l}^{-1}$ – 100mg l^{-1}) pueden ser analizadas en línea.

8.10. Conclusiones

De la discusión anterior y los datos compilados en la Tabla 8.1, se desprende que una gran cantidad de métodos automatizados son capitalizados por la primera generación de análisis en flujo. El gran uso del FIA se atribuye a la fácil construcción del *manifold*, sin la necesidad de un programa de control especializado. En términos de detección, la espectroscopía molecular permanece como la técnica más popular abarcando las dos terceras partes de los trabajos incluidos en la Tabla 8.1. Respecto a la instrumentación analítica moderna, los espectrofotómetros basados en fibra óptica son económicos y ofrecen la capacidad de mediciones in situ debido a su tamaño miniaturizado y portabilidad.

Además, un gran número de sistemas en flujo publicados en la última década incluye la separación y pre-concentración del analito para lograr una apropiada selectividad y sensibilidad del método. De este modo, los efectos interferentes, especialmente aquellos debidos a los compuestos de sulfuro, pueden ser minimizados en gran medida. Los procedimientos de pre-concentración son usualmente acoplados a la detección espectrofotométrica, mientras que una alta sensibilidad es asegurada mediante detección voltamétrica, amperométrica y quimioluminiscente sin necesidad de protocolos de enriquecimiento de la muestra. La dilución es escasamente realizada en línea, lo cual impide la total automatización del método.

Una tendencia emergente en química analítica es el desarrollo de sistemas inteligentes, utilizando procedimientos controlados por ordenador, los cuales son fácilmente adaptables a mediciones sin atención del analista.

CONCLUSIONES

Las posibilidades de la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) han quedado demostradas y se ha aplicado a la determinación de sulfuro en muestras ambientales y aguas residuales.

Se han desarrollado sistemas automatizados totalmente controlados por ordenador, robustos y fiables, características que han sido evaluadas mediante la aplicación de métodos de contraste y ensayos de recuperación y las mediciones de la reproducibilidad. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron satisfactorios en todos los casos, indicando que no hay pérdidas significativas de sulfuro durante el análisis automático, ni interferencias debidas a la matriz de la muestra.

Un sistema MSFIA acoplado con un procedimiento de separación en línea por membrana con detección espectrofotométrica, fue satisfactoriamente aplicado a la determinación de sulfuro en muestras complejas, tales como las aguas residuales, las cuales contienen sólidos en suspensión, sin ningún tratamiento previo. En comparación con otros métodos de análisis en flujo, se alcanzan similares sensibilidades, ya que la pérdida generada por la difusión gaseosa es compensada por la inversión de flujo en el sistema MSFIA-DG. Esta inversión del flujo permitió un aumento en la sensibilidad mayor de 5 veces, respecto al sistema sin inversiones de flujo. De este modo, la

sensibilidad del método MSFIA-DG puede ser fácilmente adaptada a los requerimientos del análisis, lo cual es un punto sumamente importante para las muestras de agua residual teniendo en cuenta la gran variación del contenido de sulfuro que presentan. Además, con el método propuesto se logra una alta selectividad debida al uso de la técnica de separación por membrana.

El potencial de la técnica MSFIA con un sensor de fibra óptica de reflectancia difusa acoplado, para la implementación de esquemas de pre-concentración en fase sólida basada en discos de membrana, ha sido demostrado y aplicado a la determinación de trazas de sulfuro en muestras de agua ambientales y agua residual. Además, este sistema MSFIA es capaz de realizar una multitud de operaciones analíticas, tales como la carga de muestra, mezcla de reactivos/muestra y enjuague del sistema de flujo, con sólo dos válvulas solenoides auxiliares, las cuales adicionalmente evitan que las disoluciones de lavado sean bombeadas a través de la zona de adsorción.

El sistema MSFIA que combina la separación en línea por difusión gaseosa con un sensor de reflectancia difusa por fibra óptica, el cual implementa una pre-concentración en fase sólida sobre membrana, proporciona un método robusto, selectivo y sensible para el análisis de muestras ambientales complejas no tratadas. El método propuesto fue satisfactoriamente aplicado a la determinación de sulfuro en muestras de agua y aguas residuales.

El sistema MSFIA inteligente totalmente automatizado ha sido desarrollado y aplicado para la determinación de sulfuro de manera directa, con procedimientos en línea de dilución y pre-concentración de la muestra, con resultados altamente satisfactorios. El sistema propuesto fue capaz de auto-ajustarse a las diferentes situaciones sin ninguna intervención del analista. Además, se ha comprobado que el método es aplicable a muestras con matriz compleja sin requerir pre-tratamiento adicional. El sistema inteligente, que combina la separación en línea por DG con un sensor de fibra óptica basado en la pre-concentración en fase sólida sobre membrana y la detección en una

celda espectrofotométrica de flujo, permite establecer un método analítico robusto, selectivo y sensible para analizar muestras sin tratar dentro de un amplio rango de concentraciones.

El uso de un espectrofotómetro miniaturizado con fibra óptica equipado con un diodo emisor de luz (LED) garantiza el bajo coste del sistema y la aplicabilidad de los sistemas automatizados, con capacidad de separación y pre-concentración o dilución en línea, para realizar análisis de campo y monitorizar sulfuro en tiempo real.

Además, el MSFIA proporciona ventajas adicionales respecto a otras técnicas de flujo, tales como la compactibilidad, gran versatilidad y bajo consumo de muestra y reactivos, lo cual conduce a una mínima generación de desechos.

De la revisión bibliográfica se desprende que el FIA capitaliza la mayoría de las publicaciones. El uso tan extendido de esta técnica de análisis en flujo puede ser atribuido a la fácil construcción del *manifold*, sin la necesidad de un programa de control especializado y a la relativamente reciente aparición de las otras técnicas. Sin embargo, una tendencia emergente en química analítica es el desarrollo de sistemas inteligentes, utilizando procedimientos controlados por ordenador, los cuales son fácilmente adaptables a mediciones sin atención del analista. Además, un gran número de sistemas en flujo publicados en la última década incluye la separación y pre-concentración del analito para lograr una apropiada selectividad y sensibilidad del método.

Referencias

-
- [1] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2nd Ed., J. Wiley, New York (1988).
- [2] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, Análisis por Inyección en Flujo, Depto. Química Analítica, Universidad de Córdoba y Monte de Piedad y Caja de ahorros de Córdoba (Eds.), Córdoba, España (1984).
- [3] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Automatic methods of analysis*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands (1988).
- [4] B. Karlberg, G.E. Pacey, *Flow Injection Analysis. A practical guide*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands (1989).
- [5] V. Cerdà, G. Ramis, *An introduction to laboratory automation*, J. Wiley, New York (1990).
- [6] M. Trojanowicz, *Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications*, World Scientific Publishing, Singapore (2000).
- [7] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro. *Flow-Through (Bio)Chemical Sensor*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands (1994).
- [8] V. Cerdà, Introducción a los métodos de análisis en flujo, Sciware, Palma de Mallorca (2006).
- [9] J. Ruzicka, E. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 179 (1986) 1.
- [10] J. Ruzicka, G. Marshall, G. Christian, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1861.
- [11] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329.
- [12] G.D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 297.
- [13] G.D. Christian, *Analyst* 119 (1994) 2309.
- [14] R. E. Taljaard, J.F. van Staden, *Lab. Robot. Autom.* 10 (1998) 325.
- [15] V. Cerdà, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, *Talanta* 50 (1999) 695.
- [16] C.E. Lenehan, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Analyst* 127 (2002) 997.
- [17] M. Miró, V. Cerdà, J.M. Estela, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 199.
- [18] B. Horstkotte, O. Elsholz, V. Cerdà, *J. Flow Injection Anal.* 22 (2005) 99.
- [19] M. Segundo, L.M. Magalhaes, *Anal. Sci.* 22 (2006) 3.
- [20] L.T Skeggs, *Am. J. Clin. Pathol.* 28 (1957) 311.

-
- [21] J. Ruzicka, E. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145.
- [22] J. Ruzicka, G. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329.
- [23] O. Thomas, F. Theraulaz, V. Cerdà, D. Constant, P. Quevauviller, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 419.
- [24] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C Lima, R.A. Lapa, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129.
- [25] V. Cerdà, C. Pons, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 236.
- [26] F. Albertús, B. Horstkotte, A. Cladera, V. Cerdà, *Analyst* 124 (1999) 1373.
- [27] M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 199.
- [28] J. Ruzicka, *Analyst* 125 (2000) 1053.
- [29] R.A.S. Lapa, J.L.F.C Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 125.
- [30] *Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US* (2004), *Hydrogen sulfide*.
www.atsdr.cdc.gov
- [31] *Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US* (2001), *Annual Report*.
www.atsdr.cdc.gov
- [32] D.C. Fuller, A.J. Suruda, *J. Occup. Environ. Med.* 42 (2000) 939.
- [33] L.C. Radke, C.S. Smith, D.A. Ryan, B. Brooke, D. Heggie (2003), *Coastal Indicator and Information System I: Biophysical Indicators*. Canberra: Geoscience Australia.
www.ozestuaries.org
- [34] U. Förstner, *Biogeochemistry of Pollutants in Soils and Sediments*, W. Salomons, W. Stigliani (Eds.), Springer, Germany (1995).
- [35] U.S. EPA. (1993) *Report to Congress on hydrogen sulfide air emissions associated with the extraction of oil and natural gas*. Environmental Protection Agency, US. EPA/453/R-93-045. NTIS publication PB131224.
- [36] M.J. O'Neil (Ed.), *The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 13th ed, Merck Publications (2001).
- [37] N. S. Lawrence, J. Davis, R. G. Compton, *Talanta* 52 (2000) 771.
- [38] K.Y. Kilburn, *Southern Medical Journal* 96 (2003) 656.
- [39] Catálogo de Estándares Ambientales, Tomo III. Ministerio Federal de Cooperación Económica y Desarrollo (Ed.), Eschborn, Alemania (1996).
- [40] E. Fischer, *Chem. Ber.* 16 (1883) 2234.
- [41] APHA-AWWA-WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th Ed., 1992.
- [42] V. Kuban, P. K. Dasgupta, J. N. Marx, *Anal. Chem.* 64 (1992) 36.
- [43] M. Miró, W. Frenzel, J.M. Estela, V. Cerdà, *Analyst* 126 (2001) 1740.

-
- [44] E. Becerra, A. Cladera, V. Cerdà, *Lab. Rob. Autom.* 11 (1999) 131.
- [45] R.J. Cassella, L.S. Teixeira, S. Garrigues, A.C. Spinola, R.E. Santelli, M. De la Guardia, *Analyst* 125 (2000) 1835.
- [46] D.J. Leggett, N.H. Chen, D.S. Mahadevappa, *Anal. Chim. Acta* 128 (1981) 163.
- [47] A. Ríos, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst* 109 (1984) 1487.
- [48] E.A.G. Zagatto, M.A.Z. Arruda, A.O. Jacintho, I.L. Mattos, *Anal. Chim. Acta* 234 (1990) 153.
- [49] V.O. Brito, I.M. Raimundo Jr., *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 317.
- [50] H. Liu, P. K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta* 289 (1994) 347.
- [51] I.D. McKelvie, D.M. W. Peat, G.P. Matthews, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 265.
- [52] R.A.S. Lapa, J.L.F. C. Lima, B.F. Reis, J.L. M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 209.
- [53] Z.L. Fang, *Flow Injection Separation and Preconcentration*, VCH, Weinheim, Germany (1993).
- [54] M.S.P. Silva, C.X. Galhardo, J.C. Masini, *Talanta* 60 (2003) 45.
- [55] G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712 A.
- [56] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd Ed., Ellis Horwood, Chichester (1993).
- [57] M.S.P. Silva, I.S. da Silva, G. Abate, J.C. Masini, *Talanta* 53 (2001) 843.
- [58] R. Tryzell, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 206.
- [59] W. Frenzel, *Lab. Rob. Autom.* 5 (1993) 245.
- [60] W. Frenzel, *GIT-Labor Fach.* 41 (1997) 734.
- [61] A.N. Araújo, M.B. Etxebarria, J.L.F.C. Lima, M.C.B.S.M. Montenegro, R. Pérez-Olmos, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 351 (1995) 614.
- [62] S.H. Ingwersen, N.J.K. Simpson (Ed.), *Solid-phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, Marcel Dekker, New York, NY, 2000.
- [63] K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta* 32 (1985) 345.
- [64] M. Miró, W. Frenzel, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 11.
- [65] R. Narayanaswamy, *Analyst* 118 (1993) 317.
- [66] M. Okumura, N. Yano, K. Fujinaga, Y. Seike, S. Matsuo, *Anal. Sci.* 15 (1999) 427.
- [67] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 173 (1985) 3.
- [68] B.A. Petersson, Z. Fang, J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 184 (1986) 165.
- [69] A. Safavi, B. Haghighi, F. Peiravian, *Anal. Lett.* 36(2) (2003) 479.
- [70] J.M. Zen, P.Y. Chen, A.S. Kumar, *Electroanalysis* 14 (2002) 513.

-
- [71] M. Miró, W. Frenzel, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 624.
- [72] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, *Anal. Chim. Acta* 534 (2005) 327.
- [73] D.B. Gazda, J.S. Fritz, M.D. Porter, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4881.
- [74] M.D. Luque de Castro, I. Papaefstathiou, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 41.
- [75] V. Kuban, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 23 (1992) 323.
- [76] J. Pawliszyn, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 113.
- [77] C.W.K. Chow, D.E. Davey, D.E. Mulcahy, *Lab. Autom. Info. Management* 31 (1995) 77.
- [78] A. Bonastre, R. Ors, M. Peris, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 263.
- [79] M. Peris, *Anal. Chim. Acta* 454 (2002) 1.
- [80] A. Rius, M.P. Callao, F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 316 (1995) 27.
- [81] C.W.K. Chow, D.E. Davey, D.E. Mulcahy, *Lab. Autom. Info. Management* 33 (1997) 17.
- [82] V. Grassi, A.C.B. Dias, E.A.G. Zagatto, *Talanta* 64 (2004) 1114.
- [83] A. Bonastre, R. Ors, M. Peris, *Chemometrics Intelligent Lab. Systems* 50 (2000) 235.
- [84] A. Bonastre, R. Ors, M. Peris, *Anal. Chim. Acta* 506 (2004) 189.
- [85] C. Pons, R. Forteza, V.Cerdà, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 79.
- [86] H.S. Jacobsen, A. Lynggaard Jensen, *Monitoring of water quality*, F. Colin, P. Quevauviller (Eds.), Elsevier Amsterdam, Netherlands (1998).
- [87] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119.
- [88] J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, A.C.B. Dias, M.F.T. Ribeiro, E.A.G. Zagatto, *Talanta* 64 (2004) 1091.
- [89] E.H. Hansen, M. Miró, X.-B. Long, R. Petersen, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1243.
- [90] P. Patnaik, *A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances*, Wiley, New York, 1999.
- [91] W. Salomons, *Biogeochemistry of Pollutants in Soils and Sediments*, W. Salomons, W. Stigliani (Eds.), Springer, Germany (1995).
- [92] O.F. Kamson, *Anal. Chim. Acta* 211 (1988) 299.
- [93] K. Sonne, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* 63 (1991) 427.
- [94] M. Yaqoob, M. Anwar, A.S. Masood, M. Masoom, *Anal. Letters* 24 (1991) 581.
- [95] M.D. Kester, P.M. Shiundu, A.P. Wade, *Talanta* 39 (1992) 299.
- [96] A.A. Ensafi, *Anal. Letters* 25 (1992) 1525.
- [97] S. Kawakubo, M. Iwatsuki, T. Fukasawa, *Anal. Chim. Acta* 282 (1993) 389.

-
- [98] I. Papaefstathiou, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996) 442.
- [99] J.F. van Staden, L.G. Kluever, *Anal. Chim. Acta* 369 (1998) 157.
- [100] P.M. Sarradin, N. Le Bris, D. Birot, J.C. Caprais, *Anal. Commun.* 36 (1999) 157.
- [101] L. Ferrer, G. De Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Talanta* 64 (2004) 1119.
- [102] G. de Armas, L. Ferrer, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 89.
- [103] L. Ferrer, G. de Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Analyst* 130 (2005) 644.
- [104] L. Ferrer, G. De Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Talanta* 68 (2005) 343.
- [105] L. Ferrer, J.M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 391.
- [106] L. Ebdon, S.J. Hill, M. Jameel, W.T. Corns, P.B. Stockwell, *Analyst* 122 (1997) 689.
- [107] T. Nakahara, T. Mori, S. Morimoto, H. Ishikawa, *Spectrochimica Acta* 50 (1995) 393.
- [108] A.G. Howard, C.Y. Yeh, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4868.
- [109] X.S. Chai, Q. Hou, J.Y. Zhu, W. Ban, *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (2003) 254.
- [110] P.K. Dasgupta, H.C. Yang, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2839.
- [111] M.A. Spaziani, J.L. Davis, M. Tinami, M.K. Carroll, *Analyst* 122 (1997) 1555.
- [112] P.C. do Nascimento, D. Bohrer, J. Tramontina, *Analyst* 122 (1997) 835.
- [113] E.B. Milosavijevic, L. Solujic, J.L. Hendrix, J.H. Nelson, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2791.
- [114] P. Jeroschewski, C. Steuckart, M. Kühl, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4351.
- [115] A.B. Florou, M.I. Prodromidis, M.I. Karayannis, S.M. Tzouwara-Karayanni, *Talanta* 52 (2000) 465.
- [116] D.M. Tsai, A.S. Kumar, J.M. Zen, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 145.
- [117] R. Al-Farawati, C.M.G. van den Berg, *Marine Chemistry* 57 (1997) 277.
- [118] J.L.F.C. Lima, L.S.M. Rocha, *Inter. J. Anal. Chem.* 38 (1990) 127.
- [119] L. Olenic, E. Hopirtean, L. Olenic, *Analyst* 122 (1997) 107.
- [120] B. Vallejo, P. Richter, I. Toral, C. Tapia, M.D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 301.
- [121] M. Becker, B. Fuhrmann, U. Spohn, *Anal. Chim. Acta* 324 (1996) 115.
- [122] J.L. Burguera, A. Townshend, *Talanta* 27 (1980) 309.
- [123] J. Du, Y. Li, J. Lu, *Anal. Chim. Acta* 448 (2001) 79.
- [124] A. Safavi, M.A. Karimi, *Talanta* 57 (2002) 491.
- [125] V. Cerdà, J.M. Estela, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 85 (2005), 231.

Anexo

PUBLICACIONES

1. A multisyringe flow injection method for the automated determination of sulfide in waters using a miniaturised optical fiber spectrophotometer. L Ferrer, G de Armas, M Miró, JM Estela & V Cerdà. **Talanta** (2004), 64: 1119-1126.
2. In-line membrane separation method for sulfide monitoring in wastewaters exploiting the multisyringe flow injection analysis. G De Armas, L Ferrer, M Miró, JM Estela & V Cerdà. **Analytica Chimica Acta** (2004), 524: 89-96.
3. Flow-through optical fiber sensor for automatic sulfide determination by multisyringe flow injection analysis using solid-phase reflectometry. L Ferrer, G de Armas, M Miró, JM Estela & V Cerdà. **Analyst** (2005), 130 (5): 644-651.
4. Interfacing in-line gas-diffusion separation with optrode sorptive preconcentration exploiting multisyringe flow injection analysis. L Ferrer, G de Armas, M Miró, JM Estela & V Cerdà. **Talanta** (2005), 68: 343-350.
5. A smart multisyringe flow injection system for analysis of sample batches with high variability in sulfide concentration. L Ferrer, JM Estela & V Cerdà. **Analytica Chimica Acta** (2006), 573-574: 391-398.
6. Analytical methodologies for reliable sulfide determinations in aqueous matrices exploiting flow-based approaches. L Ferrer, M Miró, JM Estela & V Cerdà. **TRAC-Trends in Analytical Chemistry** (2007), 26(5): 413-422.